

Oponentský posudek diplomové práce

Název práce: Pupečnicková krev – vliv kryokonzervace a demografických údajů matky a dítěte na jejím přihojení při transplantacích

Autor: Bc. Veronika Skládaná

Místo: Jihočeská universita v Českých Budějovicích, Přírodovědecká fakulta

Oponent: PhMr. Alena Hrubá, CSc.

Pracoviště opONENTA: Ústav hematologie a krevní transfuze Praha

Datum obhajoby 23.1.2012

Diplomová práce má celkem 105 stran. Členěna je do krátkého úvodu, následují kapitoly o pupečnickové krvi, kmenových buňkách, transplantacích pupečnickové krve a bankách pupečnickové krve. Následuje seznam používaného materiálu a popis použitých metod. Výsledky jsou doloženy třemi tabulkami zdrojových dat a padesáti grafy. Zpracování pupečnickové krve doplňuje dvacet fotografií. Nechybí seznam použitých zkratk a poděkování školiteli a spolupracovníkům. Jedna z příloh je seznam kontraindikací odběru pupečnickové krve pro léčebné účely.

Seznam použité literatury zahrnuje celkem 52 odkazů, z toho 20 je staženo z internetu, doplněno adresou a datem stažení.

V práci je popisován propracovaný postup zpracování dárcovských pupečnickových krví uzavřeným systémem, který vyhovuje současné legislativě o buňkách a tkáních určených pro člověka i v podmínkách, kdy na pracovišti nejsou monitorované čisté prostory (Zákon číslo 296/2008 Sb.). Popsán je i odběr potřebných vzorků na vyšetření kvality štěpu před jeho zařazením do nabídky prostřednictvím registru dárců krvetvorných buněk a metody, které se používají na posuzování vhodnosti odebrané pupečnickové krve pro transplantaci.

U padesáti pupečnickových krví byly vyšetřeny základní parametry na posouzení kvality štěpu hemopoetických buněk, které zahrnovaly: buněčnost, povrchový znak CD 34 a schopnost tvořit hemopoetické kolonie. Stejný materiál byl vyšetřován u čerstvých vzorků a po jejich kryokonzervaci a rozmražení. Shromážděny byly některé údaje o matce a novorozeném dárci pupečnickové krve a byla hledána závislost na kvalitě pupečnickové krve a její vhodnosti pro transplantace.

Ve výsledcích vyjádřených v grafech postrádám statistické vyhodnocení. V analýze podle místa narození matky je dělení padesáti vyšetřovaných vzorků podle jedenácti krajů a u materiálu s tak rozdílnými vstupními parametry jako je pupečnicková krev za nedostatečný počet k vyvozování závěrů. Překvapivý je i značný pokles počtu leukocytů po rozmražení a naopak vzestup počtu CFU-GM kolonií u vzorků po rozmražení.

Zdrojová data obzvláště po jejich rozšíření by mohla sloužit nadále i jako podklad pro další vyhodnocení různých vlivů, ku příkladu vlivu životního prostředí na odolnost buněk pupečnickové krve vůči kryokonzervaci.

V práci je velmi malý počet formálních nedostatků – překlepy, citovaný autor neuvedený v seznamu odkazů

Závěr

Autorka prokázala, že je schopna zvládnout relativně složitou problematiku vztahující se k transplantacím krvetvorných buněk, jejich smysl a požadavky na kvalitu. Je dobře seznámena se současnými poznatky o kmenových buňkách krvetvorby i s kmenovými buňkami s regeneračním potenciálem v postnatálním životě.

Je schopna podrobně popsat proces zpracování pupečnickové krve pro jeho využití jako štep hemopoetických buněk k potenciálnímu využití kdekoliv na světě i s požadovanými nároky na kvalitu.

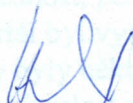
Prokázala schopnost provádět složité vyšetření povrchových znaků buněk průtokovou cytometrií a kultivační vyšetření hemopoetických prekursorů s propočty množství buněk, které má být použito na optimální počet kolonií vyrostlých na misce.

