Prof. MUDr. Otomar Kittnar, CSc., MBA v.r.
Předseda OR studijního programu
Fyziologie a patologie člověka
Oddělení administrativy vědy a výzkumu 3.LF UK
Ruská 87/2411
100 00 Praha 10

Oponentský posudek disertační práce Mgr.Vojtěcha Pavlíka

Po vyzvání pana prof. MUDr. Otomara Kittnara, CSc., MBA, předsedy OR studijního programu Fyziologie a patofyziologie člověka, přípisem ze dne 20.1.2022, jsem prostudovala dizertační práci Mgr. Vojtěcha Pavlíka, studenta 3.LF UK doktorského studia ve studijním programu Fyziologie a patofyziologie člověka na téma „Antimikrobiální, cytotoxické a antiproteinázové vlastnosti stříbra používaného pro léčbu chronických infikovaných ran" a vypracovala následující oponentský posudek.

Aktuálnost tématu

Téma výše uvedené doktorandské dizertační práce je mimořádně aktuální, neboť chronickým, nehojícím se ranám dolních končetin donedávna nebyla věnována dostatečná pozornost a často představovaly „crux medicorum". Teprve v posledních dvou desetiletích se v řadě oborů, dostávají do popředí zájmu také nemocní s různými typy ran – akutními, chronickými, komplikovanými a nezhojitelnými. Zcela jistě se na této skutečnosti podílí nové léčebné prostředky, metody s ošetřováním ran spojenými a vědomosti o patofyziologii hojení chronických ran. Jsou poznávány složité regulační mechanizmy, vztahy mezi jednotlivými buňkami a růstovými faktory, které se při hojení ran uplatňují. Přesto léčba těchto ran je dlouhodobá, často spojená s nemalými náklady vynaloženými na jejich léčbu. Jednou z příčin protrahovaného hojení je infekce ran, která podporuje zánětlivou fázi hojení a brání dalšímu postupu hojení.
Z těchto důvodů se autor dizertační práce zaměřil na léčbu infikovaných chronických ran vybranými antiseptickými prostředky, zejména s obsahem stříbra, na jeho antimikrobiální, cytotoxické a antiproteinázové vlastnosti a srovnávání jeho účinku s dalšími vybranými antiseptiky.

Předložená dizertační práce má celkem 115 stran formátu A4, pevně svázaných v jeden celek. Patřičnou ucelenost dodává práci řada barevných dokumentačních obrázků, velmi kvalitně zhotovených grafů a přehledných tabulek, které zvyšují její hodnotu. Významnou částí práce je literatura s přebohatými citacemi, ze kterých autor čerpal cenné poznatky a názory. Součástí dizertační práce je příloha publikovaných prací v českých a zahraničních časopisech, vztahujících se k této problematice a seznam přednášek a posterů na tuzemských a zahraničních kongresech.

Prvních 17 stran představuje literární úvod, kde se autor zaměřuje především na patologické změny v hojení chronických ran, na odlišnost hojení v jednotlivých fázích hojení od ran

akutních, zejména ve fázi zánětu. Poukazuje na to, že významnou roli zde sehrávají neutrofily a makrofágy, jejichž aktivací dochází k sekreci cytokinů, prozánětlivých mediátorů a matrix metaloproteináz. Zvýšená aktivita proteináz produkovaných pacientovými buňkami, je u infekčních ran, potencovaná produkcí proteináz bakteriemi. Nadměrná hladina proteináz degraduje fibronektin, základní substance při remodelování ECM. Do hojivého procesu negativně zasahuje zvýšená hladina kyslíkových radikálů, následkem oxidačního stresu dochází k poškození DNA buněk a ke zpomalení hojivého procesu.
Dalším komplikujícím faktorem hojení, jsou bakteriální infekce. V souvislosti s léčbou infekce, popisuje vybraná antiseptika používaná v léčbě chronických ran a zaměřuje se především na vlastnosti stříbra, na jeho pozitivní i negativní účinky.

Poznatky o odchylném hojení chronických ran a léčba ranné infekce nejčastěji používanými antiseptiky, zejména stříbra, obsaženého v krycích prostředcích pro hojení ran, se staly podkladem pro experimentální práci a studii na lidské populaci. V experimentech in vitro, ex vivo a in vivo ex vivo byly srovnávány efekty 4 komerčně dostupných krytů se stříbrem (Aquacel Ag+Hdyrofiber, Acticoat, Ialugen a Silvercel) a jejich účinnost porovnávána s ostatními antiseptiky.

