

Oponentský posudek.

Disertační práce

Identifikace nových biomarkerů a cílových molekul pro komplexní léčbu (drug target) pomocí proteomické analýzy tělních tekutin a tkání. Experimentální studie.

Autor: MUDr Jiří Fremuth

K oponentuře byla předložena disertační práce, která byla vypracována MUDr Jiřím Fremuthem v rámci Doktorského studijního programu pediatrie na Lékařské fakultě UK v Plzni. Práce má název: Identifikace nových biomarkerů a cílových molekul pro komplexní léčbu (drug target) pomocí proteomické analýzy tělních tekutin a tkání. Experimentální studie.

Formální data disertace:

Práce má tradiční strukturu. Samotný text včetně Souhrnu česky a anglicky má 64 stran, v textu je zakomponováno : 15 obrázků a 22 tabulek, seznam zkratk a poděkování . Text je doplněn 92 citacemi (bez autocitací), seznamem vlastních publikací (3 články v impaktovaných časopisech – v žádném není dr Fremuth jako první autor, 8 článků v neimpaktovaných časopisech- v 1 je disertant prvním autorem, dále je seznam přednášek a posterů většinou se spoluautorstvím),

V textu je minimum nevýznamných překlepů, některá slova jsou psána různě (surfactant-surfaktant.. iodem- jodid..., perfúze – dáva slovu jiný význam). Některá slova jsou uvedena dvojjazyčně, což je v takovém textu zbytečné a ne vždy jde o český termín pro anglické slovo, např. na str. 11 ...mechanotransdukce (mechanotransduction)... Za závažnější terminologickou chybu považuji opakující se (str. 58 a 61) formulaci „...znamená v každém případě zásah do *homeopatie organismu*... “. Oponent soudí, že autor má na mysli *homeostázu* nikoliv homeopatii.

Zavádějící chybu označení skupiny A experimentálních zvířat na str. 52 oponent konzultoval s autorem a ten přiznal překlep- jde o skupinu B (skupina A v práci není).

Celkově práce působí úhledným dojmem,

Popis disertační práce :

První dvě kapitoly obsahují úvodní slovo a současný stav problematiky. Autor nejprve zdůvodňuje, proč se rozhodl hledat vysvětlení pro některé negativní vlivy umělé plicní ventilace (UPV). Po vysvětlení základních pojmů se věnuje dosavadním poznatkům o mechanismu vzniku edému při ventilátorem indukovaném plicním postižení (VILI), biofyzikálním faktorům vedoucím k VILI, samostatně vykládá problém buněčného poškození a stavu extracelulární matrix při VILI. V závěru této části srozumitelně popisuje složitý fenomén mechanotransdukce a biotraumatu, účast transkripčních faktorů a cytokinové sítě v indukci zánětlivých a proliferačních změn v plicích při UPV.

Cíle studie byly:

Vytvořit klinicky relevantní experimentální zvířecí model, simulující rozdílnou strategii UPV zdravých a poškozených plic a její vliv na plicní a mimoplicní systémy.

U experimentálních zvířat potom zkoumat vliv UPV a plicního poškození na plicní mechaniku a výměnu plynů, na funkci jater a ledvin, na cirkulaci, rozvoj imunitní a systémové zánětlivé odpovědi a zhodnotit morfologické orgánové změny .

Metodika studie

Experimentálním zvířetem byla selata prasete domácího ve stáří průměrně 7 týdnů. Náhodným výběrem byla zvířata rozdělena do 3 skupin pro různé typy UPV (protektivní u zdravých plic, neprotektivní u zdravých plic, neprojektivní u poškozených plic). Monitorace zvířat a parametry laboratorní byly prováděny jednak přístrojově a jednak výpočty podle protokolu, který byl schválen etickou komisí..

Statistické metody byly standardní pro podobný typ experimentu.

Do studie bylo zahrnuto celkem 52 selat, 14 z nich uhynulo před ukončením experimentu (nejvíce u selat s projektivní UPV u zdravých plic) .

Výsledky podle jednotlivých cílů.

Změřené a vypočtené hodnoty jednotlivých fází experimentů jsou uváděny v tabulkách se statistickým zhodnocením, k tabulkám je připojen krátký komentář. Morfologické změny jsou dokumentovány obrázky s popisy. Je na škodu práce, že výsledky nejsou znázorněny i ve grafech.

Prvním cílem bylo zhodnocení vlivu 2 odlišných strategií UPV u zdravých plic a plic poškozených na respirační funkci a plicní mechaniku. Bylo potvrzeno, že neprojektivní ventilace zhoršuje oxemii a ventilační indexy a toto vše je potencionáno u poškozených plic. Ve druhém cíli byl posuzován vliv UPV na funkci mimoplicních systémů- jater, ledvin a vnitřní prostředí. Ukázalo se, že hlavní dopad UPV byl na aktivaci renin- angiotenzin-aldosteronový systém a následně i zvýšení hladin urey a kreatininu.

Vliv UPV na cirkulaci a rozvoj SIRS byl třetím cílem. K cirkulačním změnám zvolené typy UPV a poškození plic nevedly. U všech zvířat ale byl patrný vzestup IL 6, nejvíce u neprojektivní UPV při poškozené plíci. Podle autora překvapivě klesla u všech skupin hladina TNF- α ..

