

Oponentský posudek doktorské disertační práce

„Příspěvek k radiodiagnostice a k léčbě vybraných patologických lézí femuru v dětském a dospělém věku“

MUDr. Bc. Martin Horák

Práce byla předložena k obhajobě oborové komisi pro studijní program biomedicína, studijní obor lékařská biofyzika při 1. LF UK. Práce zahrnuje 89 stránek textu, 145 literárních citací, 8 tabulek, 29 obrazů v textu a 130 obrazů v příloze z toho 37 histologických, převážně imunohistologických. K práci jsou jako příloha rovněž připojeny separátní výtisky čtyř publikací – dvě s prioritním pozorováním patologické vaskularizace dolní končetiny u PFFD publikované v domácí i zahraniční literatuře a dvě zahraniční publikace o změnách kloubní chrupavky při transplantaci autologních chondrocytů.

Práce je věnována jednak komplexní problematice vrozeného defektu proximálního femuru (PFFD), jednak studiu posttraumatických lézí kloubní chrupavky a její reparační po transplantaci autologních chondrocytů s použitím dvou různých nosičů. Kromě hodnocení nálezů získaných zobrazovacími metodami je součástí práce i hodnocení histologických změn patologicky změněné chrupavky a v případě posttraumatických defektů i změn, které provázejí vhojování použitých skafoldů. Především tato část práce je i vlastním předmětem tohoto oponentského posudku.

Ke sledování změn chrupavky použil autor v případě PFFD vzorky získané při rekonstrukčních operacích, při sledování skupiny pacientů s traumatickými defekty kloubní chrupavky vzorky získané při artroskopickém vyšetření. U vzorků od 6 pacientů s PFFD bylo

nutné vzorky před vyšetřením odvápnit, vzorky chrupavky u skupiny pacientů s transplantací byly zpracovány bez odvápnění. Mimo vyšetření rutinním barvením byly u vzorků s transplantovanou chrupavkou hodnoceny kyselý mukopolysacharidy barvením Safraninem O a alcianovou modří. V obou skupinách, i když v různém rozsahu bylo provedeno imunohistologické vyšetření řadou protilátek proti S-100 proteinu a jeho isoformám, alfa aktinu, svalově specifickému aktinu, desminu, CD34, Ki67 a lidskému kolagenu II. typu. K odlišení S-100 pozitivních chondrocytů a osteoblastů byly použity markery D2-40, osteonektin a osteokalcin.

Ve skupině PFFD měla kloubní chrupavka všechny rysy neuspořádané hyalinní chrupavky, typické lakunární chondrocyty však byly přítomny pouze ojediněle na periferii ložiska. Ani tyto buňky však na rozdíl od normálních diferencovaných chondrocytů neexprimovaly S-100 protein. Osifikace byla omezena pouze na nepravidelná ložiska v centech chrupavčitých hmot, která imponovala jako základy osifikujících center. V jednom případě byla zachycená pod méně vyžralou chrupavkou lamelární kostní tkáň, která jevila známky přestavby. Jinde byly v kostní tkáni ostrůvky nezralé chrupavky bez jakýchkoli známek enchondrální osifikace. I zde chyběla v chondrocytech exprese jak S-100 proteinu, tak alfa aktinu hladké svaloviny.

Ve skupině traumatických defektů chrupavky byla v části případů histologicky vyšetřována původní traumatisovaná chrupavka, dále skafoldy před implantací a posléze novotvořená chrupavka odebraná při artroskopickém vyšetření 10 – 12 měsíců po provedené transplantaci.

Oba dva použité typy skafoldů měly, jak odpovídá i jejich přípravě rozdílné složení. Hyalograft C byl tvořen sítí biomateriálu, jehož základem byl ester kyseliny hyaluronové, a kde implantované chondrocyty svým tvarem i expresí alfa aktinu a negativitou S-100 proteinu odpovídaly spíše buňkám hladké svaloviny či myofibroblastům než chondrocytům. V případě Chondrograftu, kde byly chondrocyt implantovány do sítě fibrinu, si buňky zachovaly jak morfologické tak imunohistologické znaky chondrocytů, když exprimovaly různé isoformy S-100 proteinu. Rovněž jejich viabilita byla dobře zachovaná se zřetelně pozitivním proliferačním indexem kolem 5% při průkazu Ki67.

Po zhruba ročním intervalu po transplantaci byla v případě obou použitých preparátů nalezena vitální novotvořená chrupavka dílem hyalinního, dílem vazivového charakteru. I

Věcně bych se chtěl dotázat na expresi alfa aktinu hladké svaloviny v povrchových vrstvách chrupavky u PFFD, jeho negativita je zmíněna pouze v ostrůvcích chrupavky uvnitř kostních trámců.

V závěru konstatuji, že disertace odpovídá požadavkům stanoveným paragrafem 47 Zákona o vysokých školách č. 111/98/Sb. a doporučuji, aby MUDr. Bc. Martinu Horákovi byl udělen akademický titul doktora ve zkratce „Ph.D.“.

V Praze dne 27. 8. 2014

Doc. MUDr. Josef Marek, CSc.

když ve všech případech byla chrupavky pevně integrována do kostních struktur, její architektonické uspořádání a okrsky vazivové chrupavky svědčily přes odpovídající imunoprofil (pozitivita S-100 proteinu v chrupavce hyalinní a koexprese alfa aktinu v chrupavce vazivové) stále o její nezralosti. Za zmínku stojí ve dvou případech transplantace Hyalograftu C výskyt resorptivní makrofagické reakce s resorpcí mukopolysacharidového materiálu jako residua původního štěpu. V případech novotvořené chrupavky po implantaci Chondroraftu byla chrupavka vyzrálejší s přítomností typických lakunárních buněk a méně rozsáhlými okrsky chrupavky vazivové.

Morfologické nálezy u pacientů s PFFD spolu s prioritním průkazem patologické vaskularizace dolní končetiny, který je třeba zvláště vyzdvihnout, prokazují komplexní charakter této vrozené vady neomezený pouze na primární postižení kostní tkáně. Histologické a především imunohistologické nálezy prokazují významnou poruchu diferenciaci chrupavky, která zůstává retinována na fetální úrovni. Do jaké míry se v procesu vzniku PFFD uplatňují změny cévního zásobení s proběhlou ale neprokázanou resorbovanou nekrosou či nedokonalý vývoj kloubní chrupavky ponechává autor po obšírné diskusi jako otevřenou otázku vyžadující další srovnání.

Ve skupině pacientů s posttraumatickou lézí kloubní chrupavky léčené transplantací dvou typů skafoldů, umožňuje histopatologická část práce hlubší pochopení jakým způsobem jsou tyto štěpy začleňovány do okolních tkání a jakým způsobem a do jaké míry probíhá degradace jejich nosiče (esteru kyseliny hyaluronové a fibrinu). Mimo to práce přináší řadu poznatků obecně významných při posuzování buněčné diferenciaci a tkáňové remodelace, kde imunohistologický průkaz antigenů upřesňuje omezené možnosti hodnocení pouze na základě klasické histologie.

Disertační práce je psána koncisně, s přehledem a dobrou češtinou, obrazová dokumentace je dostatečná a v dobré kvalitě. Literatura je obsáhlá a recentní. Použitá metodika je adekvátní.

Výsledky disertační práce byly publikovány ve třech sděleních otištěných v časopisech s IF a dvou abstraktech s IF, další čtyři sdělení byla publikována v domácích odborných časopisech bez IF.

Z čistě formálních připomínek bych vytkl chybějící čárku na str. 80 –
.... myoepiteliálních buněk, pericytů.....