

Oponentský posudek dizertační práce MUDr. Anny Malečkové

Název práce: Histologické hodnocení experimentálních modelů onemocnění jater (Využití metod kvantitativní histologie v hodnocení mikroskopické stavby jater)

Autorka: Anna Malečková

Oponent: David Kachlík

Dizertační práce MUDr. Anny Malečkové představuje svázaný rukopis o 76 stranách souhrnného textu a 166 stranách jednotlivých odborných článků v českém a anglickém jazyce.

Je složena z teoretického úvodu (15 stran), cílů a hypotéz dizertace (7 stran), přehledu materiálu a metod (7 stran), stručného souhrnu výsledků a stručné diskuze (6 stran) a závěrů práce (3 strany) včetně seznamu použité literatury (9 stran, 70 položek domácí i zahraniční, knižní i časopisové literatury), obrázků (4) a tabulek (8), jejichž autorkou je sama petentka, dále v příloze z 10 logicky seřazených monotematických prací (petentka je 3krát první autorkou a 2krát druhou spoluautorkou).

Současný stav poznání není zdaleka dokončený a zvířecí modely jsou stále nedílnou součástí vědeckého bádání. Velký zvířecí model, prase domácí, je navíc zásadní na poli experimentální medicíny jako model člověku velmi blízký, aby výsledky bylo snadno přenosné do lidského lékařství. Histopatologické zhodnocení je stále nezbytnou součástí stanovení diagnózy v experimentálních studiích prasete. Práce si kladla za cíl použít a ověřit jak histologické metody kvalitativního, tak kvantitativní hodnocení na vybraném prasečím orgánu – na játrech. Jednalo se o automatickou obrazovou analýzu dat a stereologické metody, které umožňují vysokou opakovatelnost studií a porovnatelnost výsledků z různých studií. Ačkoli se práce může zdát na první pohled nesourodá (vývoj programů pro automatické rozbor morфометrických dat získaných výpočetní tomografií s vysokým rozlišením; zkoumání zastoupení vazivových složek a hustoty vlásečnic v jednotlivých částech jater; pokusy se sinusoidového obstrukčním syndromem a mechanickým poškozením jater nárazem), podává jako celek nejen soudržný soubor histopatologických výsledků zkoumání vaziva, krevních a žlučových cév jater včetně volně přístupných souborů dat, ale zejména návod, jak vyvinou a vést histopatologický výzkum na zvířecím modelu s uplatněním do experimentální a translační medicíny.

Potentka byla členkou týmu, jenž vyvinul program pro automatický rozbor drobných cév nasnímaných pomocí trojrozměrných zobrazovacích metod (pomocí výpočetní tomografie s vysokým rozlišením) pro odhalení pravděpodobných zdrojů chyb v měření, které je nutné zohlednit při nastavování kvantitativních algoritmů. Program je QuantAn je volně dostupný. Dále se podílela na vývoji programu pro generování virtuálních modelů vláknitých a porézních struktur se známými morфометrickými parametry, určený pro kalibraci a testování nastavení kvantifikace obrazových dat získaných pomocí výpočetní tomografie s vysokým rozlišením nebo pro testování nastavení stereologických mřížek užívaných při kvantitativních rozbořech trojrozměrných struktur.

Další oblastí zájmu bylo již přímé zkoumání zastoupení určitých morfológických jevů v játrech prasete: tedy objemového podílu vaziva v játrech zdravých zvířat a v jejich jednotlivých vybraných oblastech (periférie jater, laloky, parakavální a paraportální oblast). Nicméně i tato data jsou ve formě kontinuálních proměnných volně přístupná a mohou sloužit k výpočtu minimálního počtu vzorků nutného k prokázání nárůstu nebo poklesu množství vaziva

v experimentálních studiích. Poté byla pozornost věnována krevním a žlučovým vlasečnicím, a to zejména délkové hustotě ve vztahu k počtu hepatocytů a množství vaziva, opět v jejich jednotlivých vybraných oblastech. Popsaná různorodost slouží jako parametr pro plánování a vyhodnocování studií využívajících histologické hodnocení. Samozřejmě jsou tato data volně přístupná ve formě kontinuálních proměnných a mohou sloužit pro výpočet minimálního počtu vzorků nutného k odhalení histologických změn.

