

**Oponentský posudek na disertační práci v doktorském studijním programu MUDr. Jiřího Uhlíka:**

**„Vliv různých experimentálních, diagnostických a terapeutických zásahů na buňky epitelu dýchacích cest“**

**Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta  
Ústav histologie a embryologie**

**Základní identifikační údaje**

Předložená disertační práce MUDr. Jiřího Uhlíka má celkem 171 stran a je tradičně rozdělena do pěti kapitol: Úvod (8 stran), Materiál a metodika (11 stran), Výsledky a diskuze (114 stran), Závěry (8 stran), Literatura s 245 odkazy (15 stran).

Textová část obsahuje 16 tabulek a 4 grafy. Obrazovou dokumentaci tvoří 103 mikrofotografie, kromě jednoho světelně mikroskopického snímku jsou všechny ostatní elektronogramy z transmisního elektronového mikroskopu velmi dobré kvality. Dokumentace práce je kvalitní a rozsáhlá.

**Aktuálnost řešeného tématu**

Autor se zabývá vlivem různých látek (acetylcholinu, adrenalinu, bronchospazmolytik, inhalačních kortikosteroidů a mukolytik) na ultrastrukturu epitelu terminálních bronchiolů a rovněž tak vlivem hypoxie na ultrastrukturu tohoto epitelu. Vzhledem k tomu, že buňky epitelu dýchacích cest jsou prvními buňkami přicházejícími do kontaktu s vdechovaným vzduchem a různými látkami v něm obsaženými, je studium působení těchto látek na epitel dýchacích cest velmi aktuální problematikou se značným významem pro klinickou praxi.

Kapitola **Úvod** obsahuje i literární přehled, kde autor věnuje velkou pozornost rozsáhlým studiím prof. Konrádové a velmi podrobně se zabývá údaji o struktuře a funkci Claraových buněk od jejich objevení až po současné výsledky výzkumu.

V kapitole **Materiál a metodika** autor detailně popisuje zpracování vzorků plic experimentálních králíků standardní EM metodikou a kvantitativní hodnocení jednotlivých epitelových buněk, včetně Clara buněk. Pro kvantitativní hodnocení použil software Lucia G (byla hodnocena plocha cytoplazmy Clara buněk, počet a velikost sekrečních granulí a počet a velikost mitochondrií). Statistické zpracování výsledků bylo prováděno ve spolupráci s pracovníky Ústavu aplikací matematiky a výpočetní techniky PŘFUK za použití adekvátních statistických testů.

Nejobsáhlejší částí práce je kapitola 3 **Výsledky a diskuze**. Je rozdělena do 7 podkapitol a ke každé z nich je přiřazena dílčí diskuze. V první části této kapitoly autor podává velmi podrobný popis ultrastruktury epitelu terminálních bronchiolů zdravých kontrolních králíků, v dalších podkapitolách pak popisuje eventuální změny ultrastruktury tohoto epitelu po experimentální intervenci.

Za nejvýznamnější výsledky práce pokládám následující autorovy nálezy:

1. Nedošlo ke změnám celkového charakteru epitelu terminálních bronchiolů, pokud jde o relativní zastoupení řasinkových a Clara buněk u žádné z experimentálních skupin, čili žádný zákrok nevyvolal změny v distribuci, ani nadměrnou degeneraci nebo proliferaci, ani výrazné změny v integritě epitelu.

