

POSUDEK DISERTAČNÍ PRÁCE

„Mechanismy regulace fetoplacentárního cévního řečiště při hypoxii“

Studijní program: Fyziologie a patofyziologie člověka

Předseda oborové rady: Prof. MUDr. Jaroslav Pokorný, DrSc.

Školící pracoviště: Ústav fyziologie, Univerzita Karlova v Praze, 2. LF UK

Autor: MUDr. Petr K a f k a

Školitel: Prof. MUDr. Karel Cvachovec, CSc., MBA

TÉMATICKÉ ZAMĚŘENÍ A AKTUÁLNOST ŘEŠENÉHO TÉMATU

Disertační práce se zabývá vybranými mechanismy regulace fetoplacentárního cévního řečiště při hypoxii. Přirozený průběh těhotenství provází významné hemodynamické změny s fyziologickou vazodilatací děložní a systémové cirkulace pro zajištění potřeb vyvíjejícího se plodu, zejména oxygenace a výživy.

Hypoxií vyvolané změny fetoplacentární cirkulace na jedné straně reflektují závažnou pregestační nebo těhotenskou morbiditu (zejména hypertenzi, preeklampsii nebo diabetes), na straně druhé představují přímé ohrožení vývoje, růstu a zrání plodu (tzv. “fetal well-being”). Přes veškeré vynaložené badatelské úsilí je zde řada otázek týkajících se mechanismů regulace fetoplacentárního cévního řečiště, které čekají na odpověď. Zvolené téma dizertační práce považuji za aktuální jak z hlediska základního výzkumu, tak klinické praxe.

PRACOVNÍ HYPOTÉZY A STANOVENÉ CÍLE

Doktorská disertační práce se skládá ze tří navazujících oddílů (experimentů), věnovaných účinkům akutní hypoxie, chronické hypoxie a diabetické hyperglykémie na fetoplacentární cévy laboratorního potkana.

Experiment 1 „Vliv inhibice Rho kinázy na reaktivitu fetoplacentárních cév při normoxii a akutní hypoxii“. Cílem experimentu bylo ověřit hypotézu, že aktivace Rho kinázy přispívá k akutní hypoxické fetoplacentární vazokonstrikci (HFPV), resp. že inhibice enzymatické aktivity redukuje bazální cévní rezistenci a vazokonstrikční odpověď na hypoxii fetální části placenty.

Experiment 2 „Vliv chronické hypoxie na periferní cévní odpor placenty laboratorního potkana při perfuzi krví“. Záměrem bylo potvrdit, že perfuze fetoplacentárních cév roztokem o vysoké viskozitě (krví), na rozdíl od solného roztoku, zvýší rozdíly cévního odporu placent vystavených chronické hypoxii při srovnání s normoxickými placentami.

Experimenty 3A, 3B „Vliv diabetu matky, resp. vliv diabetu matky a chronické hypoxie na fetoplacentární cévní rezistenci (neonatální model diabetu)“. Pokusy měly ověřit, zda diabetická hyperglykémie zvýší cévní odpor placentárního řečiště plodů diabetických samic potkana, a že koincidence diabetu a chronické hypoxie má aditivní efekt.

Závěr: - pracovní hypotézy a stanovené cíle vycházejí ze současných poznatků fyziologie a patofyziologie fetoplacentární cirkulace, což svědčí o dobré orientaci doktoranda ve zvolené problematice.

POSTUPY A METODY

a) Všechny experimenty byly provedeny na březích samicích potkanů kmene Wistar, na modelu izolované, dvojité perfundované placenty laboratorního potkana. Součástí protokolu byly analýzy

vzorků perfuzátu z umbilikální vény (stanovující pH, pO₂, pCO₂) a měření perfuzního tlaku v reálném čase na obou stranách placenty (P/Q poměr, vyjádřený směrnici a interceptem).

b) *Experiment 1* - akutní hypoxický stimulus v délce 15 min. byl vyvolán perfuzátem s přívodem hypoxické směsi plynů. K zablokování Rho kinázy byl použit specifický blokátor *fasudil*.

c) *Experimenty 2, 3* - chronická hypoxie březích samic byla indukována izobarickou hypoxií (FiO₂ 0.1) během posledních 7 dnů březosti. Při pokusu 2 heparinizovaná krev k perfuzi, odebraná dospělým samicím potkana, byla sycena normoxickou směsí plynů. Po 10 minutové perfuzi krví byl měřen perfuzní tlak při konstantním bazálním průtoku 1 ml/min. a závislost průtoku na tlaku (P/Q).

d) *Experiment 3A* - vliv hyperglykémie matky na fetoplacentární cévní odpor byl studován na modelu diabetického březího potkana (vyvolán i. p. podáním *streptozotocinu* (STZ) 14. den březosti). Glykemie > 10 mmol/l indikovala zařazení do diabetické skupiny. Pokus proveden 20. den březosti, během normoxie/hypoxie opět měřen perfuzní tlak jak při bazální, tak při postupně zvyšovaném průtoku, se stanovením P/Q.

e) *Experiment 3B* zahrnoval 4 skupiny zvířat (s diabetem, po expozici chronické hypoxii, s diabetem + chronickou hypoxií a kontrolní skupinu). Pokus proveden na „neonatálním modelu diabetu“ (tj. STZ podán mláďatům 2. – 3. den po porodu). Glykemie > 8 mmol/l, zachycená alespoň 1x mezi 6. – 10. týdnem indikovala zařazení do diabetické skupiny. 11. týden života byly diabetické i kontrolní samice přiřpuštěny s nediabetickými samci a zabřezlé samice pak náhodně zařazovány do normoxické (FiO₂ 0.21), resp. hypoxické skupiny (FiO₂ 0.1). K průkazu oxidačního stresu sloužilo stanovení plazmatické koncentrace 3 - nitrotyrosinu.

