

Posudek na doktorandskou disertační práci Mgr. Markéty Hlaváčkové nazvanou  
ROLE OF PROTEIN KINASE C ISOFORMS IN CARDIOPROTECTIVE MECHANISM OF  
CHRONIC HYPOXIA

Předložená disertační práce Mgr. Hlaváčkové zaměřená na studium úlohy proteinkinázy C (PKC) v kardioprotektivním mechanismu chronické hypoxie byla vypracována na základě výsledků získaných v průběhu jejího doktorandského studia na Přírodovědecké fakultě UK v Praze. Vlastní disertační práce vychází z experimentálních výsledků publikovaných ve třech mezinárodních časopisech se solidním impakt faktorem (Mol. Cell. Biochem. - IF 2.168, Exp. Biol. Med. (Maywood) - IF 2.954) a Br. J. Nutr. - IF 3.072). Kopie všech těchto článků jsou in extenso přiloženy k disertační práci. Kromě toho je přiložena také kopie spoluautorského článku s příbuznou tematikou (Physiol. Res. - IF 1.646) a kopie kapitoly v knize (Intermittent hypoxia), na kterých se Mgr. Hlaváčková podílela.

Úvodem je třeba ocenit, že autorka napsala plnou verzi své disertační práce anglicky, což není dosud zcela běžné. Celý text je psán velmi dobrou angličtinou prakticky bez chyb a překlepů.

Téma disertační práce se týká kardiologické problematiky, jejíž studium je velice významné z celospolečenského hlediska, protože onemocnění srdce představují nejčastější příčinu úmrtí v současné západní civilizaci. Vlastní práce je napsána přehledným a velmi dobře srozumitelným způsobem. V úvodní části autorka seznamuje čtenáře s možnostmi navození zvýšené odolnosti myokardu k ischemicko-reperfúznímu poškození a s významem hypoxie v souvislosti s možností navození kardioprotekce. Přehledně jsou popsány různé modely hypoxie a molekulární mechanismy, které zřejmě mohou hrát roli v kardioprotekci. Další samostatné kapitoly jsou pak věnovány rozboru účinků polynenasycených mastných kyselin na kardiovaskulární onemocnění a popisu, charakterizaci a specifické úloze PKC v myokardu.

Cíle disertační práce jsou jasně definovány, ale považuji za poněkud formálně nadbytečné uvádění odkazů na dosažené výsledky formou odkazů na příslušné publikace přímo u jednotlivých cílů (toto by mělo být obsahem především kapitoly věnované popisu výsledků).

V metodické části autorka detailně popsala použitý experimentální model a uvedla všechny klíčové metodiky, které byly v předloženém výzkumu uplatněny. V rámci relativně velmi podrobného popisu metodik bych uvítal také krátkou zmínku o způsobu aplikace rottlerinu, který byl použit jako selektivní inhibitor PKC $\delta$  v některých dále zmíněných pokusech.

Přehledný popis získaných výsledků čítá celkem 17 stran a v následující obsáhlé diskuzi (12 stran) jsou všechny výsledky komentovány a diskutovány v odpovídajícím kontextu se současnými poznatky. Závěrečné shrnutí poskytuje názorný přehled o hlavních získaných výsledcích a jejich významu. Text disertační práce je doplněn 25 obrázky a 8 tabulkami.

Lze konstatovat, že autorce se prakticky beze zbytku podařilo splnit všechny hlavní vytčené cíle práce. Při sledování vlivu adaptace potkanů na intermitentní hypobarickou

