

Oponentský posudek doktorské disertační práce MUDr. Karla Koubského:

Reaktivita plicních cév na hypoxii. Senzitivita cévních hladkých svalových buněk k vápníku.

Předložená disertační práce MUDr. Karla Koubského byla vypracována v Ústavu fyziologie 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze. Byla vytvořena na základě dvou článků publikovaných v kvalitních impaktovaných mezinárodních časopisech (IF: 1.97; 3.99), z nichž v jednom případě je Dr. Koubský prvním autorem. Kopie těchto publikací jsou součástí vlastního díla a tvoří samostatné přílohy.

Disertační práce se zabývá úlohou Rho kináz, tyrozinkináz a mechanismem syntézy a recyklace kofaktoru NO syntázy tetrahydrobiopterinu (BH4) v rozvoji hypoxické plicní hypertenze (HPH) u laboratorního potkana. Za hlavní nálezy práce Dr. Koubského považují:

1. Při HPH dochází ke zvýšené senzitivaci plicních cév k vápníku, kterou lze potlačit podáním inhibitorů Rho kináz a tyrozinkináz.
2. Pomocí zvýšené koncentrace kofaktoru NO syntázy BH4 lze zvýšit tvorbu NO (pravděpodobně mechanismem opětovného spřažení NO syntézy) a snížit tak senzitivu plicních cév k vápníku.

Práce je klasicky členěna, úvodní část tvoří literární přehled (22 stran), ve kterém autor definuje základní pojmy studované problematiky (hypoxická plicní vazokonstrikce a hypertenze, úloha vápníku při HPH a mechanismy jeho regulace, význam reaktivních forem kyslíku a dusíku v rozvoji HPH). Teoretický přehled je doplněn o dvě přehledná schémata názorně demonstrující buněčné signální dráhy, kterými se autor ve svých studiích zabýval. V jinak odborně dobře zpracovaném textu literárního úvodu jsem postrádal obsáhlejší kapitolu zabývající se problematikou tyrozinkináz a jejich inhibitorů. Vzhledem k tomu, že tématu tyrozinkináz se týká jeden z autorových článků a taktéž jsou tyrozinkinázy aktuálním tématem experimentálního a klinického kardiovaskulárního výzkumu, zasloužila by si tato problematika asi větší prostor.

Následujících 10 stran seznamuje čtenáře s použitými metodickými postupy. Text této kapitoly je systematicky rozčleněn do tří studovaných okruhů (inhibitory Rho kináz, problematika BH4 a inhibitory tyrozin kináz) a i přes svoji stručnost v některých pasážích (např. Western blot pro regulační podjednotky fosfatázy MYPT1 a lehkého řetězce myozinu) je zcela dostačující.

Výsledky tvoří 10 stran a jsou dokumentovány na 13 přehledných grafech. Na jasně prezentované výsledky navazuje 11 stran diskuze včetně závěrečného shrnutí. V diskuzi je adekvátní část věnována všem třem tematickým okruhům a je z ní patrná schopnost autora analyzovat dosažené výsledky do hloubky a v kontextu současného vědeckého poznání. Vlastní spis je pak zakončen přehledem citací (147).

Předloženou disertační práci považuji za zdařilý spis. Některé své drobné připomínky jsem již zmínil výše, nicméně si dovoluji mít ještě dvě poznámky. i) Ve výsledkové části Rho kinázové studie se zdá, že některé grafy (např. Obr. 4.3.) jsou prezentovány jako průměr a standardní odchylka (SD) a ne jako průměr a standardní chyba průměru (SEM), jak uvádíte v metodické části disertace. ii) Seznam zkratk by jistě usnadnil orientaci v jinak fundovaném odborném textu i ne zcela zasvěceným čtenářům. Tyto mé připomínky však nemají zásadní vliv na jinak celkově kladné hodnocení práce.

K vlastnímu obsahu práce mám následující dotazy:

- 1) Jaká je úloha Rho kinázy za fyziologických podmínek v plicním oběhu resp. kardiovaskulárním systému? Dochází v důsledku chronické hypoxie k aktivaci Rho kinázy i v jiných orgánech, např. v srdci, nebo se jedná o orgánově specifickou odpověď na hypoxický podnět?
- 2) Jak uvádíte v literárním přehledu, akutní hypoxie zvyšuje aktivitu Rho kinázy, která inhibuje fosfatázu lehkého řetězce myozinu (MLC), čímž dochází k posunu rovnováhy kináza-fosfatáza MLC, nárůstu fosforylovaných MLC, zvýšení senzitivity hladkých svalových buněk k Ca^{2+} a vazokonstrikci. Fosfatáza MLC může být také blokována CPI-17 (inhibitor fosfatázy potencovaný C-kinázou), jež je aktivován fosforylací protein kinázou C (PKC). Nabízí se tedy otázka, jaká je úloha PKC v mechanismu rozvoje hypoxické plicní hypertenze a vazokonstrikce? Hrají roli v aktivaci CPI-17 PKC izoformy patřící do třídy klasických PKC, závislých na Ca^{2+} (např. izoformy α a β) nebo atypické PKC na Ca^{2+} nezávislé (izoformy δ a ϵ)?

- 3) Koncept rozpřažení NO syntáz při hypoxické plicní hypertenzi a jejich opětovné spřažení farmakologickými zásahy do mechanismů syntézy a recyklace BH4 představuje zajímavý a nadějný terapeutický přístup. Může se tento koncept obnovy produkce NO uplatňovat i při jiných na NO-dependentních patofyziologických situacích než je plicní hypertenze?
- 4) Ve vaší druhé studii jste testovali vazodilatační účinky třech inhibitorů tyrosinkináz (imatinib, nilotinib a sorafenib). Čím se tato farmaka od sebe liší? Máte nějakou hypotézu, jaký mechanismus může být zodpovědný za výraznější vasodilatační účinek nilotinibu a sorafenibu?

Z pohledu oponenta je zřejmé, že výzkumná práce MUDr. Karla Koubského vedla k získání důležitých výsledků, které byly publikovány v kvalitních odborných periodikách. Po formální i odborné stránce nemá práce zásadní nedostatky. Domnívám se proto, že disertace splňuje kritéria stanovená zákonem, a proto ji doporučuji přijmout k obhajobě a MUDr. Karlu Koubskému udělit příslušný titul.

V Praze dne 28. 8. 2015

RNDr. Jan Neckář, Ph.D.
Fyziologický ústav AV ČR