

Oponentský posudek na disertační práci ing. Tomáše Jeleníka „Analysis of the involvement of α 2-AMPK in the beneficial effect of n-3 polyunsaturated fatty acids on obesity-associated metabolic derangements“

Předkládaná práce se zabývá studiem pozitivního vlivu n-3 polynenasycených mastných kyselin (n-3 PUFA) na rozvoj obezity a inzulínové rezistence s cílem nalezení mechanismu tohoto efektu. Menší část disertační práce je věnována studiu zvýšení účinnosti působení n-3 PUFA. Disertace vznikla ve Fyziologickém ústavu AV ČR na oddělení Biologie tukové tkáně, které má s problematikou fyziologie a patofyziologie tukové tkáně dlouholetou praxi. Práce představuje velmi ucelený pokus pochopit roli AMP-dependentní protein kinasy (AMPK) v mechanismu účinku n-3 PUFA. Vzhledem k významu, který má AMPK v regulaci metabolismu na úrovni buňky i celého organismu se jeví snaha pochopit interakci mezi AMPK a n-3 PUFA jako zásadní pro další studium vlivu dietetického příjmu n-3 PUFA na obezitu a metabolický syndrom a pro následné využití v klinické praxi.

Práce je psána anglicky a představuje souhrn dat publikovaných ve čtyřech článcích v mezinárodních impaktovaných časopisech, kde ing. Jeleník je 1x prvním autorem a 3x spoluautorem. Jádrem disertace tvoří práce přijatá do časopisu *Diabetes*, který představuje prestižní vědecký časopis v oboru, ve kterém ing. Jeleník předkládá dizertaci. Po formální stránce je předložená disertace rozdělena standardně, přičemž na závěr práce jsou přiloženy vyšle publikace vztahující se k tématu. Vzhledem k tomu, že nálezy autora prošly náročným recenzním řízením, je práce oponenta velmi zjednodušená.

Disertace je uvedena **literárním přehledem** (14 stran), který představuje velmi pěkně zpracovaný a čtivý úvod poskytující čtenáři dostatečný obraz o úloze AMPK a PUFA v metabolismu. Z literárního přehledu je zřejmé, že autor důkladně pronikl do sledované problematiky a dobře se orientoval ve velmi rozsáhlé světové literatuře týkající se obezity a metabolického syndromu. Uvítal bych pouze rozsáhlejší zpracování problematiky inzulínové rezistence v klíčových metabolicky aktivních tkáních jako jsou sval nebo játra. Literární přehled je opatřen řadou instruktivních schémat. Bohužel některé zkratky použité v těchto obrázcích nejsou vysvětleny v textu ani ve vysvětlivkách na str. 4 a 5. Např. v obr. 1.1-2: CM (? chylomikron), HSL (? hormon-senzitivní lipasa); obr. 1.1-3: DGAT (? diacylglycerolacyltransferasa), PI3K (? fosfatidylinositol 3-kinasa), etc.

Cíle práce jsou jasně formulovány, v následujícím textu jsou dosaženy a vznesené otázky jsou adekvátně zodpovězeny.

Metodická část je zpracována na 15 stranách textu včetně použití statistických metod, detailnější popis je možno nalézt v přiložených publikacích. Obdivuhodné je metodické rozpětí disertace od metod molekulárně biologických (PCR etc.) přes biochemické a histologické metody až po práci na

izolovaných buňkách a na celých zvířatech (hyperinsulinový-euglykemický clamp na myši). Díky spolupráci se specializovanými analytickými pracovišti mohly být také analyzovány hladiny nukleotidů a spektra mastných kyselin v jednotlivých třídách lipidů. K metodické části mám několik připomínek a otázek:

1. Proč autor ve studii č. 1 pracoval jak se samci tak i samicemi, ale některá klíčová měření (test glukózové tolerance u samic vs. hyperinzulinový clamp u samců) dělal jen na jednom pohlaví?
2. Do jaké míry je možné se spoléhat na to, že lidský insulin (Actrapid) se bude u myši chovat identicky jako přirozený ligand?
3. Na straně 32 je uvedena zkratka pro *whole-body glucose turnover* jako GTR, ale ve vzorci na straně 33 nahoře je tato veličina popsána jako GTO.
4. Výpočtem rozměru veličiny GIR (*glucose infusion rate*) na str. 32 po dosazení rozměrů jednotlivých veličin v rovnici pro GIR není možné odvodit autorem uvedený rozměr [$\mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$]:

$$\text{GIR} = (\text{gir} \times c)/m = \{[\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}] \times [\mu\text{M}]\} / \text{kg} = \{[\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}] \times [\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}]\} / \text{kg} = [\mu\text{mol}^2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{l}^{-1}]:$$

