

Oponentský posudek na disertační práci Mgr. Markéty Hlaváčkové

## **Úloha isoform proteinkinasy C v kardioprotektivním mechanismu adaptace na chronickou hypoxii**

Disertační práce Mgr. Markéty Hlaváčkové je zaměřena na problematiku týkající se mechanismu endogenní kardioprotekce indukované po adaptaci myokardu na chronickou hypoxii. Ze společenského hlediska jde o velmi závažné téma, protože kardiovaskulární onemocnění představují hlavní příčinu mortality v naší populaci. Možnost zvýšit odolnost myokardu k ischemickému poškození by měla proto velký význam pro prevenci a klinickou praxi. Hlavním cílem disertace bylo podpořit hypotézu, že v signálních drahách aktivovaných po adaptaci na chronickou hypoxii se uplatňuje proteinkinasa C (PKC), zejména její isoformy  $\delta$  a  $\epsilon$ , patřící do třídy nových PKC.

Práce vznikla během doktorského studia autorky na Přírodovědecké fakultě UK na pracovišti hlavního školitele Doc. RNDr. Františka Nováka, CSc. Důležitá byla též spolupráce s Oddělením vývojové kardiologie ve Fyziologickém ústavu AV ČR v Praze vedeným Prof. RNDr. Františkem Kolářem, CSc. Skvělé odborné zázemí a dlouhodobá spolupráce uvedených pracovišť se odrazily jak v tématu dizertace, tak v její kvalitě.

Vlastní práce představuje plnou verzi s klasickým členěním, doplněnou pěti přílohami článků, z kterých text dizertace vychází. Čtyři články byly publikovány v mezinárodních časopisech s velmi dobrým impaktem a pátá příloha je kapitola v knize, kde je Markéta Hlaváčková spoluautorkou. Práce je napsána v anglickém jazyce, bez chyb a překlepů, je přehledná a dobře se čte. Cíle jsou formulovány jasně. Text je doplněn 25 obrázky a 8 tabulkami.

Ve velmi fundovaném literárním úvodu autorka upozorňuje na různé možnosti jak vyvolat endogenní kardioprotekci a především se zabývá různými modely chronické hypoxie a jejich protektivními účinky. Podrobně popisuje klasifikaci, strukturu a způsoby aktivace jednotlivých izoform PKC a jejich zapojení v signálních drahách spojených s kardioprotekcí. Popisuje také další molekulární mechanismy, které se mohou v indukci kardioprotekce uplatnit. Protože podstatná část prezentovaných výsledků se týká sledování vlivu tukových diet o různém složení mastných kyselin v kombinaci s chronickou hypoxií z hlediska odolnosti myokardu před ischemicko-reperfúzním poškozením a arytmiemi, je rozsáhlá kapitola úvodu věnována také kardioprotektivním účinkům polynenasycených mastných kyselin v dietě. Literární úvod disertace by se mohl snadno stát podkladem přehledného článku, také díky velmi dobře vybraným citacím jak zásadních původních prací, tak i citacím recentních publikací.

Specifické cíle jsou dobře a detailně formulovány.

V metodické části je dobře popsán použitý experimentální model a jednotlivé metody. Je třeba zdůraznit, že autorka zvládla řadu technik, mezi nimi např. přípravu kardiomyocytů a jednotlivých buněčných frakcí ze srdeční tkáně, imunohistochemii, RT PCR a Western-blotting. I v této části disertace se odráží unikátní metodické zázemí, díky kterému mohla disertace vzniknout.

Vlastní výsledky jsou popsány na 17 stranách textu a jsou dobře komentovány na 12 stranách diskuze. Autorka zejména zjistila, že sledované izoformy PKC  $\delta$  a  $\epsilon$  jsou po adaptaci na chronickou hypoxii ovlivněny rozdílným způsobem. Množství PKC  $\delta$  roste a protein je translokován především na plasmatickou membránu a mitochondrie, kde je aktivován. PKC  $\epsilon$  naopak mírně ubývá. Podání inhibitoru PKC  $\delta$  rottlerin odstranilo efekt chronické hypoxie na velikost infarktu, což naznačuje, že tato izoforma by mohla hrát roli v studovaném protektivním mechanismu. Pokud jde o potvrzení, nebo vyloučení role PKC  $\epsilon$ , jsou v práci uvedeny dosud nepublikované výsledky, kdy byl použit inhibiční peptid specifický pro tuto izoformu na úrovni kardiomyocytů izolovaných z levé komory potkanů adaptovaných na chronickou hypoxii. Zvýšená odolnost k anoxii, která u nich přetrvává, nebyla tímto

peptidem odstraněna. Předpokládám, že autorka bude v těchto experimentech pokračovat. Zajímavé by bylo použít specifický inhibiční peptid také pro PKC  $\delta$  v případě, že je dostupný.

Za velmi důležité považuji experimenty, v nichž byl sledován vliv diet obohacených tuky se saturenými mastnými kyselinami, n-6 PUFA a n-3 PUFA a zároveň vliv chronické hypoxie. Jak diety samotné, tak diety v kombinaci s chronickou hypoxií specifickým způsobem ovlivnily množství obou isoform PKC na membránové frakci a velikost infarktu, které byly v těsné negativní korelaci v případě PKC  $\delta$ , nikoliv v případě PKC  $\epsilon$ , což je dalším důkazem toho, že v mechanismu endogenní kardioprotekce indukované po adaptaci na chronickou hypoxii se uplatňuje především PKC  $\delta$ . Také se podařilo prokázat, v soulase s předchozími výsledky, že specificky n-3 PUFA v dietě chránily myokard před ventrikulární arytmií. Poněkud paradoxně, n-3 PUFA zároveň navodily vyšší náchylnost srdeční tkáně k hypoxickému poškození.

Za drobný nedostatek výsledkové části práce lze pokládat to, že chybí odkazy na vlastní publikace, resp. na to, ve které z publikací jsou výsledky obsaženy. V diskuzi by bylo vhodné komentovat, jaký byl příspěvek autorky k jednotlivým publikacím

#### **Otázky:**

1. Autorka se ve své práci zabývala výhradně isoformami PKC, které patří do třídy nových PKC. Uvažovali jste také o účasti izoform z ostatních tříd PKC (klasické, atypické)?
2. Jsou známy nějaké údaje o tom, jakým způsobem je ovlivněna distribuce a množství proteinu jednotlivých isoform PKC během akutní ischemie, má případně na tyto parametry vliv vámi používaný model adaptace na chronickou hypoxii?
3. Ve studii jste používali inhibitor PKC  $\delta$  rottlerin, který eliminoval protektivní účinky chronické hypoxie jen částečně, jak si to vysvětlujete.
4. Dieta obohacená n-3 PUFA z rybích olejů měla jasné protektivní účinky na reperfuční arytmie, které se zvláště v kombinaci s chronickou hypoxií byly prakticky eliminovány. Naopak, po této dietě byl pozorován největší infarkt a zvyšovala se koncentrace konjugovaných dienu. Byly v dietě přítomny antioxidanty? Jakým způsobem by se na uvedených efektech mohly podílet rozdílné lipidové mediátory vytvářené z n-3 PUFA a z n-6 PUFA?

Výše uvedené komentáře a dotazy nijak nesnižují kvalitu disertační práce, kterou pokládám za vynikající, a kterou plně doporučuji k obhajobě.

V Praze dne 12.6.2012

MUDr Jan Kopecký, DrSc  
FgÚ AV ČR