

OPONENTSKÝ POSUDEK doktorské disertační práce

„Regulace receptorů spřažených s G proteiny. Studie muskarinových a β -adrenergických receptorů u M_2 KO myši.“

MUDr. Jan Beneš, 1. lékařská fakulta UK v Praze

Postgraduální doktorské studium

Studijní program: Biomedicína

Studijní obor: Fyziologie a patologická fyziologie

Předložená doktorská disertační práce je zaměřena na problematiku receptorů spřažených s G proteiny, se zvláštním důrazem na skupinu adrenergických a cholinergních receptorů. Je založena na dvou prvoautorských impaktovaných pracích uchazeče, publikovaných v roce 2012.

Cílem tezí bylo podrobně analyzovat myši s vyřazeným M_2 muskarinovým receptorem, za fyziologické situace a pod vlivem stresoru, představovaného expozicí nízké teplotě o různém trvání.

Práce je sepsána v angličtině, a to na velmi dobré úrovni. Příležitostně lze sice v textu nalézt drobné gramatické chyby („in the case of“ místo „in case of“, používání termínu „autonomic“ místo „autonomous“ apod.), ale celkový dojem z textu je velmi dobrý. Drobné, zcela výjimečné stylistické nesrovnalosti lze zajisté také odpustit. V úvodu tezí jsou zařazeny souhrny v češtině a v angličtině, které vhodným způsobem sumarizují předkládané teze. Samotná práce je členěna klasickým způsobem (Introduction, Goals and Hypotheses, Material and Methods, Results, Discussion, Conclusion a References). Text včetně obrázků a grafů představuje zhruba 70 normalizovaných stran (bez citací literatury).

Teoretický úvod do studovaného problému je založený na přehledu relevantní literatury. Jedná se o zhruba 25 stran textu a pět schémat, vytvořených uchazečem či upravených podle literárních zdrojů. V úvodu se dr. Beneš věnuje postupně v jednotlivých kapitolách nitrobuněčné signalizaci, receptorům spřaženým s G proteiny obecně, G proteinům samotným, dále receptorům relevantním pro vlastní teze – tedy jednotlivým podtypům adrenergických receptorů a muskarinovým receptorům a také problematice regulace receptorů spřažených s G proteiny. Zvláštní kapitola je věnována geneticky modifikovaným organismům a jejich významu pro studium fyziologických funkcí organismu. K této úvodní části nemám připomínky – literární rešerše je zpracována velmi podrobně, s profesionálním nadhledem, z velkého množství prací na dané téma byly disertantem vybrány publikace relevantní pro studovaný problém.

V této části tezí doktorand jasně prokázal, že je schopen výborně pracovat s literaturou a vytvořit na dané téma kvalitní a celou šíří problematiky pokrývající rešerši.

Cílem předložených tezí bylo testovat šest hypotéz, týkajících se především jak změn počtu adrenergických receptorů β_1 a β_2 , tak receptorů M_4 . Studovány byly dále systolické i diastolické funkční parametry srdce a tělesná teplota a aktivita. V neposlední řadě bylo cílem

studovat možné změny v produkci katecholaminů a v aktivitě enzymů podílejících se na jejich syntéze.

Domnívám se, že všechny tyto cíle byly doktorandem splněny a je to vhodným způsobem v tezích dokumentováno.

V další části tezí, na 7 stranách, podává MUDr. Beneš přehled metodik použitých v jeho disertační práci. Popisuje testovaný biomodel – M₂-/- myš, stresor – chladový podnět, a metodiky zaměřené na popis receptorů a studium jejich změn v tomto modelu po jeho ovlivnění stresorem: vazebné studie, stanovení genové exprese, echokardiografické vyšetření, telemetrické měření EKG, teploty a pohybové aktivity a následné zpracování těchto signálů, včetně použitých statistických metod. Věnuje se také v samostatných oddílech metodám stanovení aktivity, případně sérových koncentrací neurotransmiterů a enzymů účastnících se jak jejich vzniku, tak degradace a také metodám sloužícím ke studiu exprese genů pro tyto struktury. Jedná se o metodiky zavedené a velmi dobře definované, které jsou rozhodně vhodně zvolené pro takto zaměřenou experimentální práci. Z textu je zřejmé, že doktorand zvládl metodiky dobře jak po teoretické, tak po praktické stránce (což bylo bezpochyby nutné pro samotné provedení experimentů v patřičné kvalitě).

