

Prof. MUDr., RNDr Jaroslav Slípka, DrSc
Ústav histologie a embryologie LF UK v Plzni

OPONENTSKÝ POSUDEK

doktorské disertační práce MUDr. Petra Uhra: “ Možnosti a význam prodloužené kultivace embryí“

Doktorská disertační práce MUDr. Petra Uhra: “ Možnosti a význam prodloužené kultivace embryí“ byla vypracována v rámci doktorandského studijního programu Gynekologicko-porodnické kliniky Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Plzni pod vedením školitele Doc.MUDr. Zdeňka Rokyty, CSc.

Disertace byla předložena ve formě vázaného svazku o 124 stranách, z nichž 81 stran tvoří vlastní textovou část, k níž je připojeno 6 příloh, obsahujících kopie vědeckých publikací, v nichž je dr.Uher autorem nebo spoluautorem.

Autor si po krátkém úvodu stanovuje cíle své práce : v rámci současných technik asistované reprodukce potvrdit výhody a vhodnost prodloužené kultivace embryí do stadia blastocysty při využití výsledků vlastního výzkumu a mnohaletých zkušeností s preimplantační diagnostikou a genetickou analýsou, jakož i s kultivací embryonálních kmenových buněk.

První část práce shrnuje současné poznatky o vývoji embrya od stadia oocyty přes zygotu k blastocystě a k následné implantaci. Dále se autor zabývá významem a využitím prodloužené kultivace a otázkami selekce embryí a analýsou kultivačních medií, preimplantační genetikou a diagnostikou a otázkami derivace embryonálních kmenových buněk.

Druhá část práce je věnována výsledkům vlastního výzkumu a je rozdělena do čtyřech tématických okruhů.

Autor nejprve uvádí výsledky studia interakcí embryonálních a hematopoetických kmenových buněk. O snahách optimalisovat podmínky jejich kultivace. Popisuje detekci markeru CD 34 metodou průtokové cytometrie, kokultivační metodu a imunocytochemickou metodu kontroly diferenciací. Diskutuje o problémech rozdílných vlastností kmenových buněk u různých druhů savců.

Autor dále odpovídá na svoji otázku, zda jsou třídenní zárodky podle morfologických kritérií vhodné k transferu a uvádí své zkušenosti z genetického vyšetření 470 pacientek a 30 vyšetření sedmi signifikantních chromosomů – shoda mezi tří a pětidenními embryi byla 34%. Studie prokázala větší pravděpodobnost otěhotnění při vyšším počtu získaných vajíček a poukázala na problémy morfologického výběru embrya ve třetím dni a výhodu prodloužené kultivace.

V další části se autor zabývá přínosem kultivace, prodloužené do stadia blastocysty. Ve sledovaném souboru byly ženy vyššího věku a bylo dosaženo 30% úspěšnosti proti 15%

v německých statistikách a při menším počtu transferovaných embryí a tím snížení počtu vícečetných těhotenství. Autor tím potvrdil přednosti a vhodnost této prodloužené kultivace. Za velmi významné považuje oponent výsledky studia o zvyšování efektivity a spolehlivosti preimplantačního genetického screeningu metodou rehybridisace pomocí subtelomerických sond. Autor zde hodnotí přínos třetího kola hybridizace u nejasných výsledků předchozí analýsy. Uvádí výsledky analýsy u 702 embryí z nichž vyplývá strategie, zahrnující v prvním kole hybridizace pět chromosomů (X,Y,13,18,21) a v druhém kole dvou chromosomů 16 a 22). U nerepresentativních výsledků doporučuje autor rehybridisaci, která objasňuje kolem 95% nejasných případů.

V kapitole „Závěry pro praxi a výhled do budoucna“ zdůrazňuje autor, že transfer embrya ve stadiu blastocytu zvyšuje efektivitu léčby neplodnosti, zvláště u žen vyššího věku. Je také časově výhodný pro provádění genetické analýsy a pro úpravu kultivačních medií a je tedy bezesporu přínosem pro studium mechanismů buněčné pluripotence a diferenciaci,

Autor ovšem také správně upozorňuje na možné vedlejší účinky prodloužené kultivace k nimž patří vlivy epigenetické, a problematické možné vlivy prodlouženého pobytu v kultivačním mediu event. možný vliv na dysbalanci pohlaví embryí. Autor se závěrem zamýšlí nad slibným rozvojem moderních biochemických metod, které mohou přispět k neinvazivnímu stanovení viability embryí a povedou k technice „life cell monitoring“, která umožní detailnější poznání zákonitostí časného vývoje zárodku.

Kapitola „Literatura“ obsahuje imponující seznam více než 200 citací nejmodernějšího písemnictví, většinou citovaného také v textu disertace. Je pochopitelné, že v tak mladém oboru, jakým je asistovaná reprodukce, jsou studovány a citovány práce kolem přelomu tisíciletí a to hlavně anglická literatura. Přesto se oponent domnívá, že by pro lepší pochopení vývoje současného stavu, bylo vhodné uvést i citace klasických prací z druhé poloviny 20. století. V tak důležitém spise českého autora bych také očekával více citací českých prací.