2. Autor zvolil jako marker sekreční aktivity obsah sekrečních granul v Clara buňkách. Zde prokázal statisticky významné změny oproti kontrole. Nejvyšší zastoupení Clara buněk s granuly našel v epitelu králíků s intravenózní aplikací aminophylinu. Statisticky významné rozdíly byly také u skupiny zvířat, které byly umístěny 4 dny v normobarické komoře s normoxickou i hypoxickou atmosférou. Tento rozdíl se ovšem nepromítl do počítačové analýzy cytoplazmy. Oproti kontrole byl statisticky významný rozdíl Clara buněk s granuly u králíků při odběru 5 minut po aplikaci menší dávky acetylcholinu. Účinek acetylcholinu autor vysvětluje tak, že zpočátku při aplikaci obou dávek acetylcholinu došlo se střádání sekretu v buňkách (menší dávkou acetylcholinu méně poškozené Clara buňky střeďaly aktivněji). Větší dávka pak stimulovala k sekreci. Po aplikaci adrenalinu nedošlo ke statisticky významné změně relativního počtu Clara buněk s granuly. Autor to vysvětluje alterací cytoplazmy těchto buněk. Mukolytikum Ambroxolol perorálně podané nezpůsobilo významnější reakci epitelu terminálních bronchiolů (na rozdíl od reakce tracheálního epitelu).

3. Autor pozoroval ve všech sledovaných skupinách ultrastrukturální známky patologické alterace epitelových buněk (řasinkových i Clara buněk). Jednalo se n.př. o edém povrchových oblastí cytoplazmy s tvorbou protruzí s narušením řasinek nebo zvýšeným počtem lysosomů a dilatací endoplazmatického retikula i Golgiho komplexu u řasinkových buněk.

U Clara buněk šlo především o dilataci tubulů hladkého ER v apikální části buněk, docházelo i k rozpadu těchto buněk. Dilatováno bylo rovněž granularní ER a Golgiho komplex. Často se vedle sebe nacházely poškozené a nepoškozené buňky.

4. Při srovnání reakce epitelu trachey a terminálních bronchiolů epitel trachey reagoval na zásahy vždy mnohem výrazněji. Řasinkové buňky obecně reagovaly na experimentální zákroky spíše alterací ultrastruktur, sekreční pak byly stimulovány k tvorbě a uvolňování sekretu. Rozdíl byl i v reakci pohárkových a Clara buněk. U pohárkových byla pozorována rychlá stimulace, posléze degenerace a diferenciace nových buněk, Clara buňky vykazovaly méně nápadnou stimulaci, minimální degeneraci a nikdy nedošlo k diferenciaci a změnám distribuce těchto buněk. Autor to vysvětluje různým způsobem řízení sekreční aktivity Clara buněk terminálních bronchiolů a pohárkových buněk trachey.

Připomínky oponenta:

K práci mám připomínky spíše formálního charakteru.

1. Domnívám se, že by bylo vhodné zvýraznit cíle práce do krátké samostatné kapitoly (před materiál a metodiku).

2. Některé údaje v materiálu a metodice (kvantitativní hodnocení epitelu... tabulky 1-8) by možná bylo vhodnější umístit do kapitoly výsledky práce kvůli přehlednosti.

3. Bylo by škoda nevyužít množství získaných faktů pro další klinicko-morfologický výzkum. Má autor konkrétní představu o dalším směřování své výzkumné aktivity?

### **Celkové zhodnocení disertace a její význam.**

Doktorská disertační práce Jiřího Uhlíka je aktuální dílo s významem pro klinickou praxi. Množství prostudované literatury svědčí o tom, že jmenovaný zvládl nejen studovanou

problematiku a metodiku práce ale zvládl i hodnocení obsáhlých nálezů. Použitá obsáhlá dokumentace je rovněž výborné kvality. Autor použil ke studiu moderní morfologické metody a postupy, včetně objektivizace výsledků pomocí kvantitativních morfometrických metod a statistického zpracování výsledků. Tyto metody jsou bezpochyby časově náročné, což bych chtěl rovněž ocenit.

Moje připomínky nikterak nesnižují hodnotu disertační práce.

**Závěr :Práce splňuje podmínky § 47 zákona o vysokých školách 111/ 1998 Sb a proto doporučuji aby po úspěšné obhajobě byl MUDr Jiřímu Uhlíkovi udělen titul PhD.**

V Olomouci 20.8.2007

Prof.MUDr Václav Lichnovský,DrSc