

Oponentský posudek
doktorské dizertační práce MUDr. Jana Cibulky
„Sledování imunogenních vlastností lidské spermie“

Autor dizertace si vybral vysoce aktuální téma, které se v celkovém kontextu dotýká velmi závažné problematiky všech průmyslově vyspělých států a dnes už i dříve méně rozvinutých zemí, které překotně přejímají westernizovaný způsob života se všemi negativními dopady, a to mužské neplodnosti. Ve své práci se úžeji zaměřuje na studium vztahů mezi spermií a jejím prostředím, resp. imunitním milieum organismu, s cílem nalézt nové diagnostické způsoby využitelné jak v klinické praxi, tak v dalších směrech výzkumu zaměřeného na komplexní problematiku lidské neplodnosti. V popředí pak stojí objasnění příčin poruch plodnosti způsobených imunologickými mechanismy a to jak humorálními (autoprotilátky), tak buněčnými (cytotoxicita).

Dizertační práce je klasicky dělena na obecnou část a experimentální část. V obecné části na více jak 50 stranách autor velmi podrobně analyzuje příčiny imunologicky podmíněné neplodnosti, její patogenezu, včetně možností její diagnostiky a léčby, a teoreticky přibližuje mechanismy vzniku antigenicity spermií v průběhu jejich diferenciaci. Hned v úvodu konkretizuje užívání pojmu neplodnost, rozdíly mezi sterilitou, infertilitou a subfertilitou, a srovnává jejich správné vymezení a používání podle doporučení SZO. Uvádí statistické frekvence příčin neplodnosti mužské a ženské neplodnosti, a hodnocení spermiogramu včetně odchylek od normospermie.

Co se týče imunologicky podmíněné neplodnosti autor správně interpretuje komplexnost této problematiky, která je determinována už samotnou hierarchizovanou výstavbou imunitního systému. Je třeba ocenit, že autor upozorňuje na řadu typů specifických protilátek, které neplodnost vyvolávají, ať přímo (proti antigenům spermií), anebo nepřímo (imunizace ženského organismu antigeny spermií) nebo orgánově specifickými protilátkami, které vznikají na základě patofyziologických procesů doprovázejících různá onemocnění (štítná žláza, diabetes, ovariální selhání apod.) a rovněž protilátek proti některým molekulám buněčných složek, MHC nebo ECM (anexin, fosfolipidy, kardiolipin aj.). Detailně rozebírá vznik a antispermatozoidálních protilátek (ASA) a uvádí specifické rozdíly etiologie ASA u muže a ženy. U mužů vznikají ASA autoimunizací při narušení hematotestikulární bariéry, v důsledku vývojových anomálií, patogenetických procesů (záněty), operačních výkonů nebo porážek, zatímco u žen dochází k tvorbě ASA izoimunizací, protože imunitní systém ženy rozpoznává za určitých okolností spermatocytární antigeny jako cizorodé. Nejčastěji je to po chirurgických zákrocích a zánětech. V dalších pasážích obecného úvodu autor dopodrobna analyzuje možnosti interpretace vzniku neplodností vyvolaných ASA, od posuzování dostatečného počtu a dostatečné motility spermií, přes úlohu mukózních a mechanických bariér (ovulační cervikální hlen) limitujících penetraci spermií, až po evaluaci chemotaktické schopnosti spermií vyhledat oocyt a uskutečnit fúzi. Stejně tak obsáhle uvádí diagnostické metody ASA, možnosti léčby ASA pozitivních pacientů úspěšnost asistované reprodukce u ASA pozitivivity. V další části tohoto teoretického přehledu autor vysvětluje ultrastrukturální a proteomickou unikátnost spermie a její antigenní výbavy. Opět detailně (jak jinak) popisuje spermatogenezu, diferenciaci a maturaci spermatozoidu, celulární i humorální skladbu ejakulátu a nezapomíná ani na imunologický profil seminální plazmy. Závěrečná část tohoto přehledu je věnována analýze terminální fáze maturace, kapacitaci, a posledním strukturálním změnám spermatozoidu, které se už odehrávají v ženském pohlavním traktu při interakci se zónou pellucidou. Vše je diskutováno ve vztahu k antigenní výbavě spermie a jejímu významu pro řešení klíčových otázek spojených s imunologickou problematikou ASA. Na úplný závěr, v subkapitole „Imunologie reprodukce ve službách antikoncepce“, jsou ještě porovnány možnosti využití různých způsobů hormonální a imunologické antikoncepce

(antikoncepční vakcinace) při plánování rodičovství, a to dokonce z pohledu řešení problematiky jak environmentálního znečištění (hormony), tak globálního populačního růstu. Autor upozorňuje na aktuálnost řešení této důležité problematiky, kdy by podle něj bylo zapotřebí získat dostatečné informace o antigenní skladbě spermií (proteomické mapy) a to na základě využití různých, alevzájemně se doplňujících metodologických přístupů (elektroforéza, genetický knockout, western blotting, hmotnostní spektroskopie aj.)

