

## Oponentský posudek na doktorskou disertační práci

Ing. Václava Čibery: *Cross-bridge model sarkomery skládající se ze tří filament.*  
k udělení akademického titulu "PhD" v oboru Aplikovaná mechanika na Západočeské  
univerzitě v Plzni.

Biomechanické modelování funkce svalů vychází vesměs z modelu A.F. Huxleyho, formulovaného roku 1957 a známého pod názvem cross-bridge model (v češtině často nazývaný model příčných můstků). Tento model vychází z hypotézy dvou po sobě klouzajících vláken (filaments). Tato vlákna jsou tvořena dvěma elastickými polymery, slabé vlákno aktinu a silné vlákno myosinu. Kontrakční svalová síla je iniciována ionty  $Ca^{2+}$  na straně slabého aktinového vlákna. Na místo s iontem  $Ca^{2+}$  (troponin) se naváže hlavička myosinu spojená se silným myosinovým vláknem. Tato hlavička obsahuje vysoce energetickou molekulu ATP (adenosintrifosfát), která při hydrolýze  $ATP + H_2O \rightarrow ADP + P$  uvolní chemickou energii,  $\Delta G = -30.5 \text{ kJ/mol}$  vedoucí ke změně tvaru (vztyčení) navázané hlavičky tak, že dochází ke vzájemnému posuvu obou vláken. Dochází k předávání vazebního místa od jedné myosinové hlavičky druhé, metodou "z ruky do ruky". Dalším přívodem ATP (jakéhosi paliva svalové práce) dojde opět k rozpojení můstku a myosinová hlavička se narovná podél myosinového vlákna. Obvyklá velikost výchylky myosinové hlavičky z rovnovážné polohy je v rozmezí 47nm (rozpojená poloha před kontrakcí) až do -47 nm po kontrakci. Tento proces se cyklicky opakuje a dochází ke kontrakci sarkomery z původní délky 3.65  $\mu\text{m}$  na 1.05  $\mu\text{m}$  (překrytí vláken až o 2.6  $\mu\text{m}$ ) až do vyčerpání  $Ca^{2+}$  a ATP.

Huxleyův model svalové kontrakce je formulován jako kinetika reakce  $n_u \xrightleftharpoons[f]{g} n_a$  v pojmech koncentrace rozpojených můstků  $n_u$  a můstků aktivovaných  $n_a$  s příslušnými rychlostními funkcemi  $f, g$ . Tyto funkce nejsou obecně konstantní a proto jsou odchylky Huxleyova modelu od experimentů vysvětlovány různými, často dosti spekulativními závislostmi těchto rychlostních funkcí na dalších, většinou těžko měřitelných parametrech.

Hlavně z těchto důvodů jsou hledány další modely svalové kontrakce, které by lépe vyhovovaly experimentům a zahrnovaly další nové poznatky o molekulární struktuře svalového vlákna. Jedním z nejnovějších poznatků je úloha dalšího důležitého svalového vlákna, titinu, zvláště pak jeho schopnost řídit svoji elasticitu, opět ionty  $Ca^{2+}$ .

Hlavním cílem práce bylo modifikovat výše popsany Huxleyův model příčných můstků tak, aby co nejlépe modeloval základní svalové funkce:

- 1 kontrakci
  - isometrickou
  - isotonickou
  - eccentrickou (zatížení svalu je větší než při isometrické kontrakci)
- 2 simulovat náhlou kontrakci
- 3 simulovat náhlé natažení (modelovat eccentrickou kontrakci)

### Hodnocení

- a) Přínosem práce je návrh a realizace numerického kódu pro simulaci všech výše uvedených svalových funkcí. Do klasického Huxleyova modelu příčných můstků reprezentovaného generovanou silou  $F_{CB}$  byl zahrnut i vliv titinového vlákna popsaného silou  $F_T$ . Výsledná síla svalu je pak jejich součtem. Zahrnutím síly  $F_T$

