

Oponentský posudek habilitační práce MUDr. Vladimíra Koblížka, PhD.

Vliv fyzické zátěže na agregaci trombocytů u chronické obstrukční plicní nemoci

Plicní klinika Lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice Hradec Králové
Hradec Králové, leden 2017

Práce je členěna na Obecnou část, ve které na 40 stranách autor přesně a výstižně popisuje chronickou obstrukční plicní nemoc (CHOPN) ze všech hledisek (patologie, patofyziologie, epidemiologie, symptomy nemoci, diagnostika a léčba) a přidává i svá dosavadní zjištění - výsledky provedených nebo prováděných výzkumných projektů, studie PHAETON a POPE (PHAETON - česká multicentrická intervenční studie „**PH**ysical exertion and oxid**A**tive str**E**ss in chronic obstruc**T**ive pulm**ON**ary disease, POPE- mezinárodní průřezová observační studie **P**henotypes of **COPD** in Central and **E**astern Europe Study, aj.)

Části práce:

1. Definice - domácí dle přijatých guidelines ČPFS a mezinárodní dle GOLD (Global initiative for chronic obstructive lung disease).

Vymezení pojmů – akutní exacerbace CHOPN, chronická bronchitida, patologicko anatomická definice emfyzému. Zde nesouhlasím s tím, že jde o rozšíření dýchacích prostor distálně od respiračního bronchiolu. Jde o rozšíření distálně od terminálního bronchiolu (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

Patologické a patofyziologické souvislosti

Projevy CHOPN

2. Epidemiologie a rizika

- v mezinárodním i domácím kontextu. Chybí odkaz na základní epidemiologickou studii prof. Vondry, která je citována nepřímo v Doporučeném postupu. (KOBÍŽEK, V. a CHLUMSKÝ, J. a ZINDR, V. et. al. CHOPN. Doporučený postup ČPFS pro diagnostiku a léčbu chronické obstrukční plicní nemoci. Maxdraf: Praha, 2013. 134 s.)

U odkazu na UZIS 2015 je uvedena citace „130“, která je sdělení autora a spol. (KOBLIŽEK, V. a SVOBODA, M. Nová fixní kombinace tiotropium a olodaterol – její role v léčbě chronické obstrukční plicní nemoci v České republice. *Vnitřní lékařství*, 2016, vol. 62, no. 12, p. 1010-1020.) a mohla by být přímo zdroj UZIS (ZDRAVOTNICTVÍ ČR: Stručný přehled činnosti oboru pneumologie a ftizeologie za období 2007– 2015 NZIS REPORT č. K/6 (09/2016).

Rizikové faktory

3. Projevy onemocnění, kazuistika přesný popis včetně fenotypického dělení.

4. Diagnostika, vše podstatné, oceňuji, že doporučuje vyšetřit Alfa 1 antitrypsin u každého nově diagnostikovaného nemocného s CHOPN, excelentní popis pod- a nadhodnocení diagnózy CHOPN s odkazy na zahraniční zdroje.

5. Péče o nemocné s CHOPN

Terapie - kritické zhodnocení vlivu GOLD ve světě Skvěle popsáno. Paušální léčba, personalizovaná léčba, prevence a prognóza.

Vlastní výzkum

6. Výzkumný projekt

Východiska projektu: autor popisuje existující vztah mezi plicním a systémovým zánětem ve stabilní fázi onemocnění a možné ovlivnění systémové „extenze“ zánětu (přelití dle prof. Barnese) komorbidit (či multimorbidit dle prof. Fabbri) u nemocných s CHOPN. Dále uvádí, že akutní exacerbace mohou být spojeny s alterací trombocytární a koagulační aktivity, což může vyústit v souběžný či následný rozvoj akutních koronárních příhod a/nebo tromboembolického postižení v období exacerbace nebo těsně po jejím odeznění. Autor vyslovuje zásadní otázku jeho výzkumného projektu: **zda vrcholová fyzická zátěž při usilovné chůzi může u nemocných s CHOPN představovat z cévního hlediska obdobné riziko jako exacerbantní epizoda. Hledání odpovědi na ní věnuje svůj projekt.**

Cíl projektu je posouzení akutního vlivu vrcholové fyzické zátěže vykonané v průběhu chůze stupňované standardizovanou formou na agregační funkci krevních destiček a další hematologické parametry u pacientů s těžkým stupněm CHOPN (post-bronchodilatační FEV₁ ≤ 60 %) a jejich porovnání se zdravými osobami (bez CHOPN) srovnatelného věku.

