

Oponentský posudek disertační práce Mgr. René Endlichera:

Studium změn energetického metabolismu hepatocytů: působení oxidačního stresu a trijodtyronínu.

Doktorská disertační práce Mgr. René Endlichera byla vypracována na Ústavu fyziologie Lékařské fakulty v Hradci Králové. Předložená práce je v podstatě zaměřena na bioenergetické pochody, které probíhají v savčích játrech. Autor se věnoval hlavně tvorbě kyslíkových radikálů a jejich úloze v životě jaterních buněk a jejich mitochondrií. Na tuto problematiku logicky navazuje zkoumání jevu změny propustnosti mitochondriální membrány, která je zprostředkována, zatím ne zcela jasně definovaným, membránovým pórem. Tyto mitochondriální děje se v posledních letech těší zájmu mnoha vědeckých pracovišť, neboť se ukazuje jejich stále větší úloha u řady fyziologických i patofyziologických dějů u mnohobuněčných organismů. Tyto procesy jsou spojeny zejména s problematikou buněčné smrti, ať už apoptózou či nekrozou, ale také s celou řadou dalších buněčných pochodů.

Formální uspořádání disertační práce sleduje klasické členění: Literární přehled, Materiál a metody, Výsledky, Diskuse a konečně Závěr. Co se textu týče, z formálního hlediska je práce celkem dobře vypravena, obsahuje snesitelné množství překlepů či stylistických neobratností a narazil jsem na jediný prohřešek proti českému pravopisu. Připomínek ke grafické části práce je trochu více a zmíním je v části týkající se výsledků.

Literární přehled je napsán přehledně a představuje kompaktní a ucelený pohled na zkoumanou problematiku. Musím však podotknout, že některá sdělení mi připadala až příliš stručná a pro čtenáře ne zcela důvěrně seznámeného s problematikou poněkud obtížně sledovatelná. Domnívám se, že autor mohl určitá fakta trochu rozvinout. Příklad: Na straně 29 je věta „Zvýšení hladiny Ca^{2+} stimuluje produkci ROS“. K tomuto tvrzení schází citace (pokud to není ta o dvě věty později). Nebylo by ale špatné připojit pár slov jak a proč. Předpokládám, že ten kdo tohle zjištění publikoval o tom něco ví nebo si alespoň myslí. K této části práce mám ještě několik dalších připomínek:

1. Zajímavá je citace u obrázku č. 4, jedná se o osobní dar od Tomáše Mráčka?
2. Autor v literárním přehledu udává, že 1-2% celkového kyslíku spotřebovaného mitochondriemi je přeměněno na superoxidový radikál. Jiní autoři však uvádějí číslo o řád nižší s tím, že v podmínkách *in vivo* je parciální tlak kyslíku mnohem nižší než v podmínkách *in vitro*, kdy byly získány hodnoty vyšší.
3. Domnívám se, že superoxidodismutáza by si zasloužila podrobnější zmínku. Vhodné by bylo uvést alespoň její tři isoenzymy, jejich kofaktory a lokalizaci.
4. mtDNA skutečně neobsahuje histony, ale nukleoidy, které v mitochondriích vytváří, obsahují proteinovou složku, která je může suplovat.

5. Proces uvolnění cytochromu c z mezimembránového prostoru za účasti proapoptotických proteinů rodiny BH123 (BAX, BAK aj.) je popsán v učebnicích buněčné biologie (Lodish, Alberts). A právě nový model tubulárního uspořádání krist asi jejich narovnání neumožňuje.

