

## **The Role of Uncoupling in Down-regulation of Reactive Oxygen Species.**

Disertační práce RNDr. Jana Ježka navazuje na dlouhodobě rozpracovávanou tematiku oddělení Biofyziky membránového transportu Fyziologického ústavu AV ČR zaměřenou na charakterizaci funkce uncoupling proteinů v živočišných a rostlinných buňkách. Předkládaná disertace se zaměřila na objasňování role jakou mohou hrát uncoupling proteiny při regulaci tvorby kyslíkových radikálů mitochondriemi. Studium mechanismů, které se podílí na tvorbě kyslíkových radikálů představuje v současnosti jednu z důležitých oblastí biomedicínského výzkumu protože oxidační stres jako induktor apoptotických a nekrotických procesů se podílí na rozvoji onemocnění celé řady životně důležitých orgánů. Rozpřahující proteiny se řadí do systému antioxidační ochrany buňky tím, že snižují podíl redukované formy oxidoredukčních komponent respiračního řetězce. Řada nejnovějších publikací také prokazuje, že kyslíkové radikály, kromě svého destruktivního efektu se uplatňují i jako signální faktory v řadě fyziologických regulací. Dr. Ježek ve své disertační práci věnuje pozornost různým aspektům této velmi komplikované problematiky.

V první části své práce se Dr. Ježek zaměřil na modelový systém komplexu I mitochondriální membrány a pokouší se objasnit vztahy mezi tokem elektronů, transportem protonů a tvorbou kyslíkových radikálů a prokázat do jaké míry lze ovlivněním membránového potenciálu inhibicí protonového transportu inhibovat tvorbu ROS. Řešil tento problém nikoli pomocí klasického rozpřažení pomocí rozpřahovačů, ale pomocí specifického inhibitoru protonového transportu. Podařilo se mu prokázat, že terapeutická strategie kompenzovat mitochondriální onemocnění způsobené poruchou funkce komplexu I

v důsledku mutací genu pro některou z jeho podjednotek problémy tvorby ROS nevyřeší, protože samotné rozpřažení tvorbu ROS komplexem I nezastaví.

Další oddíl práce v návaznosti na předešlé výsledky se věnuje hodnocení antioxidačního působení nově vyvinuté látky koenzymu Q s navázaným tetrafenyl fosfoniem, která snadno proniká do mitochondrií. Ukázalo se, že tato látka je schopna obnovit respiraci inhibovanou rotenonem, který simuluje poruchu mutace genu kodujícího podjednotku komplexu I odpovědnou za transport protonů.

Ve třetí části práce se Dr. Ježek vrací k možnostem využití aktivaci UCP2 při snižování oxidačního stresu. Podařilo se mu prokázat nový mechanismus založený na tom, že vytvořené kyslíkové radikály aktivují PLA2 a uvolněné hydroxyperoxydyl mastné kyseliny aktivují funkci UCP2 a tím i mírné rozpřažení, které tvorbu ROS snižuje.

V závěrečné části práce pak Dr. Ježek věnuje pozornost tvorbě ROS v závislosti na koncentraci kyslíku. Jedná se o jeden z vážných problémů v této oblasti výzkumu, protože většina in vitro experimentů je prováděna v podmínkách hyperoxie. Atmosférická tenze kyslíku je totiž mnohonásobně vyšší než ta intracelulární. Byla hodnocena kapacita energetického metabolismu buněk s převahou oxidativní nebo glykolytické tvorby ATP při adaptaci na hypoxii resp. fyziologickou normoxii. Ukázalo se, že aerobní typ buněk při adaptaci na hypoxii více zvyšuje kapacitu energetického metabolismu buňky avšak maximální rychlost respirace u adaptovaných i kontrolních buněk zůstává nezměněná.

K těmto výsledkům bych měl několik připomínek:

- (1) Nálezy týkající se komplexu I souborně shrnuje graf 45 na str. 89, který je koncipovaný z hlediska tvorby ROS. Myslím, že by bylo vhodné, kdyby mu předcházela ještě jeden graf jednodušší, který by se vyjádřil k dalšímu důležitému aspektu a to mechanismu propojení transportu elektronů a protonů. Výsledky ukazují také, že transport elektronů zůstává nezměněn při vyřazení

jednoho ze tří míst transportujících protony lze předpokládat, že na komplexu III a IV existují stejné mechanismy propojení transportu elektronů a protonů?

- (2) Různé práce, které používají CoQ1, CoQ3 nebo substituenty se sníženou hydrofobicitou (např. Idebenon), které lépe pronikají do buněk se liší svojí schopností reagovat s různými mitochondriálními oxidoredukčními komponentami. Netestovali jste také některé z těchto látek?
- (3) Jestliže se rychlost respirace adaptovaných a neadaptovaných buněk neliší, lze předpokládat rozdíly v tvorbě ROS?

Závěrem bych chtěl konstatovat, že předkládaná práce přináší řadu prioritních poznatků získaných moderními biofyzikálními, biochemickými a molekulárně biologickými metodami. Výsledky jsou presentovány přehlednými grafy. Jednotlivé kapitoly výsledků na sebe logicky navazují. Úvod i diskuse jsou podloženy obsáhlým souborem 302 citací. Práce plně odpovídá svým obsahem i rozsahem požadavkům kladeným na doktorskou disertaci. Navrhuji proto, aby byl RNDr Janu Ježkovi udělen titul PhD.

  
RNDr Zdeněk Drahota, DrSc

V Praze dne 11. února 2010.