

## Posudek disertační práce

**Název práce:** Svalová slabost kriticky nemocných: role mitochondriální dysfunkce v její patogenezi.

**Autorka:** MUDr. Kateřina Jiroutková

**Oponent :** MUDr. Jan Maňák, Ph.D., III. Interní klinika gerontologická a metabolická, FN Hradec Králové

Předložená práce se zabývá popisem mitochondriálních funkcí kriticky nemocných s prokázanou slabostí kosterních svalů. Jedná se o in vitro experimenty na homogenátech kosterního svalu a na tkáňových kulturách myoblastů a myotub postižených pacientů ve srovnání s kontrolním souborem podobně starých, metabolicky zdravých a stabilních pacientů.

Samotná práce má 81 stran, z toho 67 stran textu, který je doplněn literaturou s 239 odkazy a přílohou v podobě autorčiných publikací. Čtyři publikace v časopisech s impakt faktorem se přímo týkají tématu práce. Dr. Jiroutková je uvedena jako první autor ve dvou těchto pracech.

Volba tématu je excelentní. Svalová slabost kriticky nemocných je klinický i ekonomický problém, kterému je v posledních dvou dekadách věnována stále se zvyšující pozornost. Rozvoj svalové slabosti u nemocného v kritickém stavu vede k prodlužování jeho závislosti na ventilátoru a pobytu na jednotce intenzivní péče i v nemocnici, k vyššímu počtu nozokomiálních infekcí, je spojen s vyšší mortalitou a s podstatně horší dlouhodobou kvalitou života po propuštění. Jakkoliv jsou dobře prostudovány projevy a následky této poruchy, o její patogenezi je poznatků podstatně méně a studie týkající se mitochondriální dysfunkce u této jednotky zcela chybí. V tomto smyslu je zvolené téma zcela originální.

### Metody

Práce je založena na in vitro studiích jednak na homogenátech lidských svalů a jednak na živých kulturách myoblastů a myotub. Vzorky svalů byly získány od svalově slabých kriticky nemocných a od kontrolního souboru metabolicky zdravých pacientů podstupujících elektivní ortopedický výkon.

Předmětem měření byla respirační aktivita, analyzovaná pomocí vysokoúčinné respirometrie, dále spektrofotometrické stanovení jednotlivých komplexů dýchacího řetězce a jejich koncentrace metodou western blot. Na buněčných kulturách byly studovány respirační parametry mitochondrií pomocí extracelulárního fluxu a dále vliv složení extracelulárního prostředí na bioenergetické funkce.

Experimenty jsou založeny na robustní metodologii a logicky se rozvíjejícím systému studií mitochondriálních funkcí, velmi pečlivě jsou zpracovány i technické otázky jako vliv bioptické techniky a manipulačního času na výsledky měření.

Metoda vysokoúčinné respirometrie na homogenátu lidského svalu a analýza extracelulárního fluxu lidských myotub byla použita a publikována vůbec poprvé.

Výsledky jsou zpracovány přehlednou formou tabulek a grafů a přinášejí originální a cenná data:

- deplece komplexů III a IV, které korespondují se snížením schopnosti aerobní fosforylace o cca 50%
- nebyly nalezeny známky mitochondriálního uncouplingu
- signifikantní zvýšení kapacity oxidovat mastné kyseliny v kultuře myotub svalově slabých pacientů
- překvapivá schopnost abnormálně nízkých i vysokých hladin glutaminu způsobit uncoupling a následné snížení kapacity respiračního řetězce

Diskuse a závěry všech studií jsou vedeny velmi kriticky, se zjevnou velmi dobrou znalostí současné úrovně vědomostí v dané problematice. Autorka střizlivě a zcela adekvátně hodnotí výsledky vlastních studií v kontextu světového písemnictví a vytváří logické hypotézy k vysvětlení získaných dat.

