



UNIVERZITA KARLOVA - LÉKAŘSKÁ FAKULTA V PLZNI
FAKULTNÍ NEMOCNICE PLZEŇ
KLINIKA NEMOCÍ UŠNÍCH, NOSNÍCH A KRČNÍCH
přednosta: Doc. MUDr. Jaroslav Slípka, CSc.

E.Beneše 13, Plzeň 305 99, tel.: 377402248, fax: 377402615

O P O N E N T S K Ý P O S U D E K

doktorské dizertační práce MUDr. Hany Pácové: "Sledování výskytu lidského defensinu ve vztahu k buněčnému cyklu ve sliznici dýchacích cest".

Dizertační práce MUDr. Hany Pácové: "Sledování výskytu lidského defensinu ve vztahu k buněčnému cyklu ve sliznici dýchacích cest" byla předložena ve svázaném výtisku o 125 strojopisných stranách, k nimž byly připojeny ještě dva separátní otisky originálních publikací:

1. Pácová H., Astl J., Martínek J.: (2009) „The pathogenesis of chronic inflammation and malignant transformation in the human upper airways – the role of beta-defensins, eNOS, cell proliferation and apoptosis“. *Histology and Histopathology*, 24:815-820 (IF 2,007)
2. Lukeš P., Pácová H., Kučera T., Veselý D., Martínek J., Astl J.: (2008) "Expression of endothelial and inducible nitric oxide synthase and caspase-3 in tonsillar cancer, chronic tonsillitis and healthy tonsils". *Folia Biologica*, 54:141-145 (IF 0,596)

Dizertace byla vypracována na Klinice ORL a chirurgie hlavy a krku 1.LF UK v Praze v Motole pod vedení školitele doc.MUDr. Jaromíra Astla,CSc. a na Ústavu histologie a embryologie 1.LF UK v Praze pod vedením školitele- konzultanta Prof.MUDr. Jindřicha Martínka, DrSc. Práce vznikla za podpory grantových projektů a výzkumných záměrů FRVŠ, IGA MZČTR a MSM.

Celý spis je rozdělen do šesti obsáhlých kapitol, z nichž každá se opět dělí na subkapitoly. V textu je vloženo 52 obrázků – většinou barevných mikrofotografií, z nichž mnohé jsou složeny z několika snímků. Vedle těchto obrázků je tu také 12 kreslených schémat. Seznam použité literatury je na str. 113-125 a obsahuje kolem 100 většinou moderních, cizojazyčných publikačních citací.

V úvodní kapitole, která zaujímá téměř polovinu celého rukopisu, se autorka zabývá histologickými poměry jak zdravých, tak i patologických změn tkání sledované respirační oblasti a tonsil. Dále podává přehled dosavadních znalostí o antimikrobiální obraně slizničních povrchů, o zánětlivých procesech se zřetelem k regulační úloze endotelu a o nádorové transformaci s ohledem na buněčný cyklus. Kapitulu uzavírá pohledem na molekuly a faktory ovlivňující fyziologické i patologické procesy.

Z přehledu dosavadních znalostí studované problematiky vyplynuly autorce hypotézy a cíle práce - prokázat výskyt antimikrobiálních peptidů ve sliznici imunologicky důležitých oblastí nosní sliznice a tonsil, jakož i sledovat vztahy defensinů a dalších různých faktorů k proliferaci a apoptose buněk při nádorové transformaci.

Z kapitoly „Materiál a metody“ vyplývá, že ke studiu odebraných a relativně zdravých tkání byly použity sofistikované, trojstupňové imunohistochemické metody k průkazu jednotlivých molekul, jakož i další histochemické metody při studiu nosních polypů.

Další kapitola je věnována výsledkům, v nichž autorka popisuje svoje nálezy. Všechny tři sledované defensiny HDB1,2,3 byly syntetizovány více ve zdravé sliznici respiračního traktu než v tonsilách. Jejich výskyt nebyl ani zvýšen při chronickém zánětu a polypech při absenci S.aureus. Při pozitivním kultivačním nálezu Zlatého stafylokoka byla hladina sledovaných defensinů mírně zvýšena.

Defensin HDB 1 je součástí slizniční imunity a jeho produkce není příliš stimulována infekcí. Vyšší množství bylo detekováno v keratinových perlách při Ca tonsily. HDB 2 se vyskytuje ve vysokém množství v nosní sliznici, méně v tonsilách a skoro chybí u nádorů. HDB 3 výskyt je nižší u karcinomu než v zánětlivé tkáni, ale je nalezen v endotelu cév u polypů a v tonsilách, nikoli však u zdravé sliznice.

Vedle defensinů sledovala autorka výskyt endotelové NO syntasy ve všech studovaných vzorcích, proliferační marker Ki-67 u proliferujících buněk u zánětlivých i karcinomových tkání, apoptotický marker cleaved caspase v keratinových perlách nádorových tonsil, jakož i růstové faktory, jak endotelový (VEGF) v endotelových buňkách tak transformační (TGF-beta) jak v povrchovém, tak i žláзовém epitelu.

