

Oponentský posudek disertační práce Ing. Filipa Majera „Liver gangliosides in estrogen-induced cholestasis“

Předkládaná disertační práce pojednává o dosud nestudované problematice změn ve spektru gangliosidů u cholestázy. Disertace je postavena na dvou publikacích: první je chromatografická studie¹ publikována v časopise Biomedical Chromatography (IF 1.663) popisující významné zjištění, že u cholestázy indukované ethinylestradiolem u potkanů kmene Wistar dochází k významnému nárůstu gangliosidů biosyntetické větve b, která je za normální situace u tohoto kmene naprosto minoritní. Dochází tedy pravděpodobně k aktivaci b-větve biosyntézy, která může být podle autora způsobena estrogeny. Druhá práce je převážně histochemická studie² publikována v časopise Glycoconjugate Journal (IF 1.602). Pojednává o nález, že u ethinylestradiolem indukované cholestázy dochází k přesunu GM1 gangliosidu do sinusoidální membrány hepatocytů a to i při nezvýšené expresi mRNA pro GM1 syntasu i GD3 syntasu.

Aktuálnost práce spočívá v přínosu nových, do této doby nepublikovaných poznatků o úloze gangliosidů u cholestázy. Doplňuje mozaiku dosavadních vědomostí o poklesu fluidity buněčné membrány u cholestázy zjištěním, že gangliosidy jsou zřejmě těmi molekulami, které hlavně přispívají ke zpevnění membrány hepatocytu v případě ohrožení detergentními účinky žlučových kyselin. Toto zjištění je v souladu se skutečností, že gangliosidy s převahou nasycených mastných kyselin patří mezi rigidní membránové molekuly ve srovnání s mnohem tekutějšími molekulami nenasyčených fosfolipidů.

Po metodické stránce se jeví propojení mikroskopie a analýzy histochemického obrazu jako originální přístup, protože lze sledovat děje v játrech při cholestáze, aniž jsou separovány jednotlivé hepatocyty nebo jejich polarizované membrány. V disertaci je poukázáno na to, že postupy separace basolaterální (sinusoidální) a apikální (kanalikulární) membrány hepatocytů selhávají vzhledem k obtížné charakterizaci čistoty frakcí. Je to doloženo přesunem pozitivitu markeru apikální membrány – alkalické fosfatázy – z apikální do laterální membrány právě u cholestázy. Rovněž buněčné kultury nejsou pro řešení otázek cholestázy relevantní, neboť nereprezentují aktuální situaci v tkáni tj. kontakt hepatocytů s krevním řečištěm prostřednictvím sinusoidální membrány.

Význam studie spočívá ve zjištění, že zvýšený přesun gangliosidů do sinusoidální membrány při cholestáze může být mechanismem, zabraňujícím narušení plasmatické membrány hepatocytů detergentním účinkem vysoké koncentrace žlučových kyselin, které by vedlo k nekroze a náhradě buňkami vaziva, k fibróze a cirhóze. Jedná se tedy o výzkum přinášející základní poznatky v problematice cholestázy a poukazující na možné praktické výstupy v budoucnosti.

Dotazy a připomínky:

Po formální stránce je v práci je jen minimální množství překlepů a nejasností, které nepovažuji za závažné. Např. :

- na str. 5, ve třetí řádce se opakuje 2x the pathological

¹ Estrogen-induced cholestasis results in a dramatic increase of b-series gangliosides in the rat liver. Majer F aj. Biomed. Chromatogr., Biomed. Chromatogr., 21(2007)446-450

² Changes in GM1 ganglioside content and localization in cholestatic rat liver. Jirkovská M, Majer F aj. Glycoconj. J., 24 (2007)231-241

- na str.39 v nadpisu Table 4-1b se opakuje Controls EE-treated
- křivky v grafu na str.41 (Fig.4-3) by mohly být v černobílém provedení výrazněji odlišeny, jinak splývají
- Densitometric quantification v Table 4-9 (str.46) a 4-11(str 48) - pro lepší srozumitelnost by bylo lépe vyznačit že jde o vyhodnocení mikroskopického obrazu, tj. jiný systém než pro TLC. Jaké jednotky jsou zde používány?

Otázky: V první části práce jste poukázal na to, že hlavní výrazně zvýšené gangliosidy jsou GT1b, GD1b, GD3 a GD1a. V druhé histochemické práci jste sledoval gangliosid GM1, zřejmě pro snadnou dostupnost Cholera toxinu B-podjednotky, použité k detekci.

1) Dá se předpokládat přesun do sinusoidální membrány i u gangliosidů b-série které jsou u cholestázy tak výrazně zvýšeny (tj. GT1b a GD1b, GD3 a GD2 gangliosidů)?

2) Jak tuto lokalizaci imunohistochemicky prokázat např známou specifickou vazbou s tetanus toxinem nebo s protilátkami a jak je to s jejich dostupností ?

3) Jaké jsou výhody a nevýhody klasického histochemického průkazu GM1 s cholera toxinem a případně fluorescenčně značeného cholera toxinu. Neuvažoval jste o případné kolokalizaci s jinými molekulárními membránovými markery?

Závěr:

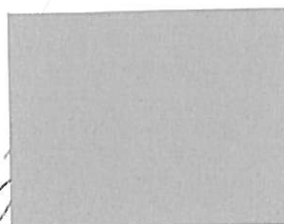
Ing. Majer prokázal ve své disertační práci, že je detailně obeznámen s problematikou cholestázy i biochemie gangliosidů, že ovládá řadu biochemických, molekulárně biologických i histochemických metod, spolupracuje aktivně s pracovníky dalších oborů (především histopatology) a dokáže výsledky logicky interpretovat.

Kromě uvedených 2 publikací o gangliosidech u cholestázy je spoluautorem dalších 4 publikací nesouvisejících s touto problematikou (dvě publikace z problematiky své diplomové práce, publikace o identifikaci produktů redukce bilirubinu a další z oblasti fotodynamické terapie)

To vše svědčí o schopnostech všestranného vědeckého pracovníka, který je schopen samostatně řešit složité vědecké problémy.

Vzhledem k tomu, že práce splnila vytyčené cíle a veškeré odborné požadavky pro získání titulu Ph.D., doporučuji tuto disertaci k obhajobě a k následnému řízení.

V Praze dne 31.května 2009



RNDr.Jana Ledvinová, CSc.

Ústav dědičných metabolických poruch
1. lékařská fakulta Univerzita Karlova v Praze
a Všeobecná fakultní nemocnice v Praze