hypoxii (IHH), která má výrazný kardioprotektivní účinek, na expresi a distribuci dominantních isoform PKC (PKC $\delta$  a PKC $\epsilon$ ) přítomných v srdci bylo zjištěno, že zatímco se celkové množství PKC $\delta$  a její aktivní fosforylované formy zvyšuje na sarkolemální membráně i v mitochondriích, zastoupení PKC $\epsilon$  se poněkud snižuje, aniž by došlo ke změně v její buněčné distribuci. Podání selektivního inhibitoru PKC $\delta$  (rottlerin) zablokovalo protektivní účinek adaptace na IHH, avšak inhibitor PKC $\epsilon$  (KP-1633) neměl negativní vliv na výsledek této adaptace. Tyto nálezy jednoznačně poukazují na důležitou úlohu PKC $\delta$  v molekulárním mechanismu vzniku ischemické odolnosti myokardu při adaptaci na IHH. Druhá část disertační práce byla zaměřena na zkoumání vlivu diety obsahující různé množství nasycených mastných kyselin (SFA) a mononenasycených nebo polynenasycených mastných kyselin (PUFA) na obsah těchto FA v srdečních diacylglycerolech a fosfolipidech, na jejich možné změny při adaptaci na IHH a možnou souvislost s expresí/distribucí PKC a odolností myokardu k ischemicko-reperfúznímu poškození. Ukázalo se, že zatímco u potkanů krmených dietou obohacenou SFA a n-3 PUFA snížila adaptace na IHH velikost infarktového ložiska, u zvířat krmených n-6 PUFA se protektivní efekt IHH na velikosti infarktu neprojevil. Srdce těchto zvířat však vykazovala výrazně vyšší odolnost již před adaptací na IHH v porovnání se skupinou krmenou n-3 PUFA. Dále bylo zjištěno, že složení diety má vliv na poměr (SFA+mononenasycené FA)/PUFA v srdečních diacylglycerolech, ale nemění podíl SFA, mononenasycených FA a celkových PUFA v srdečních fosfolipidech. Adaptace na IHH ovlivnila poměr n-6/n-3 PUFA v srdečních diacylglycerolech i fosfolipidech. Současně byl zaznamenán také vliv složení diety na hladiny PKC $\delta$  a PKC $\epsilon$  v membránově vázané a cytosolární frakci myokardu. Hlavním důležitým zjištěním vyplývajícím z těchto experimentů byla inverzní korelace mezi zvyšujícím se množstvím membránově vázané PKC $\delta$  v myokardu potkanů krmených dietou obohacenou n-6 PUFA a velikostí infarktu. U PKC $\epsilon$  takováto závislost nebyla pozorována, což podporuje představu o klíčové roli PKC $\delta$  při navození kardioprotekce.

#### Otázky k diskusi:

1. V experimentech s KP-1633 (inhibitor PKC $\epsilon$ ) bylo zjištěno, že při sledování metabolické inhibice vedla aplikace tohoto blokátoru k buňkám v kombinaci s ethanolem ke zvýšenému uvolnění LDH (asi o 40 %) oproti kontrole (Fig. 16). Podání samotného KP-1633 nebo ethanolu mělo tendenci uvonění LDH snížit. Je možné to nějak vysvětlit?
2. Kardioprotektivní účinky adaptace na chronickou hypoxii mohou přetrvávat až po dobu několika týdnů od ukončení expozice k hypoxickým podmínkám. Je známo něco o tom, zda a jak dlouho mohou přetrvávat změny v expresi/distribuci PKC v myokardu?
3. Autorka uvádí, že rottlerin (inhibitor PKC $\delta$ ) ovlivňuje redistribuci PKC $\delta$  vyvolanou adaptací na IHH (Fig. 10). Z příslušné publikace (příloha 1) vyplývá, že rottlerin byl zvířatům aplikován jednorázově 15 min před vyjmutím srdce, avšak zřejmě ne během adaptace na hypoxii – jedná se tedy o akutní efekt této látky. Jak je možné si představit, že rottlerin může vyvolat určitou redistribuci PKC $\delta$  v myokardu potkanů adaptovaných na IHH ale nikoliv u normoxických zvířat?

4. V práci zaměřené na sledování vlivu diety na PKC v myokardu a odolnost srdce k ischemicko-reperfúznímu poškození se uvádí, že potkani byli krmeni různou dietou (obohacenou SFA nebo PUFA) po dobu 4 týdnů a následně adaptováni na IHH dalších 5-6 týdnů. Z popisu však není zcela zřejmé, zda i v době této adaptace byla různým skupinám zvířat podávána různá speciální nebo standardní dieta. Je známo něco o přetrvávání případných kardioprotektivních účinků speciální diety i po jejím vysazení? V práci není uvedeno porovnání výsledků získaných při podávání různé speciální diety s výsledky u zvířat krmených standardní dietou. Jaké rozdíly nebo podobnosti by bylo možné při takovém porovnání očekávat?

Závěrem je třeba uvést, že Mgr. Hlaváčková sepsáním své disertační práce prokázala, že se výborně orientuje ve studované problematice. Autorčin významný podíl na vzniku jednotlivých publikací je jednoznačně deklarován a potvrzuje její praktické zkušenosti s aplikací různých biochemických technik ve fyziologicky orientovaném výzkumu jakožto i její schopnost kritického hodnocení získaných výsledků při jejich zpracování a prezentaci formou odborných sdělení. Vzhledem k těmto skutečnostem a celkově vysoké kvalitě disertační práce splňující svojí formou i obsahem veškeré požadavky kladené na tento typ práce doporučuji, aby Mgr. Hlaváčkové byl po úspěšné obhajobě udělen titul Ph.D.

V Praze 1.6.2012

RNDr. Jiří Novotný, DSc.  
Katedra fyziologie  
Přírodovědecká fakulta UK v Praze