- charakterizované vhodnou elasticitou vlákna bylo dosaženo velmi uspokojivého souhlasu s experimentem i pro případy eccentrické kontrakce. Vypracovaný software je dalším rozšířením možností studia vlivu jednotlivých měřitelných parametrů, např. průběhu síly při různých typech kontrakce, rychlosti kontrakce a také vlivu koncentrací  $Ca^{2+}$ , popř. ATP. V těchto bodech je model příspěvkem k popisu svalové kontrakce a tím i příslušného vědeckého oboru biomechaniky.
- b) Použité metody odpovídají současným trendům v oblasti aplikace matematických metod popisu biomechanických problémů. Práce je orientována více na matematickou formulaci vlastností svalu a na numerickou simulaci odpovídajících algebraických a diferenciálních rovnic s cílem dosáhnout konkrétních výsledků, které lze porovnat s experimentálně zjištěnými průběhy všech typů svalové kontrakce.
- c) Za konkrétní přínos považuji návrh a ověření elastického modelu titinu, kterým lze doplnit klasický Huxleyův model příčných můstků. Model titinu obsahuje člen popisující spirálovitou (vlnovcovitou) strukturu, která je schopná vysoké elasticity (wormlike chain) a která může být modifikována i koncentrací  $Ca^{2+}$ . Důležitá je i analýza konkrétního tvaru rychlostních funkcí Huxleyova modelu. Specifikovány a při numerické simulaci byly ověřeny jejich konkrétní tvary; jednak funkce  $f(Ca^{2+})$  popisující rychlost zapojování můstků, tak i funkce  $g(ATP)$  popisující jejich rozpojování. Tímto způsobem byla ověřena i kvantitativní role  $Ca^{2+}$ , ATP.
- d) Práce je velmi rozsáhlá (včetně literatury má 219 stran) a obsahuje velké množství údajů a obrázků, které pak nejsou pro formulaci samotného modelu využity. Rešeršní část je až neúměrně podrobná a zaujímá téměř polovinu práce (cca 90 stran) a má více podobu poznámek při studiu dané problematiky. Práce se tak stává poněkud nepřehlednou. Nicméně je napsána dobrou angličtinou (alespoň jak já mohu posoudit) a má velmi dobrou grafickou úroveň. Výsledky simulací jsou popsány přesně a zřetelně.
- e) Mezi publikacemi autora nejsou žádné práce ve SCOPUSu, které by byly věnovány výsledkům disertace. Nicméně problémům disertace jsou věnovány konferenční příspěvky na mezinárodních konferencích věnovaných čistě biomechanickým problémům. Z uvedených publikací je dále patrné, že se V. Čibera věnuje i jiným, převážně termo-hydrodynamickým problémům a jejich simulaci. Tyto práce ukazují na jeho schopnost formulovat a numericky řešit i komplexní technické problémy. Z toho lze usuzovat, že jeho zájem je dostatečně široký a není koncentrován jen na biomechanickou problematiku.

K práci mám následující dotazy.

1. *otázka.* Počáteční podmínka pro rozložení aktivovaných příčných můstků je stanovena jejich rozložením v ustáleném (steady state) stavu. Tento stav je definován tvarem rychlostních funkcí  $f(x, Ca^{2+})$ ,  $g(x, ATP)$ . Je při simulaci respektována změna koncentrace  $Ca^{2+}$  a ATP, a nebo je na sarkomeru nahlíženo jako na mechanický systém (závislost napětí-deformace)? Aktivace svalového vlákna je spouštěna náhlým zvýšením koncentrace  $Ca^{2+}$ . Platí Hillova rovnice  $F/F_{max} = Ca^{2+} / (Ca^{2+} + K_m)$ , kde  $K_m = Ca^{2+}$ , pro

$F = F_{max} / 2$ . Lze uvedeným modelem simulovat svalovou kontrakci i náhlou změnou  $Ca^{2+}$ .

2. *otázka.* Je uvedený model vhodný i k simulaci srdečního svalu či svalu hladkého?

3. *otázka.* V kapitolách 4.3.3 a 4.4 je uvedeno zvýšení elasticity titinu vlivem  $Ca^{2+}$ , který molekulu titinu "přiváže" k aktinu. Při aktivním napnutí svalu má zvýšená elasticita titinu za

následek zkrácení sarkomery, což vede k nárůstu svalové síly. Je možné tuto vlastnost titinu v modelu síly  $F_T$  uvažovat a nebo je již obsažena v použitém modelu jiným způsobem?