V závěru disertace zařadil autor dokumentaci ve formě tabulek, schemat a obrázků. Jde celkem o 13 stran obrazového materiálu, graficky bezvadného a odpovídajícího na odkazy v textu. Vynikající a originální je perfektní fotografická dokumentace časných embryí v různých stádiích vývoje až po stadium blastocystové.

Souhrn výsledků celého díla je zařazen ve formě českého a anglického abstraktu na samý počátek celého spisu.

Samostatnou část disertace tvoří „Přílohy“, obsahující kompletní kopie šesti vědeckých publikací, v nichž je dr. Uher třikrát prvním autorem, u ostatních tří spoluautorem. Čtyři práce vyšly jako špičkové publikace s celkovým impakt faktorem kolem IF-9 a byly často citovány v odborném tisku. Tématicky jde zejména o práci, dokládající důležitost rehybridisace u nejasných výsledků použitím telomerických sond, dále o práci o selekci vhodných spermií, o možnostech dediferenciaci dospělých kmenových buněk kokultivačním systémem a práce o mutaci leukemického inhibičního faktoru u sterilních žen.

Všechny tyto publikace, řešící významnou velice aktuální problematiku vyšly v prestižních a serosních časopisech, kde prošly přísným oponentním řízením, a proto k nim nemá recenzent žádný kritický komentář, jen poděkování za vzornou reprezentaci naší vědy.

Tolik tedy k výsledkům předložené disertace. Není nejmenších pochyb, že předložená disertace řeší vysoce závažnou a aktuální problematiku asistované reprodukce. V době explozivního vývoje této problematiky dostává celá práce charakter nejen značného významu pro klinickou praxi, ale i značného významu obecně biologického, protože řeší nejširší možný okruh otázek od morfologických po molekulárně imunologické a dokonce etické. Celou širokou problematiku řeší sofistikovanými metodikami, v klasické morfologii ojedinělými.

Je nespornou zásluhou autora, že dokázal perfektně skloubit svůj široký zájem o otázky klinické s moderním pojetím molekulárně biologickým a že tak mohl dojít k řadě prioritních nálezů. Práce jako celek se tak stává důstojným příspěvkem k mezinárodně uznávaným úspěchům české biomedicíny a zasloužila by si překlad do cizího jazyka.

Je ovšem jen přirozené, že čtenáře celého díla napadá řada doplňujících poznámek a otázek k výsledkům autorova výzkumu. Dovoluji si uvést některé:

První poznámku jsem uvedl výše už při komentáři k seznamu písemnictví a přimlouvám se o jeho rozšíření o práce klasické a o práce českých autorů. Druhá poznámka je spíše terminologického charakteru a týká se poněkud rozdílného pohledu na časnou embryogenezu člověka v pojetí klasických embryologů. V disertaci se totiž neobjevuje termín morula, tedy tří- až čtyřdenní stadium rozrýhovaných blastomer, z něhož kavitací a postupným mizením zony pellucidy se vyvíjí (nehezky autorův anglismus "hatchuje") blastocysta s periferním cytotrofoblastem (trofoektodemem) a vnitřním embryoblastem. Je možné toto pojetí upřesnit?

Další poznámka se týká epigenetické problematiky buněčných interakcí. Souhlasím s autorem, že při prodloužené kultivaci dochází ke stále komplikovanějším epigenetickým vztahům mezi jádrem a cytoplasmou blastomer. Jsou nějaké zkušenosti např. s transferem cytoplasmy mezi různými stadii blastomer?

Uvedené poznámky nejsou v žádném případě míněny kriticky, ale mají jen usměrnit diskusi nad vynikajícím dílem a přispět námětově k dalšímu bádání autora. Po stránce obsahové nelze totiž disertaci vytýkat nějaké chyby v interpretaci jeho studia – konečně řada dílčích výsledků byla přednesena na odborných sjezdech a jeho zásadní práce byly publikovány v seriosních impaktovaných časopisech, kde prošla recensním řízením odborníků. Z našeho krátkého výčtu výsledků a poznámek také nevyplývá, kolik mravenčí práce autor musel vynaložit, aby v záplavě stovek preparátů a experimentů dospěl k předloženým závěrům. Práce je psána s precizní pečlivostí a dobrou češtinou. a stane se zcela určitě základnou pro další studium této závažné problematiky nejen autora, ale dalších badatelů.

Závěr

Předložená doktorská disertační práce disertační práce MUDr. Petra Uhra: "Možnosti a význam prodloužené kultivace embryí" je významné dílo, které značně rozšiřuje naše dosavadní znalosti zkoumané a vysoce aktuální problematiky a je tedy důležité nejen z hlediska klinického, ale i obecně biologického a pro svůj etický dopad i humanitárního. Autor prokázal schopnost k samostatné vědecké práci, která mu umožnila dosáhnout řady prioritních výsledků a obohatit tak nejen naši, ale i světovou odbornou literaturu. Z těchto důvodů oponent doporučuje přijmout předloženou disertaci a po její obhajobě navrhuje udělit vědecko-akademickou hodnost „philosophiae doctor“ (PhD).

V Plzni dne 28.6..2011

Prof. MUDr., RNDr. Jaroslav Slípka, DrSc
Ústav histologie a embryologie LF UK v Plzni