Domnívám se proto, že infúzní rychlost glukózy gir musel autor vyjadřovat nikoli v rozměru [$\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$], jak uvádí, ale jako [$\mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1}$]. Potom výše zmíněná rovnice vychází v rozměru udávaném autorem:

$$\text{GIR} = (\text{gir} \times c)/m = \{[\mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1}] \times [\mu\text{mol} \cdot \mu\text{l}^{-1}]\} / \text{kg} = [\mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}]$$

5. Autor prováděl řadu kvantifikací různých transkriptů metodou „real-time PCR“ s využitím cyclophilinu B jako normalizačního, tj. invariantního genu (housekeeping gen). Z popisu metody není zřejmé, jaká metoda kvantifikace transkriptu byla použita (kalibr. křivka, $\Delta\Delta C_t$) a jak autor ověřil, invariantnost hladiny mRNA pro cyclophilin B při dlouhodobých pokusech spojených s podáváním různé diety a s celkovou změnou metabolismu.
6. Jakým způsobem byla *post-hoc* hodnocena data v případě signifikace dvourozměrné ANOVy (v textu není uvedeno, ale z výsledků je zřejmé, že tato porovnání byla prováděna)?

Výsledky (35 stran) jsou prezentovány přehledným způsobem a pečlivě dokumentovány, grafy a tabulky jsou dobře srozumitelné. Vzhledem k tomu, že výsledky byly publikovány v impaktovaných časopisech, které mají náročné řízení, považuji za zbytečné se k jejich odborné úrovni dále vyjadřovat. Ocenit je však nutné detailní studium vlivu n-3 PUFA na celou řadu parametrů jak u normálních tak i geneticky modifikovaných myší (AMPK $\alpha 2^{-/-}$, delece genu pro $\alpha 2$ subjednotku AMPK). K výsledkové části mám jen jednu formální připomínku:

1. Odkazy na separáty publikovaných prací neodpovídají svým číslováním seznamu na str. 99 (viz str. 67 pravděpodobně Paper 4 a nikoli Paper 1, str. 70 pravděpodobně Paper 3 a nikoli Paper 2).

Diskuse je poměrně stručná (6,5 stran), avšak dostatečná ke kritickému zhodnocení dosažených výsledků. Postrádám pouze širší zhodnocení nálezů změn ve vztahu k pohlaví a proto bych uvítal širší komentář autora k této otázce. V souvislosti s interpretací nálezů bych se proto rád zeptal:

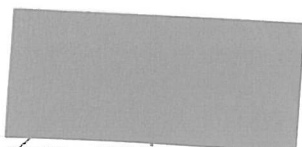
1. Nejsou pohlavní rozdíly příčinou nevýrazného rozdílu v glukózové toleranci oproti výsledkům s hyperinzulinovým clampem?
2. Mají autoři nějaké vysvětlení pro rozdíl v pozitivním působení diety CHF+F u samců a samic?
3. Do jaké míry lze předpokládat, že změny v hladinách transkriptů korelují se změnami v aktivitách enzymů? Pokud lze předpokládat, že CHF potlačí lipogenezi a PUFA působí opačně, jakým způsobem by bylo možné interpretovat rozdílné výsledky s dietami CHF+substance-2, CHF+F a DHA v pokuse „*reversal study*“ (viz Tab. 4.2-1)?
4. Do jaké míry lze převést výsledky získané na laboratorním hlodavci na člověka?

Citace. V textu je citováno 130 prací. Po formální stránce nejsou citace sjednoceny, někdy jsou uváděny pouze zkratky časopisů (\pm tečka), jindy je uveden název celý. Tyto formální nedostatky však nepovažuji z hlediska celkové práce za podstatné.

Závěr

Předložená disertace je práce obsahově a odborně na vysoké úrovni, která přináší vysoce hodnotné nálezy o mechanismu působení n-3 PUFA a naznačuje možnosti využití n-3 PUFA v praxi. Všechny nálezy byly publikovány v mezinárodně uznávaných impaktovaných časopisech. Autor prokázal, že ovládá metody experimentální práce a má teoretické i praktické schopnosti k samostatné tvořivé vědecké práci. Předložená práce tudíž plně splňuje požadavky, které jsou kladeny na doktorskou disertační práci, a proto doporučuji, aby ing. Tomáši Jeleníkovi byl po úspěšné obhajobě udělen titul „Ph.D.“

V Praze-Krči dne 5. 11. 2010



Prof. RNDr. Jiří Pácha, DrSc