Jednoznačnými klady práce jsou nově zavedené metody a zcela originální data jimi získaná. Přímé využití těchto dat v klinické praxi není možné, ale znalost patofyziologie studovaného, velmi závažného jevu, může položit základy velmi hodnotnému klinickému výzkumu.

Určitou slabinou této práce, jež se dle názvu zabývá patogenezi svalové slabosti kriticky nemocných, je výběr pacientů. Jedná se o relativně malý počet (n=8) nemocných v 7.-8. deceniu, kteří mají a priori již z důvodu věku úbytek kosterních svalů a porušenou svalovou regeneraci. Podstatné ale je, že vstupním kritériem byla již rozvinutá svalová slabost po nejméně dvou týdnech umělé plicní ventilace. Znamená to, že patogenetický proces ke slabosti vedoucí pravděpodobně již proběhl a že nalezené abnormality jsou již jeho výsledkem. Je to dáno i skutečností, že do studie mohli být zařazeni pacienti až tehdy, kdy bylo možno vůbec slabost klinicky diagnostikovat, tj. až po nabytí vědomí a spolupráce při provádění svalového testu a po podepsání informovaného souhlasu, tj. konkrétně 15.-41. den po vzniku kritického stavu. Výsledky práce je proto možno nahlížet spíše jako popis plně rozvinuté poruchy, možná již s rysy reparace a regenerace, než jako studii patogeneze. Dlužno podotknout, že časnější diagnostika nervosvalové slabosti je technicky velmi náročná a postrádá tu nejdůležitější, tj. funkční složku. Taktéž získání informovaného souhlasu je v dřívějších stadiích obtížné a věk studovaných nemocných, jakkoliv je poměrně vysoký, je reálným obrazem populace na jednotkách intenzivní péče. Uvedená omezení jsou tak prakticky vynucena povahou studovaného jevu a studii by bylo těžko možné provést jinak.

Publikace výsledků je velmi dobře vyvážená: originální práce jsou publikovány v kvalitních mezinárodních periodících s vysokým impakt faktorem, zatímco přiložená přehledná práce popisující současný stav vědomostí je otištěna v recenzovaném domácím časopisu pro potřeby české odborné veřejnosti.

Dovoluji si autorce položit dvě doplňující otázky:

1. Nalezeno bylo statisticky signifikantní, zhruba 50%, snížení kapacity oxidativní fosforylace a kapacity respiračního řetězce proti zdravým kontrolám při přepočtu na mokrou váhu svalu, nikoliv však po normalizaci na aktivitu citrát syntázy. Je známo, že již po týdnu kritického stavu se snižuje objem svalu měřený ultrazvukem zhruba o 10%, při měření průměrů vláken histologicky o 20%, poměr protein/DNA o cca 30%, což bývá vysvětlováno zvýšeným obsahem vody ve svalové tkáni (Puthucheary, JAMA 2013). Mohl také výsledek měření oxidativní fosforylace a respiračního řetězce vztažený na mokrou váhu být ovlivněn otokem svalů, respektive úbytkem svalové hmoty maskovaným pozitivní bilancí tekutin? Lze uvedené funkce vztáhnout k jiné veličině, např. obsahu DNA ve svalu?
2. Biopsie byly provedeny ve značně rozdílných intervalech od primárního inzultu. Bylo by možné nalézt nějaké rozdíly mezi svaly studovaných jedinců, které by byly charakteristické pro dané stadium poruchy, tj. např. rozdíly mezi svaly odebranými 2 týdny po začátku proti svalům odebraným později, např. v 5.-6. týdnu?

Závěr:

Předložená práce je metodologicky velmi náročná a originální a poskytuje nová, dosud nepublikovaná data. Vysoká kvalita těchto výsledků je dokumentována i úspěšnou publikační aktivitou na poli mezinárodních i domácích periodik a jednoznačně dokládá schopnost MUDr. Kateřiny Jiroutkové vědecky pracovat.

Doporučuji proto autorce udělit titul Ph.D..

  
MUDr. Jan Maňák, Ph.D.

V Hradci Králové 16.10.2016