

**Věc: Oponentní posudek na dizertační práci**

**MUDr. Aleš HOMOLA:**

**Difúzní parametry CNS u vybraných patologických stavů  
a buněčná terapie míšního poranění**

**Úvod.** Na základě schválení oborové rady doktorského studijního programu v **neurověděch** a žádosti doc. MUDr. O. Hrušáka, PhD, děkana 2. LF UK č.j. 114/08-IT ze dne 11. 7. 08 podávám na výše uvedenou práci následující posudek.

K hodnocení byla původně dodána svázaná práce o 159 s. a autoreferát o 26. s. Literatura byla alfabeticky uvedena na 16. s. Vzhledem ke gramatickým chybám a až 20% sekundárních citací neobsažených v literatuře, k minimálnímu počtu domácích citací a po osobních připomínkách 1. 8.08 byla práce upravena a dodána v rozsahu 163s.

Autor uvádí 7 publikací, kde je 1x prvním autorem, v časopisech s **vyšším IF**, s dosaženým skóre vyšším než 25.000 a dalších 22 prací charakteru abstrakt.

Práce má, jak již z názvu vyplývá, **dvě kapitoly a řeší dvě témata. První je převážně experimentální s názvem „Difúzní parametry CNS u vybraných patologických stavů. Druhé téma má klinický charakter s označením „Buněčná terapie míšního poranění.“** Oba celky mají stejné dělení na úvod, otázky a cíle, metodiku, výsledky, diskuze a závěry. Obě kapitoly mají společný souhrn.

**Ke kvalitě formálního zpracování.** Práce je psána jasným, dobře srozumitelným slohem s výstižnými formulacemi. Je logicky členěna. Dizertační práce obsahuje 12 tab. a 24 částečně barevných obrazů, mezi něž jsou řazeny i grafy. Grafická dokumentace činí práci ještě více přehlednou a srozumitelnou.

**K aktuálnosti řešeného tématu.** Je třeba se vyjádřit k oběma tématům.

**První díl dizertace** si položil za **cíl** studium změn difúzních parametrů extracelulárního prostoru (ECP) a energetického metabolismu během přechodné hypoxie a hypoxie/ischémie a studium ECP u gliových mozkových nádorů, zejména v závislosti na různém stupni malignity těchto nádorů. Práce si klade 6 dílčích podotázek.

Jedná se o vysoce aktuální téma, zabývající se dosud málo probádanou stránkou funkce a patologie CNS nejen z hlediska buněk a jejich výběžků, ale z hlediska dosud málo probádaného ECP a extracelulární matrix ( ECM ). Řešení uvedené problematiky u gliových, infiltrativních nádorů, patří mezi prioritní témata, která by mohla změnit pohled na onkogenezi a ovlivnit praktickou onkologii.

**Druhý díl dizertace** se zabývá **buněčnou terapií míšního poranění v klinice.** Práce si položila **tři cíle.** Zjistit, zda transplantace autologních kmenových buněk kostní dřeně je pro pacienty s poraněním míchy bezpečná a nevede ke komplikacím. Za druhé stanovit optimální časový interval pro transplantaci. Za třetí stanovit účinnost této terapie opakovaným vyšetřením implantovaných pacientů.

Vzhledem k tomu, že za celou dosavadní historii lidstva se přes heroické úsilí dosud žádnou metodou nepodařilo obnovit funkci „přerušené“ míchy, jedná se o řešení jednoho z nejaktuálnějších témat poranění CNS. Pozitivní řešení by znamenalo průlom do dosud platného poznatku, že v CNS u člověka neexistuje klinicky úspěšná funkční regenerace.

**K použitým metodám.**

**První díl dizertace** využívá k měření difúzních parametrů již dříve vypracovanou iontoforetickou metodu (1981), založenou na iontoforetické aplikaci iontů a měření jejich tkáňové koncentrace pomocí iontově-selektivní mikroelektrody. Metoda byla aplikována v experimentu a v klinické medicíně. Transientní hypoxie a hypoxie/ischémie byla studována na dospělých samcích potkana, difúzní parametry a stanovení molekul extracelulární matrix



(ECM) u gliomů bylo studováno na čerstvě resekované tkáni po 34 neurochirurgických operacích. Výsledky byly hodnoceny statisticky. Nálezy byly korelovány s WHO klasifikací mozkových nádorů. Z hlediska metody je třeba první díl práce vysoce ocenit, protože se mezi dosavadními publikacemi nejvíce blíží k určení uvedených parametrů za reálné situace in vivo.