Uvedené otázky nejsou zásadní pro výsledky předložené práce. Mají za cíl nasměrovat autora na problémy, které jsou pro konkrétní aplikaci modelů svalů důležité. Práce neobsahuje žádné věcné chyby a je v ní jen minimum překlepů.

## Závěr

Předložená práce má výbornou grafickou úroveň. Obsahuje rozsáhlou rešerši svalové kontrakce a diskuzi Huxleyova modelu kontrakce. Do klasického Huxleyova modelu příčných můstků byl zahrnut i vliv titinového vlákna. Vypracovaný software simuluje všechny typy svalové kontrakce příčně pruhovaných svalů a velmi dobře modeluje biomechanické experimenty. Předložená doktorská práce k udělení titulu PhD., splňuje ustanovení § 47, odst. 3 Zákona č. 111/1998 o vysokých školách a doporučuji proto, aby byl **Ing. Václav Čibera** připuštěn k její obhajobě na Fakultě aplikovaných věd, Západočeské University v Plzni.

V Praze dne 2. ledna 2017



Prof. Ing. František Maršík, DrSc.  
Ústav termomechaniky AVČR



# Oponentský posudek

dizertační práce Ing. Václava Čibery

## Cross-bridge model sarkomery skládající se ze tří filament

Disertační práce Ing. Václava Čibery je shrnutím jeho dosavadní vědecko-výzkumné práce v oblasti matematického modelování kontrakce kosterního svalu na úrovni sarkomery. Činnost sarkomery je modelována na základě interakce 3 filament dominantně tvořených proteiny aktinem, myosinem a titinem. Hlavní přidanou hodnotou prezentovaného modelu oproti klasickým modelům kontrakce je inkorporace třetího filamentu, titinu. Významnou předností předkládané práce je její interdisciplinární charakter, biologický jev (svalová kontrakce) je analyzován cestou matematického modelu, jehož výsledky jsou porovnávány se známými experimentálními výsledky.

Vlastní disertační práce o 219 stranách je členěna obvyklým způsobem. Po souhrnech (v angličtině, češtině a španělštině), obsahu a seznámech obrázků, symbolů a nomenklatury následuje úvodní část, která je rozsáhlejší než obvykle. Po vysvětlení hlavních cílů a struktury předkládané dizertační práce (kapitola 1) následují 4 rozsáhlé přehledové kapitoly, které postupně provádějí čtenáře od podrobného rozboru fyziologického fenoménu svalové kontrakce k matematickému modelování tohoto jevu.

S vysokou mírou přesnosti a podrobnosti je vysvětlena struktura a funkce sarkomery včetně 3 hlavních typů kontrakce a jejich funkčních projevů (kapitola 2). Důkladná analýza funkce svalového molekulárního motoru myosinu II, která zahrnuje i detailní popis kontrakčního cyklu, je představena v kapitole 3. Zásadní kapitolou vzhledem k cílům práce je kapitola 4, která vysvětluje vlastnosti titinu coby molekulární sarkomerické pružiny. Kapitoly 2-4 představují vysoce aktuální popis a rozbor molekulárních mechanismů svalové kontrakce coby zásadního biologického fenoménu a, dle mého názoru, by každá z těchto kapitol obstála jako samostatný přehledový článek v příslušných oborových časopisech. V kapitole 5 jsou představeny klasické modely svalové kontrakce včetně jejich slabých stránek a diskuse možností, jak tyto řešit zavedením funkce třetího strukturálního proteinu titinu. Dohromady představují kapitoly 2-5 ucelený soubor analýzy významného fyziologického mechanismu a jeho matematického popisu a přesvědčivě dokládají výborný literární rozhled i kritickou autorskou interpretaci kandidáta.

