

Oponentský posudek doktorandské dizertační práce MUDr.Miroslavy Čedíkové: "Morfologie a funkční charakteristiky lidských gamet – možnosti klinického uplatnění."

Oponovaná práce MUDr.Miroslavy Čedíkové: "Morfologie a funkční charakteristiky lidských gamet - možnosti klinického uplatnění", byla vypracována v rámci postgraduálního doktorandského studia v oboru Anatomie, histologie a embryologie, pod vedením školitelky doc.MUDr.Mileny Králíčkové, Ph.D. a školitelky konzultantky doc.MUDr.Jitky Kuncové, Ph.D., na pracovišti Ústavu histologie a embryologie a Ústavu fyziologie Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Plzni. Vzorky pocházely z Institutu reprodukční medicíny a endokrinologie, IVF Zentren Prof.Zech-Pilsen.

Oponovaná práce má 102 stran vlastního textu včetně seznamu literatury. V 10 přílohách jsou připojeny původní práce doktorandky, publikované ve významných českých i zahraničních časopisech. V 6 publikacích je doktorandka uvedena jako první autor. Samostatnou přílohu potom tvoří seznam prací, které jsou vzdálenější problematice dizertační práce, některé opět s prvoautorstvím doktorandky.

Práce obsahuje souhrnný úvod, cíle práce, popis použitého materiálu a metodiky, souhrn výsledků s diskuzí a formulace závěrů vztažených k jednotlivým cílům s výhledem na praktické využití získaných výsledků.

Můj komentář a doplňující otázky k jednotlivým částem práce jsou vždy uvedeny v závěru jednotlivých odstavců, ve kterých se vyjadřuji k práci po formální a faktické stránce (viz. podtržený text).

Práce je členěna velmi systematicky a přehledně, je psána srozumitelně. Progresivní pravopis je použit jednotně v celém textu. Užitečný je i připojený seznam zkratk. Připojené grafy a tabulky jsou srozumitelné a názorné. Seznam literatury je zpracovaný jednotně.

Úvod práce shrnuje zásadní kroky v gametogenezi a v přehledu představuje markery, které se v současnosti používají ke zhodnocení kvality lidských gamet. V přímé návaznosti jsou potom formulovány celkem 4 cíle práce, které jsou zaměřeny na hledání dalších spolehlivých a neinvazivních markerů normálního vývoje gamet, které by vyplnily mezery v dosavadní možnosti v oboru asistované reprodukce anebo by stávající metody identifikující kvalitu gamet vhodně doplnily. Metodická část práce včetně statistického vyhodnocení výsledků je silnou stránkou dizertační práce.

V případě oogeneze byly porovnávány hladiny prolaktinu, T3 a T4, homocysteinu, glutathionperoxidázy, malonyldialdehydu a celkové antioxidační kapacity ve folikulární tekutině. Sledované hormony a marker oxidačního stresu byly porovnávány mezi 72 pacientkami léčenými pro neplodnost a stejně velkou kontrolní skupinou zdravých žen. Výsledky byly korelovány dle věku pacientek a jako statisticky nejvýznamnější se ukázaly rozdílné hladiny prolaktinu. Tento náález naznačuje jednoznačně významnou roli prolaktinu pro regulaci oogeneze. Další signifikantně rozdílné byly hladiny markerů oxidačního stresu, homocysteinu a hormony štítné žlázy. Nálezy se zde však lišily v závislosti na věkových skupinách žen ve sledovaných souborech. Nicméně tyto rozdílné nálezy hormonů a markerů

oxidačního stresu jsou ve folikulární tekutině stanovovány poprvé. Rovněž je poprvé sledována jejich korelace s regulací oogenezy uvnitř folikulu. Uvažíme-li, že folikulární tekutina představuje charakteristické a nezastupitelné mikroprostředí pro vývoj oocyty, bylo by zajímavé sledovat, jakými mechanismy se podílí folikulární bariéra na konkrétním složení folikulární tekutiny. Například, zda existuje korelace mezi hladinami sledovaných markerů v krvi a ve folikulární tekutině. Význam tohoto vztahu autorka uvažuje v případě volného T4. V práci je zmiňován pouze blíže nespecifikovaný transport a sekreční aktivita buněk théky a granulózy jako mechanismus produkce folikulární tekutiny. V literatuře je velmi málo dostupných dat k tomuto tématu. Tato doplňující otázka je spíše úvaha o patofyziologickém mechanismu přestupu složek krevní plazmy přes folikulární bariéru, který se však odrazí v rozdílném složení folikulární tekutiny a ovlivní vývoj oocyty.