Cíl dizeratční práce a jeho splnění
Cílem dizertační práce bylo ověření 3 stanovených hypotéz:
První hypotéza byla zaměřena na sledování antimikrobiálního a cytotoxického účinku stříbra a sledování cytotoxicity stříbra v závislosti na jeho antimikrobiální účinnosti. Dalším cílem této hypotézy bylo ověření, zda stříbro proniká do dermis a jestli zde dochází k cytotoxickým efektům.
V testech in vitro difuzní metodou na krevním agaru se potvrdila hypotéza antimikrobiálního účinku sledovaných krytí se stříbrem vůči nejčastěji sledovaným patogenům - Staphylococcus aureus a Pseudomonas aeruginosa. Nejvyšší účinnost vykazoval Aquacel Ag+. Stejně se potvrdila cytotoxicita stříbra vůči dermálním fibroblastům a lidské linii keratinocytů in vitro, se statistickou významností. Opět na prvním místě Aquacel Ag+.
V rámci druhého cíle první hypotézy bylo prokázáno na explanátech prasečí kůže, že stříbro proniká do dermis, kde způsobuje poškození DNA a stresovou odpověď, se zvýšením genové exprese. Stříbro pronikalo do dermis ze všech 4 krytů, nejvyšš signál vykazoval Ialugen.
Druhá hypotéza byla orientována na sledování rozdílu v hojení chronické rány léčené z části krytem se stříbrem a z části krytem s octenidinem. Cílem, vycházejícím z této hypotézy, bylo určení distribuce stříbra v chronické ráně v průběhu hojení a sledování základních parametrů hojení a porovnání rozdílů pod těmito kryty.
Na kůži v experimentech ex vivo byla sledována distribuce stříbra a hojení ran makroskopicky, histologicky a genová exprese vybraných markerů. Stříbro z krytu Aguacel Ag+ pronikako do ran, kde bylo detekováno v makrofázích a v mezibuněčné hmotě.
Podobně v následujícím kroku, pozorováním in vivo na pacientech s bércovým vředem, bylo sledováno pronikání stříbra (použit Aquacel Ag+) do kůže v bioptických vzorcích, odebíraných po 2 a 6-ti týdnech léčby. Distribuce stříbra byla prokázána hluboko v granulační tkáni a stříbro bylo současně detekováno v makrofázích a ve fagocytech.

Při srovnávání sledovaných zánětlivých parametrů při hojení rány v částech léčených Aquacel Ag+ a krytím Sorelex (octenidin a hyaluronan), byl zaznamenán statisticky významně vyšší signál CD68 v ranách léčených OCT-HA, taktéž v ranách léčených tímto antiseptikem byl již po 2 týdnech pozorován významný pokles granulocytů.
Při sledování parametrů hojení rány pomocí histologie, ukázalo se, že v místech s krytím OCT-HA už po 2 týdnech probíhá hojení rychleji nežli u Aquacelu Ag+ a při hodnocení povlaků, byla místa kryta Aquacelem Ag+ po 2 týdnech sledování, významně více povleklá.
Třetí hypotéza byla zaměřena na efektivitu stříbra v úloze snižování aktivity proteáz, relevantních pro hojení ran. Kromě proteáz produkovaných pacientovými buňkám, přispívají k proteolytické aktivitě bakteriální proteázy a tím k degradaci nově tvořící se granulační tkáně. Cílem této hypotézy bylo určení aktivity lidských a bakteriálních proteáz, přítomnost stříbra a jiných antiseptických prostředků in vitro a současně zjistit, zda stříbro může inhibovat endogenní proteázy v kůži iex vivo.
V in vitro experimentech byla sledována inhibice aktivity savčích a bakteriálních proteáz u čtyř vybraných antiseptik – povidon jodu (PVP-I), laktátu stříbrného (Ag), chlorhexidinu (CHL) a octenidindihydrochloridu (Oct). Potvrdilo se, že tyto látky inhibovaly eukaryotické proteinázy více než bakteriální. Aktivita lidských proteináz byla inhibována v závislostech na dávce. PVP-1 a Oct dosáhly statistiky významného snížení proteinázové aktivity v nejvyšších koncentracích, nicméně ředění PVP-I dramaticky snižovalo jeho proteinázovou aktivitu. Oct i Ag statisticky významně inhibovaly eukaryotické proteinázy ve všech sledovaných koncentracích.
Vliv stříbra na aktivitu eukaryotických a prokaryotických proteináz byl sledován ex vivo na modelu prasečí kůže a bylo potvrzeno, že Oct a Ag a Chl inhibují endogenní proteázy prasečí kůže. PVPO-I měl účinnou inhibici pouze ve 100% koncentraci, zatímco 10% koncentrace použita v gelu účinnost prokázaly.

Materiál a metodika
K realizaci stanovených cílů použil autor četné metody prováděné in vitro, ex vivo na prasečí kůži a in vivo u souboru pacientů lidské populace. Materiál pro jednotlivé metody byl náležitě zpracován a připraven pro použití jednotlivých metod, mnohdy ne zcela běžně prováděných. Zvolené metody zpracování odpovídají stanoveným cílům dizertační práce a patří mezi moderní postupy, umožňující hodnocení sledovaných parametrů včetně statistického zpracování výsledků. K hodnocení výsledků autor přistupuje kriticky se snahou k maximální objektivizaci.

Závěr:
Předložená dizertační práce je svou problematikou vysoce aktuální. Závěry práce jsou mnohostranné, výsledky výzkumu rozšířily vědecké poznatky o problematice léčby a hojení chronických ran, o pozitivním efektu i vedlejších účincích antiseptik a mohou se uplatnit v každodenní praxi. Taktéž se mohou stát námětem pro další výzkum.
Teoretická i experimentální část je zpracovaná na vysoké odborné úrovni, což svědčí o tom, že autor pronikl hluboko do dané problematiky. Jazykově i stylisticky je práce čistá, jasně srozumitelná, přehledná, bez formálních nedostatků.

Autor dizertační práce splnil stanovené cíle. Prokázal, že je způsobilý pro tvůrčí vědeckou práci, má hluboké teoretické vědomosti v dané oblasti a prokázal, že je schopen samostatné vědecké práce. Proto navrhuji, aby podle paragrafu 47 VŠ 111/98 sb. O doktorandském studiu, Mgr. Vojtěchu Pavlíkovi, byla udělena hodnost Ph.D.

Brno 28.2.2022

Prof. MUDr. Alena Pospíšilová, CSc.
Dermatovenerologické oddělení FN Brno