Následující 2 kapitoly (kapitola 6 a 7) jsou pak výsledkovým jádrem dizertační práce. V kapitole 6 je odvozen a popsán 3-filamentový model sarkomery (resp.  $\frac{1}{2}$  sarkomery), s jehož pomocí jsou pak simulovány a analyzovány různé typy kontrakce včetně speciálních projevů v kapitole 7. Konkrétně se jedná o izometrickou kontrakci, izotonickou koncentrickou kontrakci a kontrakční depresi při náhlém zkrácení a konečně excentrickou kontrakci s kontrakčním posílením při náhlém protažení. Navržený model byl schopen reprodukovat většinu výše uvedených jevů s výjimkou kontrakční deprese při náhlé zkrácení. Cenný je soulad modelu a experimentálních výsledků u excentrické kontrakce a posílení kontrakce při náhlém protažení, čímž překonává dosavadní klasické modely. Při přímém srovnání s klasickými modely tak navržený model poskytuje buď obdobné (koncentrická kontrakce) nebo lepší výsledky (posílení kontrakce při náhlém protažení). Na druhou stranu, model nedokázal reprodukovat fenomén kontrakční deprese při náhlé zkrácení (stejný problém ovšem mají i klasické modely).

Poslední kapitola pak obsahuje shrnutí závěrů dizertační práce včetně podrobné diskuse silných i slabých stránek navrženého 3-filamentového modelu, která přesvědčivě dokládá hluboké porozumění studované problematice, schopnost vlastní interpretace výsledků i kritickou sebereflexi autora. Literární rozhled autora dokládá více než 130 citací uvedených v přehledu literatury.

Zvolené téma dizertační práce je dle mého názoru vysoce aktuální. Přestože jsou funkce kosterního svalu již popsány do značné hloubky, stále zůstává řada nejasností.

Například funkce titinu (který je dominantním tématem i předkládané dizertační práce) a jeho příspěvek k různým typům kontrakce a relaxace jsou podrobněji zkoumány až v poslední době. Nelze opomenout ani medicínský potenciál poznatků, kdy svalové degenerace a dystrofie představují závažný klinický problém, který nemá v současné době uspokojivé terapeutické řešení. Pouze co nejúplnější poznání molekulárních mechanismů narušených funkcí a jejich regulací může vést k novým terapeutickým a diagnostickým možnostem. Předložená dizertační práce, dle mého názoru, významně zdokonaluje matematický popis svalové kontrakce a přibližuje ho tak biologickému chování. Opominutelný není ani interdisciplinární charakter práce, kdy díky matematickému popisu a modelování biologického fenoménu lze dospět k jeho lepšímu porozumění. Příspěvek práce k rozvoji oboru tak lze vysledovat na minimálně dvou úrovních: lepší pochopení biologického jevu a rozšíření aplikačních možností matematického modelování.

Publikační aktivita kandidáta je přiměřená. Při podrobnějším rozboru publikační aktivity je nicméně zřejmé, že (publikační) záběr kandidáta je podstatně širší, než je prezentováno v dizertační práci, kdy značná pozornost je věnována i modelování technických problémů a řešení. Domnívám se, že publikační potenciál poznatků prezentovaných v dizertační práci není dosud zcela vytěžen a že dosahují úrovně pro publikaci v impaktovaných časopisech biologického i matematického zaměření.

Z formálního hlediska dosahuje práce vysoké úrovně, její přehlednost dokládá systematický přístup k řešenému problému a nalezené řešení překonává dosavadní přístupy. Práce je zpracována velmi pečlivě, téměř bez překlepů a je celá zpracována v anglickém jazyce, jehož úroveň dokládá velmi dobrou jazykovou připravenost kandidáta.

Na závěr bych si dovolil položit několik doplňujících dotazů. Rád bych zdůraznil, že se nejedná o výtky předložené dizertační práci, ale spíše o doporučení pro budoucí práci či spekulativní dotazy na problémy, které mě zaujaly.

Model řeší kontrakci, ale nezabývá se relaxací. Dokáže model reprodukovat i relaxaci svalu?

Zásadní pro řádný průběh kontrakce je zvýšení intracelulární koncentrace vápníku. Plánuje autor rozšíření modelu tímto směrem, aby byl postižen celý proces od elektrické stimulace svalu k mechanické odpovědi?