Prokázala schopnost vyhledat a nastudovat příslušnou literaturu vztahující se k řešené problematice.

Prokázala schopnost formulovat srozumitelně myšlenky, graficky zpracovat výsledky, práci rozčlenit do kapitol a doložit literárními odkazy.

Doporučuji, aby předložená práce byla přijata jako podklad k udělení diplomu.

Praha, 18.1.12


PhMr. Alena Hrubá, CSC

Otázky oponenta

Jak si vysvětlujete nárůst hemopoetických kolonií CFU-GM po rozmražení vzorků?

Nenašla jste nějakou závislost na množství odebrané PK, případně technice odběru při sledování odolnosti buněk na kryokonzervaci?

Návrh klasifikace: **2**

Praha, 18.1.12



PhMr. Alena Hrubá, CSc

FAKULTNÍ NEMOCNICE PLZEŇ
Hematologicko- onkologické oddělení
Alej Svobody 80, Plzeň 304 60

Doc. RNDr. Jan Kopecký, CSc.
vedoucí Katedry medicínské biologie
Přírodovědecká fakulta Jihočeské Univerzity
České Budějovice

POSUDEK DIPLOMOVÉ PRÁCE

„Pupečnicková krev – vliv kryokonzervace a demografických údajů matky a dítěte na jejím přihojení při transplantacích“, autorka Bc. Veronika Skladaná.

Vážení kolegové,
předně mi dovoluji, abych poděkoval za důvěru, s níž jste mi odeslali výše uvedenou diplomovou práci k posouzení.

Formální stránka

Jde o originální práci vycházející z vlastního výzkumu autorky. Práce je opatřena obsáhlým teoretickým úvodem do problematiky, komentáři k použitým metodikám a výsledkům a zakončena je souhrnem sumarizujícím hlavní výsledky výzkumu.

Vlastní text tvoří 86 stran, k práci je připojeno 5 stran citací a 14 stran příloh (tabulky, obrázky). Práce je napsána dobrou češtinou s minimem gramatických chyb či překlepů. Diskutovaná problematika je podána jasně a přehledně.

Uchazečka se věnuje řešeným problémům dostatečně důkladně a vyvozuje aktuální závěry. Použité laboratorní metody jsou adekvátní. Nebylo bohužel aplikováno statistické hodnocení výsledků, které by mohlo jejich platnost podpořit. Velikost testovaného souboru je dostatečná (50 odběrů), nicméně pro budoucí analýzy bude nezbytné připravit větší skupinu odběrů.

Obsahová stránka

Téma disertační práce je velmi aktuální. Počty prováděných transplantací hemopoetických kmenových buněk mají celosvětově rostoucí trend, rozšiřují se indikace, zvyšuje se věk pacientů. Vedle kostní dřeně nebo periferních kmenových buněk je častěji nutné zvažovat alternativní zdroje hemopoetických kmenových buněk jako například alogenní pupečnickovou krev. Kvalita resp. dostatečná buněčnost transplantátu má významný vliv na engraftment i výsledek transplantační léčby a znalost faktorů, které ji mohou ovlivňovat, je pro klinickou praxi velmi důležitá.

Uchazečka porovnávala různé kultivační metody pro hodnocení kolonie tvořících jednotek. Nejlepší a optimalizovaná metoda byla následně použita pro vlastní studii s transplantáty pupečnickové krve. Při vyhodnocování faktorů ovlivňujících kvalitu transplantátu měl nejvýznamnější vliv proces kryokonzervace. Ztráta jednotlivých buněčných populací resp. CFU dosahovala po kryokonzervaci až cca 60 %. Z testovaných demografických parametrů se jako významné projeví především doba mezi odběrem a zpracováním a také věk matky. Ostatní sledované parametry (krevní skupina matky a dítěte, pohlaví dítěte atd.) neměly na kvalitu transplantátu vliv. Uchazečka správně uvádí, že největší dopad na transplantát má kryokonzervace s ní spojená ztráta buněk. V tomto kontextu budou pravděpodobně ostatní vstupní parametry méně významné a budoucí výzkum by měl být směřován zejména na metodiku zpracování a rozmrazování buněk.

