

Oponentský posudek disertační práce

Možnosti indukce UCP2 (uncoupling protein 2) v hepatocytech potkana v podmínkách *in vivo*

Autor: Mgr. Radka Bolehovská

Oponent: Ing. Dalibor Novotný, Ph.D.

1. Zvolené téma: Disertační práci Mgr. Radky Bolehovské lze chápat jako součást systematického bazálního výzkumu, který mapuje roli, resp. funkce UCP2 proteinu v energetickém, buněčném a celkovém metabolismu. Jde o téma velmi významné a aktuální, které daleko přesahuje hranici fundamentálního výzkumu, neboť působení UCP2 je dáváno do souvislosti s homeostázou bazálního metabolismu, s ochranou proti tvorbě reaktivních kyslíkových radikálů, se zánětem, s termogenní regulací, s oxidací volných mastných kyselin apod. Tyto procesy pak mají příčinou souvislost s řadou zejména komplexních onemocnění, jako je ateroskleróza, diabetes mellitus 2. typu, metabolický syndrom, obezita, oxidativní stres nebo nádorové bujení. V současnosti ostatně existuje celá řada asociačních a jiných klinických studií, které studují např. vztah genových polymorfismů UCP2 k DM 2. typu, obezitě, ale také k riziku ischemické cévní mozkové příhody, syndromu polycystických ovárií, k zánětlivým markerům apod.

Sledování základních regulačních mechanismů, které ovlivňují expresi UCP2 proteinu *in vivo*, je nezbytným předpokladem pro bližší studium působení těchto metabolických přenašečů vnitřní mitochondriální membrány.

2. Zvolené metody: Pro naplnění hlavního cíle disertační práce, kterým bylo studium indukce exprese mRNA UCP2 v jaterní tkáni potkana na bázi molekulárně biologických metod, byla zvolena strategie, která zahrnovala testování indukce genové exprese na modelu mGPDH. Tento modelový přístup mi připadá jako velmi vhodně zvolený, protože umožnil vyhodnotit expresi mRNA vzhledem k enzymové aktivitě a „proteinové hmotě“ GPDH, což by v případě UCP2 nešlo realizovat. Zvolený postup dále umožnil optimalizovat či ověřit zvolené časové schéma sledování kinetiky změny exprese mRNA. Optimalizaci a zavedení vlastního metodického postupu hodnotím velmi pozitivně: PCR v reálném čase je pro kvantifikaci templátu nejvhodnější metodou volby, čehož se hojně využívá v rutinní diagnostické praxi. Také optimalizace izolace, reverzní transkripce a výběr housekeepingového genu pro relativní kvantifikaci templátové mRNA byla provedena velmi pečlivě a z mého pohledu zcela správně.

Obecně lze o použitých pokusných schématech a zvolených technikách a metodách konstatovat, že byly provedeny s maximální pečlivostí a položily dobrý předpoklad pro následné správné vyhodnocení naměřených dat. Zavedením a optimalizací kvantitativní PCR v reálném čase pro detekci kinetiky exprese mRNA UCP2 u vzorků jaterní tkáně potkana byl zároveň naplněn hlavní cíl disertační práce.

3. Výsledky práce, jejich význam:

Na předložené disertační práci si cením zejména následujících skutečností:

- zavedení modelového systému indukce biogeneze mGPDH po jedné a více dávkách podávání T3, následné sledování kinetiky mRNA a aplikace tohoto postupu pro sledování exprese mRNA UCP2,
- ověření kinetiky změny exprese mRNA UCP2 s originální dávkou T3 (postup je původní a dříve nepublikovaný), souběžné sledování hladin tyroidních hormonů v séru,

- optimalizace molekulárně biologických metod, zejména pak optimalizace vstupního množství RNA, reverzní transkripce, výběr housekeepingového genu, zavedení standardní křivky pro kvantifikaci a celkovou optimalizaci rtPCR (zde bych vyzdvihнул také skutečnost, že namísto pracnější a ekonomicky náročnější varianty kitové RT byla zvolena home-made metoda),

- sledování změny exprese mUCP2 po parciální hepatektomii, kdy již po 3 hodinách dochází k maximální indukci UCP2 transkriptu,

- spolupráce s vědeckou institucí- oddělením Bioenergetiky Fyziologického ústavu Akademie věd ČR- při stanovení množství mGPDH za pomoci western blotu a RNA mGPDH za pomoci northern blotu.

Výsledky práce ukázaly, že po aplikaci jedné dávky T3 dochází ke dvojnásobnému zvýšení mRNA UCP2, nicméně po 3 dávkách došlo ke statisticky nevýznamnému zvýšení oproti jedné dávce. Zvýšení UCP2 transkriptu je vysvětleno pravděpodobným zvýšením energetického výdeje a metabolismu, které je regulováno tyroidními hormony během odprážení oxidativní fosforylace.

Práce tak přispěla k objasnění kinetiky změny exprese mRNA UCP2, která byla indukována T3 a částečnou hepatektomií. Nově zavedené a optimalizované molekulárně biologické postupy jsou využitelné v rámci dalšího výzkumu na poli sledování exprese mRNA UCP2. Z pohledu významu této studie pro další výzkum či praxi mi trochu chybí jasnější a jednoznačnější uvedení praktického využití jejích závěrů a naznačení dalšího směřování výzkumu v kapitole 6. (půjde např. o studium UCP2 jako fyziologického ochranného mechanismu proti zvýšené produkci reaktivních kyslíkových radikálů?).

4. Cíle práce, jejich naplnění

Hlavní cíle disertační práce uvedené v kapitole 3. Cíle práce byly naplněny bezesbytku.

5. Formální zpracování (jazyk, srozumitelnost textu, obrázků, literatura a její citování): Předkládaná práce obsahuje celkem 142 stran, včetně tabulek, grafů, obrázků a seznamu citované literatury. Její členění i obsah zcela odpovídají zvyklostem a potřebám disertační práce. Teze jsou napsány podle současných jazykových trendů. Tabulky, obrázky a grafy jsou kvalitně zpracovány, dobře popsány a vhodně přispívají k celkové srozumitelnosti podávaných informací. Pravopisných chyb jsem v textu našel jen zanedbatelné množství. Celkem 205 citací z odborné literatury svědčí o velmi pečlivém zpracování tématu, nechybí odkazy na zcela aktuální literární práce.

Přehled publikačních činností, který je uveden v bodě 11 autoreferátu disertační práce, svědčí o čínorodé aktivitě autorky jak na poli bazálního, tak i klinického výzkumu. Za pozornost jistě stojí i šíře zpracovávaných témat a přenesení teoretických poznatků do rutinní diagnostiky a péče o pacienta.

Závěr:

Předkládaná práce je hodnotná, v českém písemnictví ojedinělá, s řadou původních vědeckých a metodologických řešení. Práce bezesbytku odpovídá současným vědeckým trendům. Autorka Mgr. Radka Bolehovská v ní prokázala schopnost samostatné vědecké činnosti.

Proto tuto práci **d o p o r u č u j i** k obhajobě.

Zároveň **d o p o r u č u j i**, aby byl autorce po úspěšné obhajobě práce udělen titul doktor, ve zkratce Ph.D., dle zákona o vysokých školách.