Hypotéza: **agregační funkce krevních destiček** a další hematologické parametry u pacientů s těžkou CHOPN mohou být do určité míry **alterovány vrcholovou fyzickou zátěží** v důsledku polyfaktoriálního působení vrcholové námahy v terénu, těžkého stupně bronchiální obstrukce, významné dynamické plicní hyperinflace, akutní hypoxémie, oxidačního stresu a rychlé progresse svalové dysfunkce.

Metodika: Jde o součást rozsáhlejší studie PHAETON (viz výše). Zařazeni byli nemocní s CHOPN diagnostikovanou před více než 2 roky, s bronchitickým či emfyzematickým fenotypem, schopní samostatné chůze, 8 týdnů bez exacerbace. Jednalo se o nekouřící exkuřáky. Kontrolní skupinu tvořili dárci krve z FN HK. Soubor nemocných byl tvořen vlastními pacienty zařazenými do **České Multicentrické Výzkumné Databáze CHOPN** - Czech Multicentre Research Database of COPD - CMRD registrované na ClinicalTrials.gov pod číslem NCT01923051. Nemocným byla provedena **analýza funkce trombocytů** a odběr a zpracování **kondenzátu vydechovaného vzduchu**. Výsledky byly profesionálně statisticky zpracovány.

6. Výsledky

Základní kohorta nemocných

Pacienti s CHOPN byli do projektu PHAETON vybráni pomocí náhodného výběru z **České multicentrické výzkumné databáze (CMRD)** nemocných s těžkou CHOPN. Celkový počet nemocných CMRD dosáhl 784 pacientů ve 14 českých centrech; 173 dlouhodobě sledovaných pacientů v Hradci Králové tvoří 22 % celého CMRD souboru. Do studie PHAETON bylo ve druhé polovině roku 2014 náhodně vybráno 11 z nich. Kontrolní skupinu tvořilo 17 respiračně zdravých dobrovolníků. Genderové rozložení (64 % mužů) a věková struktura (62,5 roku) obou skupin jsou identické.

Nemocní s CHOPN byli schopni vykonat přibližně 57 % **zátěže** během zátěžového testování v porovnání se zdravými kontrolami.

Vyšší hodnota **počtu leukocytů** byla zaznamenána jen u osob s CHOPN, nemocní s CHOPN měli vyšší **hladinu fibrinogenu** před i po zátěži.

Destičkové parametry: Významný rozdíl mezi pacienty s těžkou CHOPN a zdravými dobrovolníky byl prokázán v cytometrickém parametru medián **CD62P** po vrcholové **fyzické zátěži**. Provedení dvou ISWT testů vede k jeho **signifikantnímu poklesu** u nemocných s CHOPN, zatímco u zdravých kontrol stejného věku se tento parametr po zátěži nemění.

U nemocných byla velikost **destičkových agregátů** trvale (před i po zátěži) o 20 % menší v porovnání se seniory bez CHOPN. Dále prokázal **diskrétní změny destičkové agregace facilitované** adenosin 5'-difosfátem – ADP (mírný růst agregace), respektive epinefrinem – EPI (nepatrný pokles agregace) po vrcholové fyzické zátěži.

Biomarkery oxidačního stresu (8-isoprostan a malondialdehyd), **prozánětlivé markery** (leukotrieny B4, C4, D4, E4) a **protizánětlivé markery** (lipoxiny A4, B4) ve vydechovaném vzduchu před fyzickou zátěží a po ní se v mnoha ohledech lišily u nemocných s CHOPN a u kontrolního souboru zdravých dobrovolníků.

Prozánětlivý leukotrien C4 po zátěži vzrostl (u nemocných s CHOPN nesignifikantně, u zdravých kontrol statisticky významně). Rovněž dva další prozánětlivé působky (leukotrien D4 a leukotrien E4) dosahovaly vyšších hodnot u CHOPN pacientů, a navíc se oba statisticky významně změnilo po vrcholové fyzické zátěži. První z nich (LTD4) klesal u obou vyšetřených skupin, naopak druhý (LTE4) v obou kohortách rostl.

