

V Praze, dne 9 července 2015

Prof. MUDr. Vladimír Komárek, CSc.
děkan fakulty
Univerzita Karlova v Praze 2. lékařská fakulta
V Úvalu 84, 150 06 Praha 5

Věc: „posudek na doktorskou dizertační práci“

Vážený pane děkane,

s potěšením jsem vypracoval posudek na dizertační práci s názvem „**Reaktivita plicních cév na hypoxii – senzitivita cévních hladkých svalových buněk k vápníku**“, kterou vypracoval MUDr. Karel Koubský. Posudek je strukturován dle Vašeho doporučení.

A. Úvod – aktuálnost řešeného tématu.

Dizertační práce se zabývá problematikou hypoxické plicní vazokonstrikce (HPV) a potenciální úlohou tohoto mechanismu v patofyziologii hypoxické plicní hypertenze (HPH). Jedná se o velmi zajímavé a stále aktuální fyziologické téma, které má i klinický význam. Autor ve velmi elegantním úvodu diskutuje fyziologický význam HPV a věnuje se mechanismům, které by mohly být za tento jev odpovědné. V této souvislosti autor zejména diskutuje současné znalosti o úloze vápníku při HPV.

Dle mého názoru, jsou kapitoly o úloze vápníku v první a druhé fázi HPV a o úloze změn senzitivity hladkých svalových buněk k vápníku v kontrakci hladkých svalových buněk plicních cév mimořádně kvalitní.

Autor následně diskutuje současné znalosti o úloze reaktivních sloučenin kyslíku (ROS) v mechanismu HPV a je potřeba ocenit, že velmi dobře vystihuje rozpory obou teorií ohledně úlohy ROS v mechanismu HPV.

V následující kapitole autor stručně, ale jasně diskutuje současné znalosti ohledně patofyziologie HPH. V této souvislosti je potřeba ocenit pohled autora, že je potřeba HPH spíše než jako nemoc, vnímat jako fyziologický (a následně patofyziologický) adaptační proces vůči chronické hypoxii. V této kapitole autor diskutuje úlohu ROS v patofyziologii HPH. S ohledem na významnou úlohu ROS v tomto procesu, autor velmi dobře diskutuje úlohu tzv. „uncoupling“ (rozpřažení) syntázy oxidu dusnatého (NO) jako jeden z možných zdrojů zvýšené produkce ROS během chronické hypoxie.

V této souvislosti je dobře popsána úloha nedostatku (a to jak absolutního, či relativního) tetrahydrobiopterinu (BH4), což je důležitý kofaktor NO syntázy, v procesu rozpražení NO syntázy a následné zvýšené produkce ROS. V závěru této kapitoly jsou diskutovány (a to opět velmi dobře) současné znalosti ohledně úlohy Rho kinázy v mechanismu HPV a patofyziologie HPH.

Moje připomínky k této úvodní kapitole budou zmíněny v příslušné části posudku, ale souhrnně lze říci, že již z úvodu dizertační práce je patrné, že:

- a) Autor má velmi důkladné znalosti v oblasti fyziologie HPV a patofyziologie HPH.
- b) Tento úvod jednoznačně zdůvodňuje, proč se autor zaměřil na studium Rho kinázy, rozpražení NO syntázy a úlohy inhibitorů tyrosinkináz v regulaci senzitivity cévních hladkých svalových buněk k vápníku ať už v zprostředkování HPV, či v rozvoji HPH.

Již po prostudování úvodu této dizertační práce, lze jednoznačně říci, že **autor má schopnost samostatné vědecké práce s literaturou a definování vědeckých hypotéz, což je nezbytným předpokladem pro „udělení titulu Ph.D.“**

B. Zhodnocení výsledků vlastní dizertační práce

Vlastní práce se zaměřuje na studium tří mechanismů, které mohou ovlivňovat aktivitu fosfatázy lehkého řetězce myozinu (MLCP) a následně tak regulovat senzitivitu hladkých svalových buněk plicních cév k vápníku. Jedná se o následující tři dílčí studie:

1. Úloha Rho kinázy.

Tato dílčí studie je založena na hypotéze, že akutní inhibice Rho kináz bude u zvířat s HPH působit vazodilataci v plicním řečišti a chronická inhibice zmírní, až zabráni rozvoji HPH.

Vlastní experimenty byly provedeny na modelu izolovaných, perfundovaných plic, což je velmi dobře zavedený model v laboratoři prof. Hergeta. Jako dominantní parametr pro hodnocení byla použita metoda vyhodnocování sklonu přímky („slope“) mezi perfuzním tlakem (P) a průtokem (Q) a to za podmínek konstantního Q. Tato metodika hodnocení sklonu „slope“ P/Q je velmi dobře akceptovaná a v principu lze říci, že hodnota „slope“ odpovídá rezistenci, kterou klade plicní cévní řečiště zvyšujícímu se Q. Autor zjistil následující fakta:

- a) U kontrolních zvířat (tj. vystavených normoxii), velikost HPV i vazokonstrikce způsobené akutním podáním angiotenzinu II (ANG II) byla po podání fasudilu (inhibitor Rho kinázy) do perfuzátu signifikantně snížena.
- b) Akutní podání fasudilu u kontrolních zvířat nemělo vliv na P/Q „slope“, ale u zvířat vystavených chronické hypoxii signifikantně snížilo hodnoty průsečíku přímky „slope“ s osou perfuzního P.