**Druhý díl dizertace** využívá autologní mezenchymální kmenové buňky kostní dřeně (z lopaty kosti kyčelní) ke klinickému pokusu o obnovu nebo zlepšení funkce při různém stupni poranění míchy u člověka. Z hlediska vlastní techniky získání a aplikace kmenových buněk lze metodiku považovat za validní. Za problematičtější z hlediska položených otázek považují charakteristiku a metodiku hodnocení souboru. Byl analyzován soubor 33 pacientů s poraněním míchy v rozmezí C4 až L1 dle obratlů, ne míšních segmentů. V L1 se již nemusí jednat o čisté míšní poranění. Pacientka č.1 v tab. 9, hodnocená jako nejlepší motorické zlepšení, do souboru poranění míchy nejspíše nepatří. Buňky byly aplikovány dvěma cestami a to u většiny poraněných intravenózně do v. cubitalis a u 6 poraněných intraarteriálně do a. vertebralis. Všichni pacienti byli před aplikací léčeni „standardní chirurgickou léčbou „. Co je tím míněno? Před transplantací a pak za 3, 6 a 12 měsíců po implantaci byl u souboru stanoven stupeň poranění míchy dle Frankelovy stupnice a dle American Spinal Injury Association (ASIA) stupnice. Hodnocení bylo doplněno MRI (pouze před operací) a elektrofyziologicky. Klinické hodnocení stupně poranění míchy je největším metodickým problémem předložené studie, ale i všech dosud prováděných obdobných studií. Transplantace byla aplikována 1 – 510 dnů po míšním poranění. Tento údaj zpochybňuje možnost hodnocení skutečného významu transplantace. Všeobecně je známo, že stupeň poranění míchy, zvláště syndrom transversální míšní léze (A) je možno stanovit opakovaným vyšetřením až za 1 -2 týdny od vzniku. V práci je uvedeno datum transplantace, ale ne vyšetření, kterým byl stupeň určen patrně ještě dříve. Prakticky u všech pacientů s nižším stupněm poranění je navíc zlepšování přirozeným vývojem. U syndromu transverzální míšní léze nedojde spontánně k úpravě nikdy. Proto je dokonalé odlišení obou stavů základní metodickou podmínkou validity hodnocení léčebného významu transplantace kmenových buněk. Metodicky lze průkaz biologického významu transplantace pro obnovu funkce míchy prokázat na malém počtu pacientů jen tak, že dokonale stanovený syndrom transverzální míšní léze se změní na nižší stupeň léze. To však metodicky vylučuje časnou implantaci. V práci je uveden jediný pac. č 1, tab. 7, zlepšený z A, implantovaný 11. den, na B za 6 a 12 měsíců. Jak brzo po poranění byl syndrom stanoven? Nejedná se o chybnou předoperační klasifikaci? Ostatní údaje týkající se pacientů s částečným syndromem míšní léze se zlepšením klasifikace po intraarteriální implantaci a po včasější implantaci než u chronických pacientů, nejsou statisticky prokazatelné. Je obecně známo, že u částečných míšních syndromů dochází k zlepšování časně, zatímco v chronickém období (často kompenzačními mechanismy) již málo. Nálezy udávané v práci jako výsledky implantace nejspíše pouze kopírují přirozený vývoj neúplných míšních lézí. Tzv. kontrolní skupina 15. pacientů s poraněním míchy bez implantace a navíc s nevalidním určením stupně poranění, údajně při přijetí (bez určení doby od poranění), nemůže být metodicky žádnou kontrolní skupinou.

Pokud přistoupíme na relativně logickou teorii, že k implantaci kmenových buněk musí dojít co nejdříve po poranění, třeba do hodin, než dojde k sekundárním změnám autodestrukčním procesem a k vývoji gliózy, pak musíme metodicky rezignovat na možnost předoperačního určení stupně míšní léze. Metodicky by pro průkaz biologického léčebného významu implantace kmenových buněk mohlo svědčit to, že mezi dvěma jinak naprosto shodnými, náhodně vybranými soubory (lišícími se jen implantací) by byl zásadní rozdíl ve výsledcích. Např. že syndrom transverzální míšní léze (A) by se v souboru nevyskytoval, nebo ve statisticky významně nižším počtu. Klinicky vytvořit takové soubory je krajně



obtížné, ale jiná cesta není. Nerespektování výše uvedených metodických principů povede nejspíše jen k hromadění údajů, které nedovolí význam implantace kmenových buněk stanovit. Dokonce zastírá i jejich eventuální biologický efekt.

Samostatnou diskuzi by vyžadovala možnost jiné cesty implantace, např. přímo do léze. Netýká se však předložené práce.

