



Vážený pan

Prof. RNDr. Ivan Raška, DrSc.

Předseda Oborové rady Biologie a patologie buňky (OR 02)

Doktorské studijní programy v biomedicině

Ústav biologie a lékařské genetiky 1. LF UK a VFN

Albertov 4, 128 00, Praha 2

Tel.: 224 968 001, E-mail: iraska@lf1.cuni.cz

Doc. MUDr. Mgr. Zbyněk Tonar, Ph.D.

Ústav histologie a embryologie

Lékařská fakulta UK v Plzni

Karlovarská 48

301 66 Plzeň

Tel.: +420607818614, +420377593320

E-mail: tonar@lfp.cuni.cz

### Oponentní posudek

na dizertační práci pana **MUDr. Tomáše Novotného**, doktoranda Ústavu histologie a embryologie 2. LF UK, na téma „**Morfologické změny kardiopulmonárního krevního řečiště za experimentálních podmínek**“.

Doktorand předložil česky psanou dizertační práci o 96 stranách, v níž se zabývá mikroskopickou stavbou cév plicního řečiště a stavbou myokardu pravé komory u modelu experimentálně navozené hypoxie u potkana, a to po čtyřech a 21 dnech v porovnání se zvířaty bez hypoxie. Studie dále porovnává nálezy u zvířat, jimž byl podáván kromoglykát, s nálezy u zvířat bez této terapie. Hlavním přínosem práce je: 1) zjištění, že k přestavbě tepenného řečiště plic dochází nejen v oblasti odporových tepen, ale rovněž u velkých vodivých tepen; 2) zjištění, že hypoxická přestavba plicních tepen, která je součástí rozvoje plicní hypertenze, může být u modelu zmírněna včasným podáním kromoglykátu sodného. Tyto přínosy experimentu považuji za nové vědecké poznatky, které rovněž již prošly oponenturou mezinárodních časopisů indexovaných v Journal Citation Reports.

**Aktuálnost řešeného tématu a význam dizertační práce pro obor:** Práce přispívá k pochopení mechanismů hypoxické přestavby tepenného řečiště plic a reakce myokardu pravé komory. Základní výzkum v oblasti plicní hypertenze je jednoznačně tématem potřebným a přínos předložených experimentů je v práci velice dobře zdůvodněn. Téma proto považuji za vhodné zvolené. Jedním z hlavních přínosů práce je vhodně zvolená kombinace použitých histologických metod, které se vzájemně doplňují.

**Postup řešení problému:** Uchazeč představil teoretické základy a klasifikaci plicní hypertenze a popsal, které buňky, jimi produkované růstové faktory a složky mezibuněčné hmoty se podílejí na patogenezi přestavby cévní stěny a myokardu u tohoto onemocnění. Popsal význam experimentálních modelů při studiu hypoxické plicní hypertenze. Uchazeč formuloval šest jednoznačně testovatelných hypotéz a šest cílů (tři pro každou ze dvou studií) dizertace. Dále popsal vlastní experimenty a všechny jejich větve, reprodukovatelným způsobem popsal



metodikou histologického zpracování. Ve výsledkové části popisuje mikroskopické nálezy, dokládá je množstvím mikrofotografií a statistickým porovnáním významnosti rozdílů mezi skupinami experimentu. V další kapitole jsou jednotlivé okruhy diskutovány ve světle již publikovaných výsledků, v sedmé kapitole jsou pak shrnuty do závěrů.

**Použité metody:** Ke splnění vytčených cílů byla použita jak rutinní barvení, tak selektivní průkaz elastinu, kolagenu, granul žírných buněk, retikulárních vláken, matrix metaloproteinázy 13 a kolagenu typu VI. Volbu histologických metod a jejich vzájemnou návaznost považuji za velmi silnou stránku práce. Metody jsou řádně dokumentovány, jejich použití je vzhledem k cílům vhodně zvolené a vyvážené, popis provedené práce umožňuje případnou reprodukovatelnost, kvalita preparátů je doložena bohatou fotodokumentací a takto získané výsledky lze považovat za validní. V oblasti morfometrie byly použity konvenční postupy založené na dříve publikovaných postupech.

**Splnění cílů práce:** Jak vyplývá z kapitol 5-7, dizertační práce jednoznačně splnila v úvodu formulované cíle. Jejich shrnutí je přehledně podáno v kapitole 7.