Výsledky jsou přehledně shrnuty a často i komentovány, výhrady však mám k velikosti, zřetelnosti a smysluplnosti některých grafů. V práci se vyskytují nejednotné popisy některých grafů, autor někdy používá termín bobtnání, jindy zase anglické swelling, pokud se tedy nejedná skutečně o dva různé děje. Např. graf 31 pojmenovaný „*Kalciem indukovaný swelling...*“ působí trochu jako špatný překlad letáku ke zdravé výživě. Barevné odlišení čar v grafech neumožňuje ani čtenáři bez poruchy barvocitu dobře rozeznat, která čára je která (zejména černá a tmavě modrá). Asi by bylo vhodné vedle různých barev použít i různé symboly a u grafů s vyšším počtem čar zvětšit měřítko osy Y tak, aby se změť čar trochu rozpletla. Lze pochybovat o významu fotografií, které ukazují měřící aparatury, domnívám se, že obrázek spleti hadiček, oplechované skříňky a monitoru stojícího na další skříňce má, snad kromě estetické, nulovou vypovídací hodnotu. Nakonec by mě zajímalo, zda éterová narkóza nemůže poškodit hepatocyty a co znamená tajemný koeficient F při stanovení aktivity laktát dehydrogenázy.

Diskusní část shrnuje dosažené výsledky a zařazuje je do kontextu s nálezy jiných autorů. Nebylo by však možná na škodu, kdyby se autor pustil do odvážnějších spekulací a neomezil se někde na pouhé konstatování svých výsledků či na srovnání s nálezy jiných badatelů.

Souhrn výsledků výstižně prezentuje ta nejdůležitější zjištění. Za obzvlášť cenné považuji zavedení metody pro kvantifikaci bobtnání mitochondrií a prokázání tkáňově specifických rozdílů v citlivosti mitochondrií k Ca^{2+} . To ovšem nijak nesnižuje přínos ostatních nálezů.

V předkládané práci jsem narazil na několik věcí, které bych rád okomentoval, nebo se na ně zeptal.

1. V literárním úvodu je napsáno (str. 17), že volné radikály se díky své reaktivitě staly velmi významnými prostředníky přenosu energie. Co to přesně znamená?
2. Jaký je autorův názor na morfologii mitochondrií? V literárním přehledu na jedné straně píše o existenci mitochondriální sítě, jindy je popisuje jako oválné organely.
3. Na straně 28 se píše o stimulaci ATP hydroláz depolarizací mitochondriálních membrán. Jaké hydrolázy má autor na mysli?
4. Na stejné straně jsem nerozuměl tvrzení o stimulaci oxidace NADH zvětšením objemu matrix.
5. Na následující straně (29) je zmínka o akumulaci pyrofosfátu v matrix, jak zde vzniká a jak souvisí s odstraněním nukleotidů z ANT?

6. Co jsou to „ Ca^{2+} dependentní dehydrogenázy, které jsou zodpovědné za syntézu ATP z ADP a fosfátu“ (str.95)?
7. Jak si autor vysvětluje rozdílnou citlivost Komplexu I a Komplexu II vůči t-BHP?
8. Překvapivé je podle mě srovnání působení trijódtyroninu na izolované mitochondrie a „in vivo“ v pokusných zvířatech. Má autor nějakou představu o mechanismu působení T3 na izolované mitochondrie. Při znalosti mechanismu účinku thyreoidních hormonů celou buňku a tedy na jaderný genom si lze při troše fantazie představit změnu exprese mtDNA genů pro některé podjednotky komplexů oxidační fosforylace, ale co ty ostatní složky (ANT, VDAC, fosfolipidy atd.).

Přes uvedené výhrady či komentáře se domnívám, že předkládaná práce představuje výsledek usilovné práce završený cenným souborem původních nálezů. Již pouhý letmý pohled na metodickou část dosvědčí, že Mgr. René Endlicher v průběhu práce ovládl a použil široké spektrum experimentálních metod. Také výsledky v práci uvedené jasně prokazují, že autor přinesl svůj vlastní díl k objasnění komplikovaných procesů, při kterých vznikají kyslíkové radikály a následně celé řady pochodů, které tyto molekuly mohou ovlivňovat. Podle mého názoru je nepochybné, že Mgr. René Endlicher prokázal schopnost samostatně vědecky pracovat, výsledky svojí práce formulovat a na jejich základě plánovat pokračování výzkumu. Doporučuji proto, aby na základě předkládané práce byla Mgr. René Endlicherovi udělena vědecká hodnost PhD.

Praha, 20. 5. 2010

Doc. RNDr. Martin Kalous, CSc.
Katedra buněčné biologie
Přírodovědecká fakulta UK Praha