

Oponentský posudek doktorské disertační práce MUDr. Martina Opočenského:

Úloha endotelinového systému v rozvoji hypertenze a hypertenzního orgánového poškození u Ren-2 transgenních potkanů.

Předložená disertační práce MUDr. Martina Opočenského byla vypracována v Institutu klinické a experimentální medicíny v Praze. Byla vytvořena na základě šesti publikací v kvalitních impaktovaných mezinárodních časopisech (mimo jiné Hypertension, IF=6.041), z nichž ve dvou případech je Dr. Opočenský 1. autorem. Je jen škoda, že kopie těchto článků nejsou součástí vlastního díla. Dále se doktorand autorsky podílel na pěti odborných publikacích bez přímého vztahu k tématu disertační práce.

Disertační práce se zabývá významem neselektivní a selektivní farmakologické blokády endotelinových (ET) receptorů (vlivem bosentanu a atrasentanu) na přežívání hypertenzních potkanů a ochranu jejich orgánů (srdce, ledvina) před poškozením v důsledku vysokého krevního tlaku. Pro studium této problematiky byl vybrán i jako model transgenních potkanů s inkorporovaným myším Ren-2 reninovým genem (TRG[mRen2]27), a to jak heterozygotní tak homozygotní jedinci. Jednalo se tedy o model angiotenzin II-dependentní hypertenze. Inhibitory ET receptorů byly podávány potkanům v době rozvoje hypertenze, tj. ode dne odstavu (28. den) a dále od v období, kdy již byla hypertenze plně vyvinuta (od 50. dne).

Úvodní část tvoří literární přehled (21 stran), ve kterém autor definuje základní pojmy studované problematiky (mechanismy regulace krevního tlaku, patofyziologie vzniku hypertenze, hypertenzní model Ren-2 transgenních potkanů). Následují 4 kapitoly (49 stran), které se zabývají řešením dílčích cílů práce a výsledky (dokumentovány 22 grafy a obrázky). Ty jsou bodově shrnuty ještě v závěru práce, na který navazuje seznam použité literatury (192 citovaných zdrojů). Struktura kapitol s výsledky je poněkud atypická, neboť kopíruje strukturu odborného článku (krátký úvod, přehled použitých metodik, výsledky, diskuze). Nejsm si jist, zda-li toto uspořádání není poněkud nešťastné neboť mnoho informací (především metodické postupy, ale i literární nálezy) se opakuje. Domnívám se, že klasické členění textu, tedy samostatné kapitoly metodik, výsledků a diskuze, by práci více prospělo. Především shrnující diskuze by jistě lépe podtrhla vědecký přínos studií, na kterých MUDr. Opočenský pracoval.

K jednotlivým kapitolám disertační práce mám následující konkrétní poznámky, připomínky a dotazy.

Literární přehled:

Souhrnně lze konstatovat, že tato kapitola tvoří obecný úvod do studované problematiky, byť některé pasáže jsou prezentovány nepřesně nebo ne zcela srozumitelně. Např. nesouhlasil bych s tvrzením, že „ET_A receptor je tvořený G proteinem s navázanou fosfolipázou C ...“ (str.14). Pasáž na str. 10 dole, zabývající se vazokonstrikčním resp. vazodilatačním působením renin -angiotenzinového systému se více méně opakuje na následující straně (2. odstavec). Zřejmě zde došlo k chybě v práci s textem, podobně jako v případě Obr. 1 (str. 6), který postrádá označení. Str. 18, 2. odstavec zabývající se hladinou endotelinu u populace hypertenzních Afroameričanů mi připadal velmi komplikovaný a těžko pochopitelný.

Výsledky (Studie 1-4):

Pro všechny výsledkové kapitoly je typické nejednoznačné označení statických významností v grafech. Legendy uvádějící např. „P<0.05 proti neoznačeným kontrolám resp. všem ostatním kontrolám“, což je u některých grafů zavádějící (viz např. obr. 5, str. 29 a jiné). Také se domnívám, že kombinace symbolů významnosti (*, # a pod.) a čar spojující jednotlivé signifikantně odlišné skupiny je kontraproduktivní a zhoršuje orientaci v grafech (viz obr. 17).

Ve všech experimentálních studiích byla histologicky vyšetřována míra poškození glomerulů, tzv. glomerulosklérózní index (GSI). V kapitole 1 a 3 byla využita semikvantitativní metoda stanovující stupeň poškození 0-3 na 50 glomerulech. V případě kapitol 2 a 4 je popsána metoda hodnotící stupeň poškození od 0-4 na 100 glomerulech. V tomto případě se jednalo o hodnocení sklerotických ploch. Čím se o ba postupy stanovení GSI od sebe odlišovaly? Je možné tyto metody porovnávat?

Studie 1: Za formální chybu považuji kombinování českých a anglických termínů, které je typické např. pro označování hypertenzních kmenů zvířat (např. str. 34) .

Studie 2: Jak si vysvětlujete, že kontrolní potkani kmene HanSD, kteří dostávali od 50. dne života vysokoslanou dietu, měli o cca 20 % vyšší relativní hmotnost srdce v porovnání se stejně starými jedinci, kteří dostávali vysokoslanou dietu již od odstavu (29.den.; viz Studie 1)?

Studie 3: Nesrovnalosti ohledně hmotnosti srdcí kmene HanSD jsou patrné i v této části, zde se jednalo o téměř o 50 % vyšší relativní hmotnost v porovnání se stejně designovanou Studii 1.

Na str. 58, obr. 19 ukazujete, že chronické podávání selektivního inhibitoru ET_A receptoru významně snížilo koncentraci ET-1 v levé komoře srdeční heterozygotních Ren-2 potkanů v porovnání s kontrolními HanSD potkany a to jak na normo- tak vysokoslané dietě. Máte pro to nějaké vysvětlení? Ovlivnilo by chronické podávání atrasentanu také koncentraci ET-1 u HanSD potkanů?

Studie 4: Na str. 68, obr. 21 uvádíte hodnoty GSI, které jsou o řád nižší v porovnání s předchozími měřeními (Studie 1-3). Čím si to vysvětlujete?

Obecné dotazy:

- 1) V průběhu vašich experimentů byl měřen systolický krevní tlak jednak pletysmograficky na ocase u bdělých zvířata a dále na konci experimentů invazivně přímým měřením v karotidě u potkanů anestetizovaných thiopentalem sodným. Pozorovali jste vliv anestézie na hodnoty krevního tlaku? Odlišovaly se normotenzní a hypertenzní kmeny?
- 2) Jak u homozygotních, tak heterozygotních Ren-2 potkanů došlo v důsledku rozvoje hypertenze a orgánového poškození ke zvýšení mortality. Jaké byly příčiny mortality? Lišili se homo- a heterozygotní Ren-2 potkani?

Z pohledu oponenta je zřetelné, že výzkumná práce MUDr. Martina Opočenského vedla k získání důležitých výsledků, které byly publikovány v kvalitních odborných periodikách. Po formální stránce má práce některé nedostatky, nicméně odpovídá, dle mého názoru, požadavkům kladeným na doktorskou disertační práci. Domnívám se, že disertace splňuje kritéria stanovená zákonem, a proto ji doporučuji přijmout k obhajobě a MUDr. Martinu Opočenskému udělit příslušný titul.

V Praze dne 18. 1. 2010

RNDr. Jan Neckář, Ph.D.