Druhou část dizertační práce, rozsahem téměř totožnou jako je obecná, teoretická část, zaujímá popis experimentů a hodnocení získaných výsledků. Tato experimentální část je rozdělena do několika logicky uspořádaných celků s přesně vytyčenými cíli výzkumu. V ní jsou rozebrány způsoby a metodické přístupy (včetně detailního výčtu chemikálií, reagensů a přístrojového vybavení), které autor využil pro přípravu panelů spermatozoidálních antigenů pro imunoblotting a imunofluorescenci, pro izolaci a identifikaci antispermatických sérových aglutininů a povrchových spermiálních antigenů biotinovým značením, a pro jejich mapování spermaglutinačními protilátkami. Každá monotematická experimentální kapitola je doprovázena podrobným popisem výsledků, zdařilými grafy, tabulkami a přehlednými schémata, případně fotodokumentací elektroforetogramů. Protože autor získal relativně velké množství výsledků, rozhodl se je pro přehlednost diskutovat a závěrečně zhodnotit u každého experimentálního tématu samostatně. Ve stručném celkovém závěru pak shrnuje výhody a nevýhody použitých metodik a poukazuje na výhledy dalšího výzkumu, přičemž zdůrazňuje důležitost orientace také na vyšetření biologického materiálu ženského genitálního traktu, což by dopomohlo optimalizovat interpretaci výsledků a jejich využití v klinické praxi.

Je samozřejmé, že v každé práci se vyskytnou formální nedostatky. V této práci se vyskytují rovněž, ale jsou tak nepodstatné, že její kvalitu nikterak nesnižují. Autorovi bych chtěl jen připomenout, že např. v českém textu je zvykem v číslech psát desetinnou čárku, nikoliv tečku jako v anglických (viz. např. Tab. 3). V Tab. 4. je třeba ujednotit termíny srv. normospermie, takže ostatní termíny by měly rovněž končit ...ie, nikoliv latinizovaně ...ia. Ve vysvětlivkách zkratk nepůsobí dobře nepřeložené anglické termíny, které mají své běžně užívané české ekvivalenty: srv. např. Human Leukocyte Antigen (lidský leukocytární antigen), Heat shock protein (protein tepelného šoku) aj. Rovněž je třeba držet se jedné formy pravopisu, v odborných textech lépe formy konzervativní, např. isoimunizace, isoforma, deionizovaný, izolovat, sensibilizovat, isotyp, nikoliv směsně isoimunizace. Anebo všude důsledně dodržovat modernizovanou formu, izoimunizace, izoforma, deionizovaný, atd. Jiným formálním opomenutím je uvádění odkazů na citace, které by mělo být rovněž jednotné, tedy buď číselný odkaz v závorce, anebo vypsání autora (et. al.) s uvedením letopočtu (viz např. str. 25, Li 1974 srv. [32]). Navíc, nelze dohledat citaci Franklin a Dukes (1964) v Seznamu použité literatury. V takovéto vysoce odborné práci je také běžným úzusem, že se v citacích uvádějí všichni autoři, nikoliv jako namátkou v citaci 66. Mashu, A., Tanabe, K., Kamei, K., et al., a v řadě dalších.

Předkládaná dizertační práce je reprezentativním průřezem problematiky imunologie lidské spermie a víceméně i úvodem do širokého oboru reprodukční imunologie, protože se opírá o rozsáhlý počet většinou nejnovějších odborných prací (více jak 200 citací). Je také třeba ocenit, a to se málokdy stává, že autorovi se podařilo navázat produktivní spolupráci s dalšími ústavy a specializovaným pracovišti, a že se výsledky tohoto společného výzkumu podařilo úspěšně publikovat v řadě odborných periodik. Tyto skutečnosti charakterizují MUDr. J. Cibulku jako pečlivého, pragmaticky uvažujícího a svědomitého vědeckého pracovníka. Dokládá to formální stránka a logická strukturace práce. Co zejména oponent oceňuje, je schopnost autora realisticky interpretovat získané výsledky a zhodnotit jejich aplikovatelnost v klinické praxi a naznačit možné trendy dalšího vývoje oboru. To vše jsou důvody, abych překládanou dizertační práci MUDr. Jana Cibulky „Sledování imunogenních vlastností lidské spermie“ označil z odborného hlediska za mimořádně velmi dobrou a

doporučil ji k obhajobě. Navrhují její kladné přijetí a rovněž doporučuji, aby na základě úspěšné obhajoby byl MUDr. J Cibulkovi udělen akademický titulu PhD dle Zákona o vysokých školách č. 111/98 Sb.

V Praze 20. 5. 2013

RNDr. Petr Šíma, CSc
Sektor imunologie a gnotobiologie
Mikrobiologický ústav AV ČR