Dalším cílem bylo zjistit roli nadváhy na úspěšnost otěhotnění. BMI byl porovnán s hladinami vybraných hormonů a markerů oxidačního stresu, ze kterých pouze vyšší hladina volného T3 a nižší hladina GPx korelovala s vyšším BMI. Naopak BMI hodnocený samotný ve sledovaných souborech (n=32) neměl na úspěšnost početí vliv. Ve sledovaném souboru pouze 7/44 pacientek mělo vyšší BMI. Soubor pacientek není dostatečně velký pro zodpovědné posouzení sledovaných korelací BMI : vybrané markery folikulární tekutiny : úspěšnost početí.

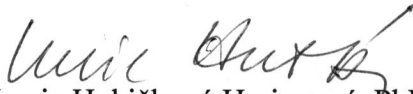
Následující část práce se soustředí na hodnocení kvality spermií. Mužská neplodnost tvoří 50% celkového počtu neplodností, v 25% zůstává příčina neznáma. Spermioqram jako metoda volby v určení počáteční příčiny mužské neplodnosti neodhalí funkční defekty spermií. Autorka se zaměřila na hodnocení mitochondriální respirace umožňující posoudit funkční stav celých mitochondrií. Měření byla prováděna pomocí dvoukanálového oxygrafu Oroboros O2k. V druhé fázi byl hodnocen účinek propolisu na respirační funkce mitochondrií přidáním ethanolového roztoku propolisu ve vzestupné dávce. Byly porovnávány 2 soubory normozoospermatiků a asthenozoospermatiků (n=7). Výsledky potvrdily sníženou aktivitu komplexu I u asthenozoospermatiků a naznačily pravděpodobný vliv zvýšeného úniku protonů z mitochondriální matrix, který vede ke snížení oxidativní fosforylace a tím snižuje motilitu. Hodnocení účinku českého propolisu a jeho účinku na mitochondriální funkci je unikátní část nejen doktorandské práce, ale jedná se o první studii zabývající se vlivem českého propolisu na mitochondriální funkce pohlavních buněk, resp. spermií vůbec. Výsledky pocházející z měření 10 ejakulátů od dobrovolníků ukázaly zlepšení celkové respirační efektivity in vitro s potenciálním zlepšením motility spermií. Využití respirometrie k identifikaci porušeného mitochondriálního dýchání jistě může přispět k diagnostice asthenozoospermie. Výsledky této části práce jsou příslibem ke zkvalitnění diagnostiky spermií, jistým omezením je však malý počet vyšetřených vzorků. Doplňující otázka spíše do diskuse, pro představu: jak je reálné zavedení hodnocení mitochondriální respirace na oxygrafu Oroboros O2k do panelu markerů ke zhodnocení kvality spermií? Je oxygraf běžným přístrojem na klinických pracovištích? 2. Byla zaznamenána korelace mezi spermiemi s fragmentovanou DNA a porušeným mitochondriálním dýcháním?

Výsledky celé práce výrazně přispívají k řešení otázek či zadání, které si autorka v úvodu práce položila: a sice naznačují další možnosti zkvalitnění diagnostiky příčin lidské neplodnosti rozšířením panelu markerů pro sledování kvality lidských gamet.

Závěrem mohu konstatovat, že doktorandská dizertační práce MUDr. Miroslavy Čedíkové: "Morfologie a funkční charakteristiky lidských gamet- možnosti klinického uplatnění" je výsledkem svědomité, pečlivé a systematické vědecké práce s praktickým využitím. Autorka řeší důležitou aktuální tematiku a prokazuje vysokou profesionalitu vědeckého pracovníka. Objektivním dokladem tohoto tvrzení je i rozsáhlý soubor publikovaných prací na dané téma, které jsou součástí předkládané práce.

Jistě a ráda doporučuji doktorandskou dizertační práci k obhajobě a aby se práce stala základem pro udělení příslušné postgraduální hodnosti.

Praha, 5. září, 2014


MUDr. Lucie Hubičková Heringová, PhD.