Titin je dnes převážně interpretován jako jednosměrná pružina, která se natahuje protažením svalu. Nicméně, některé studie svědčily pro možnost obousměrné pružiny, kdy by titin mohl být nositelem tzv. sériové elasticity, která je odpovědná i za návrat svalu do původní délky po koncentrické kontrakci (tedy prodloužení svalu po předchozím zkrácení). Pokud tuto možnost pomíneme, co je nositelem sériové elasticity a odpovídá za návrat svalu do původní délky po koncentrické kontrakci?

**Závěr:**

**Předložená dizertační práce splňuje všechny požadavky kladené na dizertační práci, a proto ji jednoznačně doporučuji k obhajobě.**

V Plzni, 6. ledna 2017

Doc. MUDr. Milan Štengl, Ph.D.



Oponentní posudek doktorské disertační práce

**Ing. Václava Čibery**

**Cross-Bridge model sarkomery skládající se ze tří filament**

Předložená disertační práce má 219 stránek včetně seznamu použité literatury v úctyhodném rozsahu 132 prací. Vlastní práce je rozdělena do osmi kapitol.

Cíl práce je definován v kapitole 1.: „Modifikovat a zlepšit klasický Huxleyho matematický model dle nejnovějších experimentálních výsledků získaných na myozinové molekule a izolované sarkomeře a se zahrnutím třetího filamentu – titinu“. Práce má být zaměřena na zlepšení modelování excentrické kontrakce a zvýšení síly po této kontrakci (force enhancement) Jsou zde rovněž uvedeny typy molekulárních motorů, přičemž práce je orientována na myosin II.

Kapitoly 2. až 5. představují velice vyčerpávající popis na současné úrovni dané problematiky. Velice tuto část oceňuji, neboť představuje výborný podklad i pro další práce v této oblasti. Kapitola 2. Je věnována sarkomeře. Jsou zde definovány klíčové pojmy pro vlastní práci jako jsou typy kontrakce – izometrická, koncentrická a excentrická, a dále tzv. force enhancement. Tento jev dosud nebyl dostatečně v matematických modelech zahrnut. Je zde rovněž ukázána poloha a funkce titinu v myozinovém filamentu.

Třetí kapitola pak popisuje konkrétní molekulární motor – myosin II. Jsou zde definovány další důležité pojmy z teorie molekulárních motorů jako power stroke, duty ratio, biochemický proces a procesivita motoru. Velice podstatný je odstavec věnovaný termodynamice.

Jelikož podstatným rysem předložené práce je zavedení třetího proteinu – titinu- do matematického modelu, je jeho popisu a začlenění do sarkomery věnována celá čtvrtá kapitola.

Pátá kapitola pak představuje podrobnou rešerši stávajících matematických modelů sarkomery a to od Hillova modelu přes Huxleyho původní i modifikovaný model až po model Zahalakův, jenž zahrnuje i excentrickou kontrakci avšak bez vlivu titinu. Speciální pozornost je v této kapitole věnována i matematickému modelu titinu. Jako největší obtíž při jeho modelování je uvedeno respektování skládání a roztahování harmonikové struktury (folding/unfolding) Ig části titinu. Uvedena je zde první práce Gudrun Schappacher-Tilp et al.(2015) ve které je poprvé publikován třífilamentový model sarkomery.

Od šesté kapitoly začíná vlastní řešení uvedeného cíle – třífilamentového cross-bridge modelu. Hned v úvodu je tento cíl dále upřesněn:

1. Dát do vztahu vznik aktivní síly s překrytím aktinu a myosinu

2. Zahrnout nelineární elastické vlastnosti jednotlivých příčných můstků.
3. V souvislosti s tím uvažovat navázané (buckled) příčné můstky, jež produkují jen pasivní sílu
4. Zahrnout do modelu titin s jeho dříve definovanými vlastnostmi.

V šesté kapitole je rovněž poukázáno na chybu v Huxleyho teorii, jež nezachovává konstantní počet příčných můstků (cross-bridge).