V další části disertačních tezí jsou na 20 stranách prezentovány výsledky práce, doplněné o 19 grafů a obrázků a 3 tabulky. Prezentace výsledků je velmi přehledná, orientace v tabulkách a grafech je snadná. Texty nejsou příliš dlouhé, důraz je kladen na grafickou reprezentaci výsledků. Předpokládám, že větší část, ne-li všechny výsledky, byly již prezentovány v publikovaných pracích doktoranda, a prošly tedy standardním recenzním řízením v odborných periodících.

Diskuse je rozvedena na osmi stranách. Velký důraz je kladen především na kritické zhodnocení změn genové exprese a výsledků vazebných studií v populacích beta-1, beta-2 adrenergických a M₂ muskarinových receptorů a na zařazení výsledků vlastních experimentů do kontextu světového písemnictví (např. potvrzení nálezu minoritní muskarinové receptorové populace v srdci, popsané autory Ito et al., 2009, a jiné). V další části jsou pak diskutovány především výsledky z oblasti biorytmů a funkčních charakteristik srdce. Diskuse je dostatečně rozsáhlá a pokrývá všechny aspekty dosažených výsledků.

V závěrečné části tezí je prezentovaný přehled použité literatury, z které doktorand čerpal při studiu a při přípravě svých tezí. Jedná se celkem o více než 170 prací, přičemž citovaná literatura zahrnuje jak práce „klasické“ (například Ahlquist, 1948), tak recentní (řada citovaných prací byla publikována v posledních 15 letech, výjimkou nejsou ale ani práce z několika posledních let, samozřejmě včetně prací školitele). Jak již jsem zmínila výše, z citovaného přehledu literatury je zřejmé, že doktorand pečlivě prostudoval tematiku, kterou se jeho disertační práce zabývá a dokázal z dostupné literatury vybrat podstatné a relevantní informace a využít je při svém studiu, plánování experimentů i při přípravě disertačních tezí.

K tématu disertace v době svého postgraduálního studia doktorand publikoval dvě práce in extenzo, obě jako první autor v zahraničních časopisech s IF (2,147 a 2,293).

K předloženým tezím mám čtyři otázky:

- 1) Jak velký podíl měl dr. Beneš na samotných experimentech – které části práce prováděl osobně a co konkrétně prováděl (design experimentů, vyhodnocení dat, apod.)
- 2) V části shrnující metodiky je zmíněno, že ve studii byli použiti výhradně samci $M_2^{-/-}$ myši. Vysvětlete, prosím, důvody pro takové omezení.
- 3) Domníváte se, že Vámi studované receptory by mohly být ovlivněny estrálním cyklem pokusných zvířat? Které další receptorové systémy a humorální vazby – kromě těch studovaných ve Vaší disertaci - by mohly v pohlavních rozdílech odpovědi na chladový stres hrát úlohu?
- 4) Vámi studovaný biomodel - myš s vyřazeným M_2 muskarinovým receptorem – je bezesporu zajímavým nástrojem pro studium kompenzatorního chování dalších receptorových systémů přítomných v srdeční tkáni, což výsledky shrnuté v těchto tezích jednoznačně potvrzují. Existuje nějaký klinický korelát pro takovou situaci? Vidíte nějakou možnost, jak by se tyto výsledky eventuálně mohly uplatnit v translační medicíně?

K předloženým disertačním tezím nemám žádné závažné připomínky. Jedná se o práci, která významným způsobem doplňuje naše znalosti o regulaci receptorových systémů v myokardu, a přispívá tak k rozvoji oboru v oblasti fyziologie a patofyziologie kardiovaskulárního systému. Domnívám se, že práce splňuje všechny požadavky kladené na doktorskou disertaci, MUDr. Jan Beneš prokázal předpoklady k samostatné tvořivé vědecké práci a doporučuji, aby mu byl po úspěšné obhajobě udělen akademický titul Ph.D.

V Brně, dne 6. května 2014

Prof. MUDr. Marie Nováková, Ph.D.
Fyziologický ústav
Lékařská fakulta Masarykovy univerzity