- c) Chronická inhibice Rho kinázy pomocí fasudilu způsobila signifikantní pokles „slope“ u zvířat vystavených chronické hypoxii.

Výsledky těchto experimentů potvrdili autorovu hypotézu, že jak během HPV, tak i HPH dochází k aktivaci Rho kináz, což následně významně přispívá k zvýšené senzitivitě hladkých svalových buněk plicních cév k vápníku.

Dle mého názoru, jsou experimenty velmi dobře naplánovány, dobře provedeny a interpretovány. Jsou zcela objektivně diskutovány všechny limitace a alternativní vysvětlení získaných výsledků. Závěry, které jsou činěny v této první dílčí studii, jsou dle mého názoru jednoznačně podloženy výsledky experimentálních studií.

2. Úloha rozpražení NO syntázy

Tato dílčí studie je založena na hypotéze, že zvýšená produkce ROS a celkově zvýšený oxidační stres za podmínek chronické hypoxie snižuje dostupnost BH4 v buňce, což způsobí rozpražení NO syntázy a sníženou produkci NO a dále zvyšovat produkci ROS. Snížená dostupnost NO snižuje aktivitu MLCP a následně tak zvyšuje senzitivitu hladkých svalových buněk plicních cév k vápníku. Exogenní podání BH4 by mělo zabránit rozpražení NO syntázy a zmírnit HPV.

Autor zjistil následující fakta:

- Infuze BH4 inhibovala HPV v experimentu na izolovaných plicích a izolovaných periférních plicních cévách, ale pouze u kontrolních zvířat a ne u zvířat vystavených 4 dnům hypoxie.
- Tento vazodilatační účinek byl zablokovan podáním L-NAME (neselektivní inhibitor NO syntázy).
- Podání BH4 zvyšuje produkci NO v plicích a to jak u kontrolních zvířat, tak i u zvířat vystavených chronické hypoxii.

Výsledky těchto experimentů potvrdili autorovu hypotézu, že BH4 vykazuje inhibiční účinek na HPV u kontrolních zvířat. Avšak zcela novým a nečekaným nálezem bylo zjištění, že podání BH4 nemělo vliv na HPV v izolovaných plicích u skupiny zvířat vystavených 4 dnům hypoxie a že vazodilatační účinek v izolovaných periférních cévách byl u těchto zvířat menší ve srovnání s kontrolními zvířaty.

Dle mého názoru, jsou experimenty opět velmi dobře naplánovány a provedeny. Mimořádně oceňuje velmi kvalifikovanou diskuzi nečekaných nálezů vlivu podání BH4 u potkanů vystavených 4 dnům hypoxie. Rovněž oceňuje diskuzi ohledně limitace této studie, specificky diskuzi na téma, že všechna data ohledně úlohy možného rozpražení NO syntázy v patofyziologii HPH vycházejí z nepřímých měření. Tento způsob diskuze a připuštění limitací vlastních experimentů, dále potvrzuje můj názor, **že autor je plně schopen samostatné vědecké práce.**

3. Úloha inhibice tyrosinkináz

Tato dílčí studie vycházela z nedávných studií, které naznačovaly, že příznivý vliv inhibitorů tyrosinkináz na zmírnění rozvoje HPH nemusí být způsoben pouze jejich inhibičním účinkem na remodelaci plicních cév, ale rovněž přímým vazodilatačním účinkem v plicním řečišti.

Výsledky této studie prokázaly jak v experimentech *in vivo* (katetrizační experimenty spojené s měřením hemodynamiky), tak v experimentech *in vitro* (studium vazodilatačních účinků inhibitorů tyrosinkináz na izolovaných velkých plicních cévách), že tato hypotéza je z velké části pravdivá.

Dle mého názoru, i experimenty v této dílčí studii jsou provedeny kvalitně.

Souhrnné zhodnocení dosažených výsledků vlastní dizertační práce:

Autor získal celou řadu nových dat a dále rozšířil poznatky ohledně fyziologie HPV a patofyziologie HPH a souhrnně lze říci, že výsledky jeho studií potvrzují hypotézu, že zvýšená senzitivita hladkých svalových buněk plicních cév kvápníku hraje významnou úlohu jak ve zprostředkování HPV, tak i v rozvoji HPH. Tyto poznatky otevírají teoreticky nové možnosti pro terapeutické ovlivnění HPH.