6. Diskuze

V diskuzi autor uvádí četná pozorování týkající se předmětu zkoumání v proběhlých studiích ve světě. Rovněž sám uvádí, že „ani jeden z uvedených parametrů (D-dimery, počet trombocytů, fibrinogen) se neměnil po vrcholové fyzické zátěži u nemocných ve stabilní fázi onemocnění“ Toto by se dalo očekávat u nemocných s opakovanými exacerbacemi, tedy hyperkoagulace, útlum fibrinolýzy a již dříve prokázaný vyšší počet plicních embolií. Autor však i u nemocných se stabilní CHOPN prokázal po zátěži změnu exprese povrchových molekul na trombocytech (CD40L, CD62P a CD63P), z nichž CD62P významně poklesl. Vysvětlením je spojení agregátů destiček s monocyty, což svědčí o jejich aktivaci.

V další části studie se věnoval změně agregace trombocytů v klidu a po zátěži. Na vlastním souboru nemocných autor nezaznamenal žádné signifikantní změny po fyzickém zatížení. Studovaní pacienti s CHOPN měli přibližně o **pětinu menší velikost destičkových agregátů**. Tato skutečnost byla pozorována před i po fyzické zátěži. Kromě toho byly prokázány určité, a to statisticky významné, **odchylky v ADP (růst) a EPI (pokles) stimulované agregaci trombocytů** u nemocných jedinců s CHOPN po vrcholové intenzitě fyzické zátěže. Klinický význam menší velikosti destičkových agregátů a změny agregační odpovědi na ADP a EPI není jasný, bude nepochybně vyžadovat další studie.

Při studii kondenzátu vydechovaného vzduchu sledovali 8-isoprostan, leukotrieny B4, C4, D4 a E4, lipoxiny A4 a B4 (LXA4, LXB4). U nemocných s CHOPN lze očekávat elevaci prozánětlivých cytokinů a markerů oxidačního stresu a naopak redukcí protizánětlivých

sloučenin. Takový nález potvrdila i autorova práce při analýze vydechovaného vzduchu. Protizánětlivé mediátory LXA4 a LXB4 respiračně zdravých seniorů (kontrolní skupiny) dosahovaly bezmála **dvojnásobných hodnot** v porovnání s nemocnými s CHOPN. A naopak parametry oxidačního stresu a prozánětlivé aktivity (zejména 8-iso, LTB4 a LTC4) byly u zdravých dobrovolníků redukovány na zhruba polovinu hodnot stejně starých pacientů s těžkou CHOPN.

6. Shrnutí výsledků: autor a jeho tým prokázal u nemocných s CHOPN v porovnání se zdravými „kontrolami“: výrazně **sníženou toleranci fyzické zátěže**, významnou **přinámahovou kyslíkovou desaturaci**, značnou limitaci v oblasti **běžné denní fyzické aktivity**, vyšší hodnotu **celkového počtu leukocytů**. Tato hodnota dále **vzrostla bezprostředně po absolvování fyzické zátěže**, dále našli zvýšenou hodnotu **fibrinogenu**, menší velikost (o 20 %) **trombocytárních agregátů** v porovnání se zdravými kontrolami.

Autor a jeho tým dále prokázal **diskrétní změny destičkové agregace facilitované adenosin 5'-difosfátem – ADP** (mírný růst agregace), respektive epinefrinem – EPI (nepatrný pokles agregace) po vrcholové fyzické zátěži a **poklesu exprese CD62 molekuly** po zátěži.

Hodnoty parametrů **oxidačního stresu a prozánětlivých působků** obsažených v kondenzátu vydechovaného vzduchu byly u nemocných s CHOPN **výrazně zvýšeny**. Naopak **protizánětlivé biomarkery** byly výraznější ve vydechovaném vzduchu **zdravých seniorů**.

Autor celý projekt následně kriticky hodnotí a uvádí absenci předchozí časové analýzy (*proof of concept*), zvažuje vhodnost časového intervalu odběrů vzorků k vyšetření po námaze... neměly být odběry později? Další slabinou je malý počet nemocných - 11.

Předkládaný projekt prokazuje určitý diskrétní vliv vrcholové (z hlediska pacienta maximální možné) **fyzické zátěže na laboratorní hematologické parametry včetně agregace krevních destiček**. Klinický význam drobných laboratorních odchylek však zůstává nejasný. Navíc **pozitivní role pohybu nemocných s CHOPN v žádném případě nebyla zpochybněna, neboť všechny rehabilitační metody pracují se submaximální** (a nikoliv vrcholovou) **zátěží**. Zájem autora o tuto problematiku trvá. Výsledky pilotního projektu plánuje využít při plánování většího výzkumného záměru na tomto poli zaměřeného na prospektivní hematologické sledování kohorty CHOPN nemocných v době jejich akutního přijetí s exacerbací na jednotku intenzivní péče, při propuštění a poté v rámci ambulantní kontroly po 3-6 měsících.