Morfologické změny makro-, mikro-skopické plic a mimoplicních orgánů při UPV byl 4.cíl. Významné změny byly jen u plic ventilovaných neprojektivně.

Diskuse a závěry.

V diskusi se autor stručně vrací k jednotlivým cílům disertace a srovnává získané vlastní výsledky s publikacemi. V závěru diskuse se na str. 57 částečně vyjadřuje k tomu, že v názvu anoncovaná proteomická analýza nebyla v experimentu provedena. Nicméně práce dovoluje závěr:

Přechod ze spontánního dýchání na invazivní UPV znamená v každém případě zásah do homeostázy organismu. Protektivní režimy UPV nejsou zárukou zachování fyziologických procesů v plicní tkáni, ale garantují nezměněnou funkci a morfologii mimoplicních orgánů a systému. UPV $V_t=10\text{ml/kg}$ nesplňuje kritéria pro označení protektivní ventilace.

Požadované vyjádření oponenta:

a. Úskalí umělé plicní ventilace jako léčebné metody řešící poruchu významné vitální funkce je v poslední době postupně odhalováno do detailů, které umožňují nové technologie. Patří k nim i proteomické analýzy. Oponent proto se zájmem převzal práci dr Fremutha, která si v názvu kladla tento ambiciózní cíl. Po prostudování předložené disertace ale s jistým zklamáním konstatuji, že právě proteomické analýzy nebyly dosažitelné. Nevím proto, proč to nebylo zohledněno v názvu práce. Práce se ale zabývá nežádoucími vlivy UPV na plicní funkce i morfologii, analyzuje některé dopady na indukci orgánových změn mimoplicních

včetně cytokiny spouštěné zánětlivé reakce a tak v zásadě prokazuje aktuálnost zvoleného tematu pro experiment.

b. Autor připravil protokol experimentu na zvířecím modelu, kde kombinoval projektivní a neprojektivní UPV u zdravé a poškozené plíce. Ve 4 cílech stanovil snahy o posouzení plicních i mimoplicních změn během UPV. Tyto cíle podle anotace ze str.22. byly všechny splněné.

c. Metodika je dobře popsána, realizovatelná, dodržuje etický kodex práce s experimentálním zvířetem, statistické zpracování údajů je jednoduché ale umožňuje vyjádření významnosti. Není zřetelně popsáno, které činnosti z metodiky experimentu prováděl autor. Oponent předpokládá podíl spolupracovníků z morfologických disciplín zejména ve zpracování morfologického mikroskopického materiálu.

d. Výsledky disertace jsou popsány ve stručnosti výše. Oponent oceňuje konstatování a doklad o tom, že i projektivní krátkodobá UPV může nepříznivě ovlivnit plicní funkce a struktury.

e. Vypracovaný model experimentu je velmi cenný přínos pro budoucí studie podobného typu, v tom vidí oponent přínos pro další rozvoj vědy.

f. Přípomínky oponenta jsou uvedeny v předchozích odstavcích.

Dotazy: - na str.8. je uvedeno, že intenzita poškození plic při neprojektivní UPV je závislá na velikosti experimentálního zvířete. Může autor toto blíže objasnit? Je toto „kvantitativní“ hledisko jediným faktorem?

- v průběhu studie uhynulo nejvíce selat před dokončením experimentu ve skupině projektivní UPV. Vysvětlení na str. 52/53 připouští možnost, že zvolený režim UPV vedl k „dušení“ a tedy nebyl tak protektivní. Mýlí se oponent? Proč nebyly u uhynulých zvířat vyšetřeny alespoň vzorky plicní tkáň histologicky?

- u všech skupin došlo v průběhu experimentu ke vzestupu sérové osmolality. Jaká byla příčina? Jak byla zvířata v průběhu experimentu hydratována?

- v řešení 3.cíle byly pro vztah UPV a rozvoj SIRS použity prozánětlivé cytokiny. Z širokého spektra „klasických“ byly vyšetřeny jen dva- TNF- α a IL-6. Rozdíl v trendu hladin v průběhu UPV autora překvapil. Má autor vysvětlení pro pokles TNF a současně vzestup IL-6 v průběhu UPV? Může být IL-6 předmětem „target terapie“ např. biologie?

Poznámka oponenta: MUDr Fremuth nedoložil žádnou publikaci s IF, kde by byl 1. autorem.

g. Oponent po prostudování předložené disertační práce MUDr Jiřího Fremutha: Identifikace nových biomarkerů a cílových molekul pro komplexní léčbu (drug target) pomocí proteomické analýzy tělních tekutin a tkání. Experimentální studie, dospěl k závěrům:

I. Doporučuji práci k obhajobě podle § 47 VS zákona 111/98 Sb

II. MUDr Fremuth prokázal tvůrčí schopnost

III. Práce splňuje požadavky kladené na disertaci v oboru pediatrie

Praha 18.5.2011

doc.MUDr Jozef Hoza, CSC
Klinika dětského a dorostového lékařství
1.LF UK a VFN Praha