Z výsledků autorčiných sledování vyplývá, že maligní transformace může být usnadňována sníženou lokální imunitou (omezená produkce zvl. HDB 2), ale také při hypoxii, kdy dochází ke zvýšené expresi růstových faktorů a produkci molekuly NO a tím k ovlivnění procesu apoptosy, buněčné proliferace, angiogeneze, cévní permeability a k ovlivnění buněčného cyklu.

V diskusní kapitole srovnává autorka své nálezy s literárními údaji, které se často mezi sebou i značně liší, zvl. u prvních dvou typů HBD, a snaží se o vysvětlení těchto rozporů. Dochází přitom ke zobecnění výsledků svých pozorování, často ojedinělých. K takovým prioritním výsledkům patří nález HBD 3 v endotelu cév v zánětlivé sliznici a stejně významné, i když záhadné, je zjištění minimálního výskytu beta defensinů na sliznici s prokázaným Zlatým stafylokokem. Značný význam má také autorčino zjištění aktivní endotelové syntasy NO, ale i růstových faktorů ve výstelce malých cév a jejich podílu na proliferaci, angiogenezi a apoptose hlavně v oblasti karcinomových perl.

Na konci celé dizertace jsou přiloženy separátní otisky dvou prací, které byly jejím podkladem a byly publikovány v prestižních impaktovaných časopisech - prošly tedy oponenturou na nejvyšší světové odborné úrovni.

Tolik tedy k výsledkům předložené dizertace. Určitě je nutno pochválit autorku za perfektní fotodokumentaci a za precizní interpretaci nálezů. Není nejmenších pochyb, že předložená dizertace řeší vysoce závažnou a aktuální problematiku antimikrobiálních peptidů ve strategicky nejdůležitější oblasti celého organismu. V době explozivního vývoje imunologie a v době zvyšující se rezistence na antibiotika dostává celá práce charakter nejen velkého obecně biologického významu, ale i značného významu pro klinickou praxi, protože řeší nejširší možný okruh problémů od morfologických po molekulárně imunologické. Celou širokou problematiku řeší sofistikovanými metodikami, v klasické morfologii ojedinělými.

Je nespornou zásluhou autorky, že dokázala perfektně skloubit svůj široký zájem o otázky histologické s moderním pojetím molekulárně biologickým a že tak mohla dojít k řadě prioritních nálezů. Práce jako celek se tak stává důstojným příspěvkem k tradičně a mezinárodně uznávaným úspěchům české imunologie. Je ovšem jen přirozené, že čtenáře napadají doplňující poznámky a otázky k výsledkům autorčina výzkumu:

1. Do jaké míry je v literatuře popsána sekrece defensinů u adenooidních vegetací, liší se od situace, kterou popsala autorka u palatinálních tonzil?

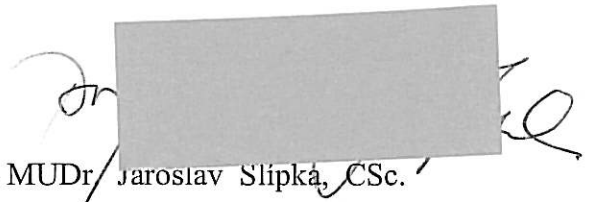
2. Jaký je názor autorky na morfogenezi keratinových perel u popisovaných karcinomů patrových tonzil?

Dizertaci nelze po stránce obsahové vytýkat jakékoli chyby v interpretaci jejích studií – konečně řada dílčích výsledků byla přednesena na odborných sjezdech a její zásadní práce byly publikovány v seriózních časopisech, kde prošla recenzním řízením odborníků. Z našeho krátkého výčtu výsledků a poznámek také nevyplývá, kolik mravenčí práce autorka musela vynaložit, aby v záplavě stovek preparátů a experimentů dospěla k předloženým závěrům. Práce je psána s pečlivostí a dobrou češtinou a stane se zcela určitě základnou pro další studium této závažné problematiky nejen autorky, ale i dalších badatelů.

Závěr

Předložená doktorská dizertace MUDr. Hany Pácové: “Sledování výskytu lidského defensinu ve vztahu k buněčnému cyklu ve sliznici dýchacích cest“ je zcela mimořádné dílo vysokého obecně biologického významu, značně rozšiřuje dosavadní znalosti o zkoumané oblasti a je tedy významné nejen z hlediska základního biomedicínského výzkumu, ale i z hlediska klinicky praktického. Autorka prokázala schopnost k samostatné vědecké práci, která jí umožnila dosáhnout řady prioritních výsledků a obohatit tak naši i světovou odbornou literaturu. Z těchto důvodů oponent doporučuje přijmout předloženou dizertaci po její obhajobě jako podklad pro další doktorské řízení a k udělení titulu PhD.

V Plzni, 29. 7. 2009


Doc. MUDr. Jaroslav Slípka, CSc.