**Přínos a prokázané kompetence doktoranda:** Doktorand prokázala svoje znalosti při formulaci vědeckého problému z oblasti experimentu s využitím zvířecího modelu, z oblasti hodnocení mikroskopické přestavby cév a srdeční svaloviny, to vše na základě kritického rozboru současné úrovně vědeckého poznání. Prokázal schopnost plánovat, provést a vyhodnotit vhodně navržené experimenty v dosti netriviálním, ale účelném uspořádání. Doktorand je schopen vědecké práce se získáním konkrétních výstupů, je schopen výsledky kriticky interpretovat a z těchto výsledků vyvodit odpovídající závěry. Celou práci je schopen shrnout do srozumitelně psaného a logicky provázaného odborného sdělení. Autor v diskusi navíc nastiňuje další směřování práce ve svém oboru, ke které má dle předložené dizertace vynikající předpoklady.

**Formální zpracování a jazyková úroveň:** Práce je přehledně členěna, jednotlivé oddíly jsou dobře logicky provázány. Oceňuji jak pečlivé doložení pozorování pomocí velkého množství kvalitních mikrofotografií, jak přehlednost grafů s morfometrickými údaji. K formálnímu zpracování mám čtyři drobné připomínky:

- Vzhledem k množství porovnávaných skupin ve dvou studiích by celkové přehlednosti prospělo, pokud by byly nejdůležitější nálezy u všech skupin obou studií shrnuty do jediné tabulky. V ní by bylo možné vysledovat zákonitosti vedoucí k závěrům dizertace o něco snáze nežli ve stávající podobě. Stejně tak by čtenáři usnadnilo orientaci, pokud by např. na konci výsledkové části bylo tabulkové shrnutí všech šesti hypotéz formulovaných v oddíle 3 spolu s uvedením, která konkrétní hypotéza byla či nebyla při statistickém hodnocení zamítnuta. Při velkém množství pozorování, která jsou uspořádána jedno za druhým, totiž je pro čtenáře v některých případech obtížné ověřit si, s kterou skupinou je aktuální nález porovnáván (např. zmnožení retikulárních vláken na str. 52 a 65 či zmnožení vasa vasorum na str. 67).
- Obvyklé typografické konvence doporučují vypisování číslovek <10 slovně a rovněž neponechávat jednopísmenné souhláskové předložky (s, z, k, v) jako poslední písmeno na řádce, nýbrž zalomit je na novou řádku pomocí nezlomitelné mezery.
- Výjimečně došlo v některých pasážích při popisu nálezů a složitější diskusi k opomenutí základní skladební dvojice (např. str. 79, 84). Lépe rovněž působí nestřídat latinský a



český pojem ve stejné souvislosti (membranae fenestratae vs. fenestrované elastické membrány, str. 37-40), nýbrž zavést jeden z nich (popř. s uvedením synonym) a dále tento konzistentně používat.

**Vyjádření k publikacím studenta:** Doktorand dokládá publikaci šesti článků v časopisech indexovaných v Journal Citation Reports (s faktorem impaktu), z toho čtyři jsou bezprostředními pilíři dizertace a u třech je prvním autorem. Práce uchazeče jsou dle Web of Science Core Collection citovány bez autocitací devětkrát při h-indexu=2. Schopnost autora publikovat a obhájit vědecké práce v daném oboru v mezinárodním měřítku tak považuji za přesvědčivě doloženou.

### Připomínky a dotazy:

Díky obsažnosti a mezioborovému přesahu práce je otázek, které se nabízejí, velmi mnoho a doktoranda si zcela správně některých z nich sám všimá v kapitole věnované diskuzi a výhledům do budoucna. K diskuzi při obhajobě si dovoluji položit následující dotazy:

- Na str. 9 se zmiňujete o neomuskularizaci jako součásti hypoxické přestavby tepen. Lze říci, zda, u kterých tepen, a v jaké fázi přestavby se uplatňuje spíše hypertrofie či spíše hyperplazie buněk hladké svaloviny?
- Oddíl 4.1. Přesný mechanismus, kterým kromoglykáty stabilizují žírné buňky a zmírňují tendenci k jejich degranulaci, nebyl dlouho znám. Je již v současnosti podrobně popsán?
- K oddílu 4.2.1 - kolik řezů bylo z každého orgánu krájeno a použito k morfometrii?
- Používáte termín „artérie“ i pro mikroskopické tepénky o průsvitu několika desítek mikrometrů. Proč dáváte přednost označovat tyto cévy jako arterie (tepny), když Terminologia Histologica umožňuje nazývat je arteriolami (tepénkami)?
- V oddílu 4.3 jsou popsány morfometrické postupy.
  - Standardní histologické zpracování formalinem fixovaného materiálu a parafinových řezů vede ke smrštění tkání v řádu desítek procent. V důsledku toho jsou hodnoty změřené na těchto řezech nižší nežli u nefixovaného materiálu (Dorph-Petersen et al., 2005, J. Microsc. 204, 232-246; Tschanz et al., 2014, Ann. Anat. 196, 3-11). To samozřejmě nebrání porovnatelnosti vzorků při dodržení stejného způsobu zpracování, jako je tomu ve Vašich studiích. Na druhou stranu je vhodná velikost této chyby znát pro porovnatelnost těchto morfometrických dat s daty získanými jinými technikami, např. morfometrií na kryorezech či s jinými postupy pro morfometrii průsvitů cév, např. korozivních odlitkových preparátů. Navrhněte způsob, jak zohlednit korekci na smrštění mikroskopických struktur ve Vaší studii.
  - Byl při počítání profilů žírných buněk na jednotku řezu nějak zohledněn tzv. okrajový efekt (edge effect, viz např. Gundersen 1978, Microsc. Acta 81, 107-17 nebo West et al. 1991, Anat. Rec. 231, 482)? Na počítání jakého průměrného počtu buněk jsou založena porovnání žírných buněk?
  - Kromě Vámi použitého způsobu počítání profilů žírných buněk na jednotku plochy řezu lze používat ke stejnému účelu i počítání buněk pomocí trojrozměrných geometrických průběhů technikou zvanou disektor (Sterio 1984, J. Microsc. 134, 127-136; 52; Mühlfeld et al., 2010, Cardiovasc. Pathol. 19, 65-82). Porovnejte výhody a nevýhody obou postupů v histologii.



- V jakém rozlišení byly preparáty skenovány (oddíl 4.3.4)?
- Jaké rozlišení/zvětšení bylo zapotřebí pro posouzení barvitelnosti a stavby endomysia? Z doložených fotografií není příliš patrné.
- Upřesněte v rámci kolektivu spoluautorů publikací Váš osobní podíl na experimentu, odběru a zpracování materiálu a vlastním hodnocení.
- Co je míněno tzv. šikmými segmenty na str. 33? Do jaké míry je tento jev dán jen orientací řezné roviny, případným točitým průběhem tepny či blízkostí odstupů jejich větví?
- Popisujete fibroblasty s převahou heterochromatinu v jádře. Obecně mohou mít fibroblasty v jiných orgánech a vývojových stádiích naopak i převahu euchromatinu. Jak si Vaše pozorování vysvětľujete a jak jej interpretujete?
- Popisujete změny v rozměrech buněk srdeční svaloviny pravé komory. Dochází tím i ke změnám poměrného zastoupení svaloviny a vaziva ve stěně pravé komory?
- Zmiňujete vliv načasování podání kromoglykátů na přestavbu plicních tepen. Jaká je přibližná životnost žírných buněk, popřípadě rychlost obnovení granul po degranulaci?
- Při pohledu na analýzu zastoupení jednotlivých typů tepen v plicním řečišti a jejich změny při hypoxické přestavbě se nabízí otázka, zda jsou poměry mezi těmito typy tepen u modelu potkana podobné jako u plic člověka a zda lze očekávat obdobnou terapeutickou odpověď?
- Zmiňujete plánované pokračování hodnocení studií s využitím elektronové mikroskopie. Které parametry přitom hodláte hodnotit a odpovědi na které otázky může toto rozšíření metod přinést?

**Závěr a doporučení:** Z předložené práce vyplývá, že doktorand prokázal schopnost a připravenost k samostatné činnosti v oblasti výzkumu a vývoje a k samostatné teoretické a tvořivé vědecké práci včetně publikace výsledků. Dizertační práce splňuje požadavky kladené na doktorskou dizertaci zákonem č. 111/1998 Sb. o vysokých školách v platném znění. Proto **jednoznačně doporučuji její přijetí v předložené podobě jako podklad k obhajobě a za předpokladu úspěšné obhajoby doporučuji, aby panu MUDr. Tomášovi Novotnému byl udělen akademický titul „doktor“ (Ph.D.) v příslušném oboru podle § 47 Zákona o vysokých školách č. 111/98 Sb.**

V Plzni dne 15.3.2018

Doc. MUDr. Mgr. Zbyněk Tonar. Ph.D.