7. Anglický souhrn

8. Literatura - 242 citací, recentní

14 obrázků 17 tabulek

Seznam zkratk

125 stran

Hodnocení oponenta:

Kandidát prokázal (a to ne jenom při realizaci předkládané práce) schopnost projekt vymyslet, připravit - včetně zapojení všech členů týmu - a dokončit. Jeho hypotéza o vlivu maximální zátěže u nemocných s CHOPN na změny trombocytů s následnou hyperkoagulací a tedy zvýšeným rizikem trombo-embolie byla některými výsledky této studie podpořena. Mám na mysli zjištěnou vyšší hodnotu **fibrinogenu**, menší velikost (o 20 %) **trombocytárních agregátů i diskrétní změny (nárůst) destičkové agregace facilitované adenosin 5'-difosfátem – ADP** v porovnání se zdravými kontrolami. Naopak jiné parametry (D-dimery, počet trombocytů, fibrinogen) se neměnily po vrcholové fyzické zátěži u nemocných ve stabilní fázi onemocnění. Studium **kondenzátu vydechaného vzduchu** potvrdilo vyšší podíl prozánětlivých a menší podíl protizánětlivých biomarkerů u nemocných s CHOPN.

Sám autor vyslovuje otázku, zda by jiný timing odběrů krve k vyšetření nepřinesl přesvědčivější výsledky. Rovněž tak je otázka, do jaké míry jsou výsledky ovlivněny malým počtem nemocných zařazených do studie.

Nutno říci, že je dobře známo, jak obtížně lze přesvědčit chronicky nemocné k dosti komplikované studii, jejíž součástí je měření chůze a četné odběry.

Jako hlavní pozitivum na dosavadní vědecké činnosti as. Koblížka hodnotím jeho mnohostrannost a široký záběr činností. V práci připomíná **Českou Multicentrickou Výzkumnou Databázi CHOPN** - Czech Multicentre Research Database of COPD - CMRD registrované na ClinicalTrials.gov pod číslem NCT01923051, která je jednoznačně nejrozsáhlejší pneumologickou studií u nás a která je jednoznačně jeho „dítětem“. Stejně tak jsou jimi i uváděné studie PHAETON a POPE. Rád zde uvedu nejnovější informaci a sice, že výsledky studie POPE byly v květnu 2017 publikovány v nejprestižnějším pneumologickém časopise v Evropě, v European Respiratory Journal (Open Access Phenotypes of COPD patients with a smoking history in Central and Eastern Europe: the POPE Study. Vladimír Koblizek, Branislava Milenkovic, Adam Barczyk, Ruzena Tkacova, Attila Somfay, Kirill Zykov, Neven Tudoric, Kosta Kostov, Zuzana Zbozinkova, Jan

Svancara, Jurij Sorli, Alvils Krams, Marc Miravittles, Archang Valipour
European Respiratory Journal 49 (5) 1601446; DOI: 10.1183/13993003.01446-
2016 Published 11 May 2017)

Závěr a doporučení:

As. Koblížek svojí činností v uplynulých 15 letech i předloženými výsledky habilitační práce prokázal svoji výjimečnou schopnost vědecky myslet i konat. V současnosti je v České republice nejschopnějším a nejpotentnějším vědeckým pracovníkem v pneumologii. Je logické, že jeho vliv již překročil hranice České republiky a brzy překročí i hranice Evropského kontinentu.

Soudím, že jeho vědecká práce (po její obhajobě před vědeckou radou Lékařské fakulty University Karlovy v Hradci Králové) splňuje všechny podmínky (a to jak obsahové tak formální) k udělení titulu docenta vnitřního lékařství.

Na závěr bych si dovilil kolegovi Koblížkovi položit dvě otázky:

1. Po **absolvování fyzické zátěže** našli menší velikost (o 20 %) **trombocytárních agregátů** v porovnání se zdravými kontrolami. Otázka: **čím si tuto menší velikost agregátů autor vysvětluje?** mohlo by to znamenat **zvýšený koagulační potenciál** nemocných s CHOPN?

2. **Leukotrien E4** dosahoval vyšších hodnot u CHOPN pacientů a statisticky významně vzrostl po vrcholové fyzické zátěži. Otázka: Může autor vysvětlit, **jaký to může mít pro nemocné význam?**

Prof. MUDr. Miloslav Marel, CSc.

2. Lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Praha

16. 5. 2017