Dalším praktickým výstupem pak bylo vytvoření velkého zvířecího model sinusoidového obstrukčního syndromu pomocí aplikace alkaloidu monocrotalinu a jeho vyzkoušení na příkladu jednorázového nitrožilního podání dávky mezenchymových kmenových buněk, jež vedlo k delšímu přežití zvířat s tímto syndromem po odstranění části jater. Poslední výstupem byl pokus vytvářející umělé poškození jater při nárazu a jeho kvalitativní histologické zhodnocení, jež prokázalo, že trhliny v játrech se nešíří v závislosti na průběhu vláken jaterní trámčiny a přepážek. Volně dostupná biomechanická data mohou sloužit ke zhodnocení výpočetních modelů mechanické odpovědi jater v okamžiku nárazu.

Jednotlivé dílčí studie nejsou tedy samostatná témata, ale naopak navazující na dlouhodobé zaměření pracoviště i školitele a jejich metodologické zpracování se nachází na vysoké úrovni. Výsledky tomu odpovídající posunují naše znalosti vpřed a přinášejí poznatky použitelné v dalším teoretickém, avšak zejména v aplikovaném (experimentálním) výzkumu. Navíc petentka získala pro budoucí pokračování své vědecké práce nezbytné zkušenosti, aby mohla samostatně nejen provádět, nýbrž i řídit výzkum v oblasti získávání a zpracování histologických, histopatologických a morfometrických dat jak experimentálních zvířecích modelů, tak i člověka.

Další výrazně kladnou hodnotou práce je volná dostupnost získaných dat, proměnných, ale též vytvořených programů pro vědeckou práci, které díky svému altruizmu umožňuje snadno pokračovat v započatém výzkumu jater nebo využít tento postup pro jiné orgány, jiné zvířecí modely a samozřejmě zejména pro zpracování lidských tkání.

Jádro práce tvoří soubor monotematických článků, řazených podle obsahu v logické návaznosti od obecných metodických, přes základní výzkumné, až po experimentální a aplikované. Jedná se o sedm původních výsledkových prací (jedna dosud nepublikovaná) a tři přehledové práce, kromě dvou všechny vydané v impaktovaných časopisech (Web of Science) se souhrnným impaktem faktorem 12,060 (2x Q2; 4x Q3; 1x Q3), což svědčí jednak o rozsáhlé samostatné práci petentky a rovněž o jejím významném zapojení do skvěle pracujícího týmu jeho školitele.

Práce podrobně popisují zvířecí modely jaterních onemocnění a jejich využití v experimentální chirurgii, využití virtuální mikroskopie pro vývoj vzorkovacích postupů v kvantitativní histologii, stereologickou kvantifikaci drobných cév za použití poloautomatického hodnocení mikro-CT snímků korozivních odlitků řečiště jaterních cév, rozložení vaziva v prasečích játrech v závislosti na pohlaví, stereologickou studii délky a hustoty krevních a žlučových vlasečnic prasečích jater, pilotní studii experimentálního vytvoření sinusoidového obstrukčního syndromu prasečích jater, vliv podání mezenchymových kmenových buněk na délku přežití prasat s tímto syndromem po odstranění části jater a kvalitativní zhodnocení umělého poškození jater při nárazu.

Dizertační práce jako celek tvoří zároveň návod, jak takový výzkum sestavit, provést a úspěšně publikovat. Zároveň ukazuje směry, kam daná témata dále rozvíjet. Je přehledná a srozumitelná pro čtenáře, díky zevrubné dokumentaci přivádí čtenáře až do hloubky poznání práce se zvířecím modelem a přesto neopomíjí vytvoření morfologického i funkčního dojmu jako celku.