Sedmá kapitola představuje soubor výsledků provedený simulací a jejich rozbor. Ukazuje se, že při izometrické a koncentrické kontrakci jsou výsledky stejné, jako při použití Huxleyho modelu. Hlavním výsledkem je kontrakce excentrická, kde se ukazuje velmi dobrá shoda s výsledky měření. Velice názorný je Obr. 7.9 ilustrující srovnání metod při izometrické a excentrické kontrakci.

Osmá kapitola shrnuje výsledky práce a přehledně uvádí deset hlavních modifikací Huxleyho modelu.

K práci mám následující dotazy:

1. Str. 81- 1. řádek -chybí jednotky síly (asi pN)
2. Str.88 – 8. řádek – platí tvrzení, že hlavním zdrojem vápníku u hladkých svalů je extracelulární prostředí, u všech typů těchto svalů?
3. V kap. 5 je uveden přehled modelů kosterního svalu. Nenalezl jsem model publikovaný v  
*Campbell KS (2009) Interactions between Connected Half-Sarcomeres Produce Emergent Mechanical Behavior in a Mathematical Model of Muscle. PLoS Comput Biol 5(11): e1000560. doi:10.1371/journal.pcbi.1000560* či  
*Campbell SG, Hatfield PC, Campbell KS (2011) A Mathematical Model of Muscle Containing Heterogeneous Half-Sarcomeres Exhibits Residual Force Enhancement. PLoS Comput Biol 7(9): e1002156. doi:10.1371/journal.pcbi.1002156,*  
jenž zahrnuje rovněž titin. Je autorovi znám a jak jej hodnotí ve srovnání se svým vlastním modelem? V Campbellově práci je explicitně uvedeno, že model zachycuje zmenšení a zvětšení síly (force depression/enhancement).
4. Jaké je srovnání autorova modelu s modelem z odkazu [40], který rovněž zahrnuje titin?
5. Na str. 134 je definována proměnná  $x$ . Bohužel chybí obrázek. Jak může dojít k hodnotám  $x < a$  nebo  $x > b$ ? Je možno ukázat na obr.?
6. Rychlost kontrakce ve vztazích na str. 154 se jeví jako daná. Jak tomu bude u izotonické kontrakce, kdy je dána síla a rychlost se mění?
7. Odkud byly získány (převzaty?) některé vztahy, např. (6.41) či (6.45)?
8. Jak (6.49) přejde pro steady-state model do (6.66)? Parciální derivace  $n$  dle  $x$  na levé straně je rovněž nulová (v je evidentně nenulové)?

Na dotazy položené v Pokynech pro vypracování oponentního posudku odpovídám takto:



- a. Práce se věnuje velmi aktuálnímu tématu. Vyvinutý model se zřejmě liší od jiných publikovaných modelů (dotaz 3.) a je tedy možno tuto práci považovat za významný přínos oboru.
- b. Dizertant použil naprosto adekvátní postup, využil známé modely a snažil se odstranit jejich nedostatky tak, jak si předsevzal v definovaných cílech práce. Tyto splnil.
- c. Výsledkem práce je počítačový model sarkomery, jež dovoluje simulovat izometrickou, koncentrickou a excentrickou kontrakci (pravděpodobně s danou rychlostí kontrakce). Zahrnuje i model jevu nazývanému force-enhancement. Znovu tak dokladuje význam titinového filamentu, který byl dlouhou dobu opomíjen. Vývoj modelu je konkrétním přínosem dizertanta, přičemž samozřejmě využíval již publikované výsledky s náležitými citacemi.
- d. Po formální stránce je práce příkladná. Počet překlepů je minimální. Jazykovou úroveň si nedovoluji vzhledem k mé znalosti angličtiny posuzovat, je však zcela jistě pro čtenáře naprosto srozumitelná.
- e. Ze seznamu publikací je zřejmé, že dizertant se věnoval rovněž jiné problematice vzhledem k svému pracovnímu zařazení. Téma dizertační práce publikoval pouze na konferencích. Celkový počet publikací je dostatečný.
- f. **Práci zcela jednoznačně doporučuji k obhajobě.**

Plzeň, 3.1.2017

Prof. Ing. Josef Rosenberg, DrSc