C. Zhodnocení úrovně publikací, které jsou součástí dizertační práce

Na první pohled se může vlastní publikační činnost doktoranda jevit skromnou, neboť doktorand má pouze dvě publikace *in extenso*. Ovšem při bližším prostudování, můžeme dle mého názoru konstatovat, že zejména z publikace v časopise *Respir Physio Neurobiol* je patrné, že tato publikace je jednoznačně výsledkem jeho vlastní činnosti a je dominantním základem jeho dizertační práce. Druhá publikace, která zřejmě vznikla během jeho studijního pobytu v USA, je zaměřena na problematiku spojenou s farmakologickou inhibicí tyrosinkináz. ***Dle mého názoru, je publikační činnost doktoranda dostačující pro udělení titulu Ph.D.***

D. Připomínky a dotazy oponenta

K práci mám následující připomínky, ale předem si dovoluji zdůraznit, že nejsou zásadního charakteru a jsou spíše podnětem k zamyšlení pro budoucí činnost doktoranda:

- a) V textu dizertace jsem na úvod postrádal seznam zkratk, neboť doktorand zprvu zkratky definuje, ale pak sám někdy zkratku nepoužívá a následně jí opět začne používat, toto se zejména týká používání zkratky „HPV a sousloví hypoxická plicní vazokonstrikce“ (podobných termínů je v dizertaci více). Seznam zkratk by umožnil čtenáři lepší přehlednost.

- b) V úvodu jsem postrádal lepší členění, které by zvýšilo didaktickou hodnotu dizertace. Myslím, že inspirací by mohlo být členění, které v posledním přehledném článku používal Sylvester et al. 2012 a na tento přehledný článek se autor sám odvolává.
- c) Autor tvrdí (strana 6, poslední odstavec), že role napětově řízených vápníkových kanálů typu T (tzv. tranzietních) není u HPV jasná a to zejména proto, že není k dispozici selektivní antagonisty těchto kanálů a tudíž nemůže být tato problematika studována. Toto tvrzení se dle mého názoru již nezakládá na validních informacích, neboť antagonisté vápníkových kanálů typu T jsou již k dispozici.
- d) Dle mého názoru členění dizertace není šťastné, neboť autor vždy definuje cíle a hypotézy (a rovněž metody, výsledky a diskuze) současně ke všem třem dílčím studiím. Tudíž čtenář musí vždy listovat vpřed a následně zpět. Osobně si myslím, že bylo vhodnější psát dizertaci lineárně, tj. po jednotlivých dílčích studiích (např. začít úlohou Rho kináz od hypotézy, přes metodiku, výsledky až diskuze) a následně pokračovat s druhou a třetí dílčí studií).

Na autora mám následující dotazy, na které bych prosil odpovědět:

- a) Autor na straně 16 (řádky 16 až 21) pravdivě uvádí, že poměr BH4/BH2 je regulován dihydrofolátreduktázou (DHFR), která se podílí na regeneraci oxidovaného BH2 zpět na BH4 a že exprese DHFR je inhibována ANG II. Toto je vše pravda, ale pak je zde věta: „*Naše pracovní skupina již dříve ukázala, že inhibice angiotenzin-konvertujícího enzymu brání rozvoji HPH*“.

Oponentovi není jasný smysl této věty. Znamená to, že autor chce říci, že příznivý účinek léčby pomocí inhibitorů angiotenzin-konvertujícího enzymu na rozvoj HPH ve studii Hergeta et al. 1996 byl nějak spojen s účinkem na DHFR, potažmo BH4? Prosím o vysvětlení.

- b) V této souvislosti bych ocenil autorův názor a pohled na úlohu renin-angiotenzinového systému (RAS), jakožto modulačního faktoru (dle názoru skupiny prof. Warda) ve zprostředkování HPV a patofyziologii HPH. Zejména bych ocenil autorův názor na rozporuplné výsledky experimentálních studií, z nichž některé dokonce tvrdí, že ANG II zmírňuje rozvoj HPH.
- c) Můj dotaz na úlohu RAS je ještě více zdůrazněn známým faktem, že zvýšená aktivita RAS hraje významnou úlohu v produkci ROS, zvýšeného oxidativního stresu v systémové cirkulaci a orgánovém poškození srdce, cév a ledvin. Sám autor na straně 47 (poslední řádka) uvádí, že ANG II způsobuje rozpřážení NO syntázy. Tudíž mě dále zajímá autorův názor na úlohu RAS v rozpřážení NO syntázy v jeho vlastní studii a úloze v patofyziologii HPH. Jsem si vědom, že úloha RAS nebyla předmětem jeho studia, ale chtěl bych znát jeho názor.

Závěr:

Na základě podrobného prostudování dizertační práce a publikační činnosti autora konstatuji, že doktorand dle mého názoru má všechny předpoklady k samostatné tvořivé vědecké práci a v případě úspěšné obhajoby doporučuji MUDr. Karla Koubského k udělení titulu „Ph.D.“.

S přátelským pozdravem,



Prof. MUDr. Luděk Červenka, CSc., MBA.