Použité histologické, imunohistochemické, statistické i technické metody jsou dobře zvolené vzhledem k vytyčeným cílům, které jsou splněny.

Po formální stránce je práce sepsána poměrně kvalitně a pečlivě. K práci nemám jako oponent žádnou zásadní připomínku.

- Autorka nesoudržně používá konzervativní a progresivní formu pravopisu (např. eosin, hepatitida, periferie, stroma, lysozomy, anestezie versus perfúze, cytoplazma, mechanismus).
- Formátování literatury neodpovídá bohužel české normě ČSN ISO 690 (01 0197) ani není důsledně uvedeno v jednom určeném mezinárodním bibliografickém formátu.
- Termín „mikrocéva“ by měl být objasněn. Termín „mikrocévní“ raději nahradit adjektivem „mikrovaskulární“. Termín „mezenchální“ je anglicismus a bylo by vhodnější použít český termín „mezenchymový“.

Drobné nedostatky jsou uvedeny níže:

- Strana 19, 3. odstavec: chybí čárka před „a tedy“
- Strana 20 a 21 – chybí latinský termín u termínů „interlobulární cévy“ a „jaterní sinusoidy“
- Strana 20 a 21 – nesoudržné použití termínu „sinusoidový“ a „sinusoidální“
- Strana 23 – použití eponyma „Heringovy kanálky“ by mělo být nahrazeno systémovým názvem
- Strana 23 – „dvou vývodu...které opouští“ – správně „opouštějí“
- Strana 26, Tabulka 1 – ve sloupci „Potkan“ je nesprávně anglický termín „middle“
- Strana 32 – termín „ballooned hepatocytes“ jako čistě anglický termín by měl mít alespoň české vysvětlení v závorce, lépe by bylo použít přednostně počestěný termín a anglický uvést do závorky
- Strana 32 – termín „cytoplazma“ na rozdíl od všech ostatních užití jako „cytoplazma“
- Strana 32 – „klasifikace dle Ishaka“ lépe jako „Ishakova klasifikace“ vzhledem k soudržnosti s bezprostředně předchozím termínem klasifikace
- Strana 38 – „parakaválná“ – správně „parakavální“
- Strana 39 – termín „intrahepatický“ je česky správnější, všude jinde však samostatně i ve složeninách použitý termín „-hepatální“ (anglicismus)
- Strana 41 a 43 – nesoudržné použití nevysvětlené zkratky „a.“ a „v.“
- Strana 56 – „hilus jater“ je nesprávný termín: zaprvé je správně „hilum“ (hilus je gramaticky zcela nevhodný anglicismus) a zadruhé játra mají branku zvanou „porta hepatis“
- Strana 57, Otázka 3 – chybí otazník

Tyto nedostatky nikterak nesnižují kvalitu práce a jedná se pouze o okrajové záležitosti, jejichž nápravu by bylo vhodné zohlednit při případné přípravě pro knižní publikaci.

Autorka splnila cíle vytyčené za začátků práce a její výsledky lze aplikovat do rutinní teoretické i klinické praxe.

Hodnocená práce odpovídá svým obsahem, rozsahem i zpracováním požadavkům kladeným na dizertační práci, je odpovídajícím způsobem seřazena a přináší původní výsledky. Autorka prokázala schopnost kvalitní samostatné činnosti v oblasti vědecké a výzkumné práce.

Otázky na autorku:

1. Máte zjištěno, kolikrát byly volně dostupná data a programy již použity jinými vědci?
2. Existují data o procentuálním zastoupení kolagenních, elastických a retikulárních vláken ve vazivu jater?
3. Jaká je četnost variability jaterních laloků Vámi zvoleného prasečího modelu a jaká u člověka?

V souladu s pravidly doktorského řízení doporučuji předloženou práci k obhajobě a v případě úspěšného obhájení udělit Anně Malečkové titul Philosophiae Doctor.

V Praze 30.7. 2022



Prof. MUDr. David Kachlík, PhD.
Ústav anatomie 2. LF UK
Praha, Česká Republika