Závěr: - jedná o standardní postupy a metody používané na školícím pracovišti nebo přejeté z publikací obdobných studií. Jejich volba byla vzhledem k hypotézám a záměrům disertace správná.

VĚDECKY HODNOTNÉ VÝSLEDKY

- Především se jedná o potvrzení významného podílu Rho kinázy na hypoxické fetoplacentární vazokonstrikci při akutní hypoxii, které lze zabránit blokadou enzymatické aktivity specifickým inhibítorem (fasudilem). Zajímavé je zjištění, že podání fasudilu navodilo významné snížení klidového cévního odporu (cca o 18%).
- Úvaha, že prostá vazokonstrikce při chronické hypoxii zřejmě není hlavní příčinou zvýšení cévního odporu v placentárním řečišti je reálná a vybízí hledat alternativní vysvětlení (jako např. autorem uváděnou remodelaci fetoplacentárních cév).
- Experimenty 3A a 3B ukázaly, že chronická hypoxie zvyšuje fetoplacentární cévní rezistenci. Významně vyšší fetoplacentární tlak při konstantním bazálním průtoku byl zjištěn u plodů diabetických matek jak na neonatálním modelu diabetu, tak po aplikaci streptozotocinu březím samicím. Překvapením je, že společné působení diabetu a chronické nemá aditivní účinek.

FORMÁLNÍ STRÁNKA A KVALITA ZPRACOVÁNÍ

Po formální stránce je práce zpracována pečlivě, má 10 kapitol, vč. seznamu citovaných literárních zdrojů a 2 příloh publikací v časopisech s IF, doložených kopií publikace (*Physiol. Res. 2012*), resp. prohlášením redakce časopisu „*Bratislava Medical Journal*“ o přijetí k publikaci.

Disertační práce má 67 stran textu doplněného 20 obrázky a 6 tabulkami. Text je napsán srozumitelně, rozsah teoretické části a prezentace vlastní práce a výsledků odpovídá požadavkům. Diskuzi je věcná, výsledky jsou komentovány v jednotlivých oddílech a následně shrnuty v závěrech dizertační práce. Práce se opírá celkem o 111 literárních citací.

Závěr: - formální stránka i kvalita zpracování odpovídají požadavkům, kladeným na doktorskou disertační práci.

PŘEDNOSTI A NEDOSTATKY DISERTAČNÍ PRÁCE

Téma doktorské disertační práce je nesporně aktuální, kompozice, postupy a metody byly zvoleny správně a odpovídají povaze řešené problematiky. Diskuze je vedená kriticky, výsledky jsou komentovány s rozvahou a srovnávány s publikovanými výsledky obdobných studií. Prezentované poznatky rozšiřují znalosti etiopatogeneze v současnosti hojně diskutované těhotenské morbidity typu hypertenze, preeklampsie a s ní související intrauterinní růstové retardace plodu.

Zásadní připomínky ke kvalitě předkládané práce nemám, snad jen na okraj formální poznámka k tabulce 5.6 na str. 51, která je až příliš bohatá na data na úkor přehlednosti a orientace v nich.

DOTAZY

a) K experimentu 1: - fasudil významně snížil klidový cévní odpor (cca o 18%, viz str. 55). Došlo nejen ke kompletní eliminaci HPFV vyvolané akutní hypoxickou atakou, ale také k poklesu perfuzního tlaku o 15% pod úroveň bazálního tlaku kontrolní skupiny (str. 56). *Je takové snížení klidového fetoplacentárního cévního odporu z hlediska obnovení/zachování fyziologické funkce placentárního řečiště žádoucí?*

b) K experimentům 3A, 3B: - v závěrech o účincích diabetu se uvádí, že diabetes matky zvyšuje fetoplacentární cévní odpor s tím, že na zvýšení se nepodílí jen prostá vazokonstrikce. *Co se rozumí prostou vazokonstrikcí? Jaké další faktory se v této souvislosti mohou významně uplatňovat?*

Společné působení diabetu a chronické hypoxie nemá aditivní účinek. *Je opravdu možné toto pozorování hypoteticky vysvětlit jen tak, že v důsledku diabetu dojde k zúžení ve venózním řečišti, zatímco při chronické hypoxii dojde ke konstrikci rezistentní arteriol?*

c) *Účastní se na regulaci fetoplacentárního cévního řečiště, mimo jiné, také „mechanismus autoregulace fetoplacentární perfuze“?*

ZÁVĚREČNÉ HODNOCENÍ

MUDr. Petr Kafka disertační práci prokázal předpoklady pro samostatnou tvůrčí vědeckou práci. Téma doktorské disertace se bezprostředně dotýká závažné problematiky těhotenské a fetální morbidity. Výsledky, rozšiřující obzor znalostí o mechanismech regulace fetoplacentárního řečiště při akutní a chronické hypoxii, resp. mateřském diabetu, byly souladu s požadavky publikovány ve dvou odborných periodických s IF.

Tím byly splněny všechny požadavky, aby MUDr. Petr Kafka předloženou doktorskou disertační práci obhajoval před odbornou komisí a získal tak titul Ph.D.

Doc. MUDr. Petr Zoban, CSc.

V Praze 5. září 2016