

V Praze dne 29. 5. 2009

Posudek na diplomovou práci Bc. Marty Coufalíkové s názvem „Reverzní transport cholesterolu stanovený *in vivo*“

Bc. Martina Coufalíková vypracovala svojí diplomovou práci na renomovaném pracovišti, v Laboratoři pro výzkum aterosklerózy, Institutu Klinické a Experimentální Medicíny (IKEM) pod vedením Prof. Ing. Rudolfa Poledne, DrSc. Práce obsahuje celkem 52 stran, je členěna optimálním způsobem na abstrakt, seznam literárních zkratk, literární přehled, cíle diplomové práce, materiál, metodu, výsledky, závěr a seznam použité literatury.

Cílem diplomové práce bylo využít *ve světovém výzkumu vyjíměčný* experimentální model (vypracovaný v IKEM), „Pražského hereditární hypercholesterolemického potkana (PHHCP)“. Jedná se o potkany, kteří mají vysokou schopnost čelit zvýšené nabídce cholesterolu v potravě a u nichž za přirozených podmínek existuje v krvi vysoká hladina (koncentrace) tohoto nebezpečného rizikového faktoru pro lidské zdraví. V případě samců (potkani) dosahuje hladina cholesterolu v krvi koncentrace 8 mM, v případě samic 10 mM. Hladina cholesterolu v krvi normálních potkanů chovaných v zajetí je 2mM. Současně, přes tuto několikanásobně vyšší hladinu cholesterolu v krvi, u těchto potkanů nebyly pozorovány aterosklerotické změny v cévách.

Pro postižení významu tohoto modelu i této diplomové práce bych chtěl bych čtenáře upozornit na to, že rozpustnost cholesterolu ve vodných mediích (tedy bez albuminu a jiných bílkovinných komponent plasmy) je velmi nízká. Jedná se o klasickou „zcela hydrofobní látku“. Rozpustnost cholesterolu v krvi zajišťuje vazba na krevní bílkoviny, především albumin. Současně je cholesterol je přirozenou součástí buněčné membrány všech buněk v organismu, kde je preferenčně lokalizován ve specifickém „kompartmentu“ nazývaném membránové domény (či mikrodomény). V buňkách exprimujících caveolin jsou *membránové domény* uspořádány do typického omega tvaru (flask shape) a obsahují řadu klíčových molekul signálního přenosu na úrovni buněčné membrány - receptory, monomerní i trimerní G proteiny, src a fyn kinázy a řadu dalších molekul. Jedná se o dynamické struktury jejichž struktura i funkce se mění v závislosti na metabolickém i nutričním stavu buňky a deplece cholesterolu v buněčné membráně vede k degradaci těchto struktur i snížení účinnosti přenosu dané signální kaskády. Je zřejmé, že celková hladina cholesterolu v buňce bude neznámým způsobem odrážet zvýšenou hladinu cholesterolu v tělních tekutinách a model PHHP je proto velmi vhodný i pro studium vlivu hypercholesterolemie na strukturu a funkci membránových domén, resp. účinnost signálního přenosu ve vybraných buněčných typech organismu.

Cílem diplomové práce bylo:

- analyzovat složení lipoproteinů u PHHCP, zejména nascentních VLDL částic,
- zavést novou metodu pro stanovení reversního transportu cholesterolu v podmínkách *in vivo*, tedy na celém zvířeti.

V této souvislosti je třeba jasně říci že právě takové zadání diplomové práce je velmi náročné vzhledem k pracovnímu nasazení diplomanta protože *nevyužívá* již dříve zavedené metodické postupy dané laboratoře. Diplomant se proto musí s vysokým pracovním nasazením a nemalou invencí věnovat vypracování diplomové práce.

Bc. Coufalíková tento náročný úkol úspěšně zvládla s použitím náročné techniky využívající radioaktivní isotopy. Pro měření reversního transportu cholesterolu použila radioaktivně značený cholesterol. Důležité je že si uvědomila, že pro úspěšné měření reversního transportu této látky v relativně velkém zvířeti jako je potkan (ve srovnání s myši) je třeba použít *vysoké celkové radioaktivity* radioaktivně značeného cholesterolu. Jen tímto způsobem lze zajistit vytvoření rovnovážných podmínek ve značení celkového množství cholesterolu v organismu. Díky tomu přístupu Bc. Coufalíková prokázala řadu originálních výsledků které není třeba opakovat, protože jsou podrobně uvedeny v abstraktu práce. Osobně mne nejvíce zaujal nález prokazující, že u PHHC potkanů na cholesterolové dietě (rozuměj dietě obsahující vysoké množství cholesterolu) jsou v játrech tvořeny nascentní VLDL částice, které jsou obohaceny cholesterolem.

K práci nemám žádné kritické poznámky, jen obecný dotaz.

Triton WR 1339, který se používá, jak autorka konstatuje na str. 26, v klinické praxi jako povrchově aktivní látka pro rozpouštění a odstraňování bronchopulmonálních sekretů, bude zřejmě narušovat integritu buněčné membrány u těch buněčných typů, se kterými přijde do přímého styku. Plíce obsahují společně se střevem největší obsah kaveol a detergenty se používají jako nástroj pro rozpouštění většiny buněčné membrány a přípravu specifické membránové frakce, detergent-resistantních membránových domén resp. kaveol (jedná se o biochemický postup pro izolaci membránových domén flotací na hustotních sacharidových gradientech). Učiním správný předpoklad o tom, že by mohlo docházet k přímé komunikaci mezi cholesterolem obsažených v membránových doménách na povrchu buněk a cholesterolem který se při měření reversního transportu objeví ve VLDL?

Diplomovou práci považuji za vysoce kvalitní a to jak z hlediska výsledků, tak z hlediska formy jakou byla připravena. Literární úvod je psán stylem ze kterého je zřejmé, že studentka problematice skutečně rozumí. Vyjadřuje se čtivě i přesně, což bývá u nemalého počtu studentů problémem. Bylo proto pro mne potěšením číst text této práce. Bc. Coufalíková zvládla metodicky i časově náročnou metodu a získala řadu originálních výsledků. Diplomovou práci proto plně doporučuji k obhajobě s výborným hodnocením.



Doc. RNDr Petr Svoboda, DrSc