Připomínky oponenta

1. Mezinárodní databáze nepřibuzných dárců (www.bmdw.org) zahrnuje aktuálně přes 18 mil dárců a přes 500 tis. pupečnickových krví. Data uvedená na straně 18. nejsou aktuální (citace z roku 1997).
2. Tvrzení o nižší TRM po transplantaci pupečnickové krve ve srovnání s transplantací kostní dřeně je zavádějící a vyžadovalo by detailnější komentář podpořený citacemi.
3. Relaps maligního hematologického onemocnění bývá po alogenní transplantaci kostní dřeně či PBSC významně ovlivněn přítomností GVHD. Je citována jediná práce, která tuto závislost v případě transplantace pupečnickové krve nepotvrdila (strana 18). Na druhou stranu je uvedeno, že GVHD ovlivňuje přežití po transplantaci, a že relaps je jednou z hlavních příčin úmrtí.

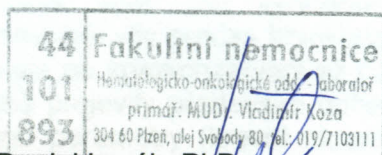
Dotazy oponenta

1. Kryokonzervované kmenové buňky z pupečnickové krve mohou být dlouhodobě skladovány. Autorka uvádí dobu 20 let (úvod, strana 9). Jde o literární údaj nebo vlastní zkušenost pracoviště? Jakou nejdelší „expirační“ dobu má pracoviště ověřenu?
2. Popsané ztráty buněk po kryokonzervaci jsou značné (60 % CD34+). Při kryokonzervaci autologních periferních kmenových buněk se setkáváme s nižším úbytkem (do 10 %). Jsou ztráty uvedené v práci v případě PK obvyklé? Jaká jsou možná vysvětlení?
3. V závěru práce jsou uvedeny teoretické hmotnosti příjemců, pro něž by transplantáty byly s ohledem na minimální doporučená množství buněk/kg hmotnosti dostatečné. V těchto výpočtech se vychází z množství buněk stanoveného před kryokonzervací nebo až po rozmrazení? S ohledem na popsané ztráty buněk po kryokonzervaci se jejich celkový obsah v transplantátu po rozmrazení může významně snížit. Jak se tato problematika řeší při výběru transplantátu pro konkrétního příjemce resp. z jakých dat se vychází (před kryokonzervací nebo po rozmrazení)?
4. V části porovnávací kvalitatívni parametry PK s ohledem na demografická data jsou ve grafech uvedeny koncentrace buněk, nicméně porovnávány byly pravděpodobně absolutní počty. Bylo by vhodné vysvětlit metodu výpočtu hodnot (počtů) buněk před a po kryokonzervaci a způsob stanovení ztráty buněk (není uvedeno v metodice).

Závěr oponenta

Diplomovou práci hodnotím kladně. Přes výše uvedené připomínky a dotazy vznesené k diplomové práci je možno konstatovat, že práce splnila stanovené cíle. Jde o ucelený souhrn problematiky odběrů a zpracování transplantátů krvetvorných buněk z pupečnickové krve. Přináší rozsáhlé teoretické shrnutí problematiky a původní analýzu některých faktorů ovlivňujících kvalitu transplantátů. Zároveň práce přispívá k zavedení nových postupů, které se v oblasti kontroly kvality transplantátů z pupečnickové krve prosazují.

Uchazečka prokázala dostatečné teoretické a praktické znalosti problematiky a proto **doporučuji předloženou diplomovou práci k její obhajobě.**



MUDr. Daniel Lysák, PhD
Hematologicko- onkologické oddělení
Fakultní nemocnice Plzeň
13.1.2012

navrhla analýza 2
ly