### **K výsledkům práce.**

**První díl dizertace** týkající se transienční hypoxie a hypoxie/ischémie v experimentu a na druhé straně gliových, infiltrativních nádorů u člověka, přinesl celou řadu validních poznatků a konkrétních údajů, publikovatelných na mezinárodní úrovni, že je nelze všechny v posudku vyjmenovávat. Při transienční hypoxii/ischemii autor prokázal výrazné změny difúzních parametrů ECP, které se skoro nelišily od hodnot terminální anoxie. U pouhé transienční hypoxie byly změny menší a prokazatelné až ke konci ischemie. EC koncentrace glutamátu byla významně vyšší u transienční hypoxie/ischémie a korelovala s průběhem změn difúzních parametrů. U gliomů práce zjistila, že objemová komponenta ECP, vyjma oligodendrogliomů, byla signifikantně zvýšená. Zvětšení objemu ECP bylo přímo úměrné proliferativní aktivitě gliomů a hustotě nádorových buněk. Současně však dochází k přibývání difúzních překážek v ECP. Hlavním důvodem zvýšené tortuozity u agresivních astrocytomů nejsou výběžky buněk, ale nadměrná produkce glykoproteinů extracelulární matrix (ECM), hlavně tenascinu.

**Druhý díl dizertace**, týkající se implantace autologních kmenových buněk u pacientů s poraněním míchy vedl k průkazu prvního cíle dizertace. Práce prokázala, že intraarteriální a intravenózní aplikace kmenových buněk je pro pacienta bezpečná a nevede ke komplikacím. Druhé dva cíle, tj. stanovit optimální čas od poranění pro implantaci a stanovit účinnost terapie, práce vědecky validně stanovit nemohla. Vyplyvá to z metodických problémů hodnocení klinického souboru, jak uvádím výše. K morální cti autora je třeba přičíst, že dizertace to také přímo konstatuje. V dizertaci na str. 140 a v autoreferátu na str. 22 uvádí: „Pozorované zlepšení klinického stavu u některých pacientů však nemusí být způsobeno buněčnou terapií.“

### **Otázky.**

**K prvnímu tématu.** Domníváte se, že Vaše poznatky o difúzních parametrech u gliomů mohou již dnes přispět k praktické onkologii. V čem? Jak si představujete, že by se mohla snížit tortuozita nádorového ECP a umožnit tak větší účinnost chemoterapeutika?

**K druhému tématu.** Mícha je složitou morfologickou a funkční strukturou CNS s neurony, s ascendentními a descendentními a intersegmentárními drahami. V sedmdesátých a osmdesátých letech byl míšňí defekt překlenován autotransplantáty z kožních nervů (n. suralis). Při řešení defektů periferních a mozkových nervů se tato metoda stahu bez napětí stala revoluční metodou a dodnes je zlatým standardem. Viz. monografie E. Zvěřina, Stejskal L.: Poranění periferních nervů. Praha, Avicenum 1979. Při řešení poranění míchy se jednalo o biologickou naivitu nebo o vědomé klamání veřejnosti. Na Západě z komerčních důvodů to byl Kao, který prokazoval obnovu funkce u automobilového závodníka, na Východě z politické motivace Jumašov operoval řadu pacientů včetně naší zpěvačky Gombitové. Ani u jediného pacienta nemohlo a nedošlo k obnově funkce, proto jsme i přes nátlaky tyto operace odmítali. Experimentální práce opravňují k naději, že kmenové buňky mohou nahrazovat některé funkčně jednoduché tkáně, dokonce i tkáně organizované složitěji. Mohou se však strukturálně a funkčně organizovat tak, aby rekonstruovaly míšňí segment u člověka, jak se děje za embryogeneze?

Nejedná se při pouhé implantaci kmenových buněk do organismu (ať jakoukoliv cestou) o stejnou biologickou naivitu, jakou bylo použití nervových autotransplantátů, i když se tak děje na daleko vyšší úrovni?

Které neurony se musí obnovit a integrovat Wallerovými zákony své výběžky, aby došlo k rekonstrukci poškozeného míšního segmentu? Jsou lokalizovány v uvedeném segmentu nebo jinde a kde?

### **Z á v ě r .**

Práce vznikla na Ústavu neurověd 2. LF UK, na Ústavu experimentální medicíny AV ČR, na Spondylochirurgickém odd. a na Neurologické klinice 2. LF UK ve FN Motol. Pracoviště vedená světově uznávanými odborníky byla zárukou vysoké tematické a odborné úrovně předkládané neurovědní dizertace. Práce má charakter základního výzkumu s klinickou praktickou aplikací. Zabývá se dvěma tématy, z nichž již samo první téma, týkající se difúzních parametrů CNS u vybraných patologických stavů, by stačilo k obhajobě. Publikace autora a spoluautorů na řešené téma v časopisech s vysokým IF dokládají mezinárodní úroveň práce. Předložená dizertace a další charakteristiky autora prokazují jeho předpoklady k samostatné tvořivé vědecké práci a v souladu s platnou legislativou **opravňují MUDr. Aleše HOMOLU k udělení titulu Ph.D. za jménem.**

**V Praze dne 14. 8. 2008**

**Prof. MUDr. Eduard Z V Ě Ř I N A , DrSc.**