

Hodnocení disertační práce:

„The study of fluorescent products in the mitochondria after an attack by free radicals“

Mgr. Jožko Ivica.

Předkládaná disertační práce je zaměřena na jednu z důležitých oblastí metabolických poruch a to na analýzu mechanismů negativních důsledků působení oxidačního stresu. Všeobecně se přijímá, že patogenese širokého spektra onemocnění nejznámějších orgánů spočívá v tvorbou prooxidačních látek a jejich interakcí s buněčnými strukturami, enzymovými komplexy, a dalšími komponentami buněčných metabolických procesů, jejichž důsledkem je porucha metabolických funkcí. Jedná se o velmi složité procesy a v současné době však není ještě k dispozici dostatek metodik nezbytných pro poznání mechanismů jejich tvorby. Proto se obrací pozornost i k lipofuscinoidním pigmentům, které se stávají důležitým indikátorem signalizujícím peroxidativní poškození tkání způsobené nejznámějšími endogenními i exogenními prooxidačními faktory.

Vzhledem k tomu, že lipofuscinoidní pigmenty představují široký soubor molekul vznikajících interakcí reaktivních peroxidů a peroxidů indukovaných látek s nejznámějšími aminy je jejich identifikace a kvantifikace velmi obtížným problémem. Tato práce se proto zabývá jednou z možných cest jak tuto situaci řešit a to s využitím specifické fluorescence lipofuscinoidních pigmentů. Tato práce stojí na dvou metodických ústupu: (a) na metodě detekce fluoroforů vzniklých působením prooxidačních

látek na biologické membrány pomocí 3dimensionálních i standardních dvourozměrných fluorescenčních spekter, (b) na identifikaci jednotlivých látek v oblasti zvýšené fluorescence pomocí HPLC chromatografie.

Proto je v první části práce věnována pozornost hodnocení trojrozměrných i dvojrozměrných fluorescenčních spekter lipofuscinoïdních pigmentů v modelových situacích, kdy jsou in vitro indukovány reaktivními prooxidanty působícími reaktivně dlouhou dobu na mitochondriální membrány.

V další části práce pak byla zavedena a optimalizovaná metoda HPLC analýzy fluorescenčních produktů. To byl také velmi obtížný metodický úkol vzhledem k značné heterogenitě hodnocených fluoroforů.

Na základě této metodické přípravy, autor získal účinný nástroj pro další studium mechanismu tvorby lipofuscinoïdních pigmentů v reaktivních biologických preparátech působením reaktivních látek indukujících peroxidativní poškození buněk. A to nejprve na modelu izolovaných mitochondriálních membrán a v další fázi i na modelu patologického stavu i na hodnocení peroxidativní zátěže mozku v průběhu vývoje a stárnutí.

Tyto metody ověřené na modelových preparátech in vitro a v modelových situacích patologických a adaptačních procesů, mají perspektivu využití jak pro diagnostiku rozvoje patologických procesů indukovaných oxidačním stresem tak i pro studium vlastních mechanismů peroxidativních procesů, především z hlediska specifické odolnosti jednotlivých tkání i z hlediska hodnocení toxicity reaktivních prooxidantů.

Na předkládané práci bych ocenil kvalitní přehled literatury, vysokou metodickou úroveň zpracování a prezentaci i publikaci získaných nálezů.

K předkládané práci bych měl n kolik připomínek:

- osobně se mi nelíbí, že při izolaci mitochondrií, při centrifugaci, mitochondrie nesedimentují, ale precipitují (str. 35), nebo že mitochondrie byly inkubovány nula hodin (str. 55).
- při prezentaci některých grafů, je podle mě nevýhoda, že nemají stejnou osu y, takže při jejich srovnávání v rámci jedné figury (A, B, C) zanikne, že jednotlivá maxima nebo minima se v průběhu inkubace zvyšují i snižují. Platí to jak pro grafy fluorescenčních spekter, tak i pro grafy HPLC. Například u Fig. 24 A,B,C, jsou hodnoty maxim stejné vysoké, při použití stejných os by však bylo na první pohled jasné, že hodnoty fluorescence při inkubaci s butylperoxidem jsou 3x resp 4x vyšší, než hodnoty autooxidace. Platí to například i při srovnávání derivovaných fluorescenčních spekter (Fig. 19). V některých případech u os y chybí popisy hodnot.

K předkládané disertaci bych měl tyto dotazy:

- existují údaje, které by srovnávaly hodnoty pro lipofusciny u erytrocytů s lymfocyty nebo trombocyty, které mají mitochondrie? Dalo by se předpokládat, že u erytrocytů je peroxidativní atak zvenčí, zatímco u lymfocytů a trombocytů by mohl být i zevnitř?
- výsledky vývojových studií ukazují, že v neonatálním období může docházet k poklesu obsahu lipofuscinoïdních pigmentů v mozku. Je něco známo o mechanismu, jak to novorozená tkáň zvládne?

- presentované výsledky jasně prokazují tvorbu spektra různých lipofuscinů .
Je možné spekulovat, zda různé lipofusciny indikují zásah do různých metabolických drah?
- Uvažovali jste o možnostech hmotnostní spektrografie pro identifikaci jednotlivých komponent lipofuscinoidních pigmentů ?

Závěrem bych rád konstatoval, autoru se podařilo optimalizovat velmi náročné metodické postupy, získat řadu nových poznatků a získané výsledky zhodnotit, prezentovat a publikovat, jak dokazují přiložené publikace . Také bych rád zdůraznil, že získané poznatky i metodické zkušenosti mají vysoký potenciál pro další využití jak v diagnostice, klinickém i základním výzkumu. Byla by škoda, kdyby se v této cestě dále nepokračovalo.

Jsem přesvědčen, že disertační práce prokazuje předpoklady autora k samostatné vědecké tvůrčí práci a doporučuji, aby na jejím základě Mgr. Jožko Ivica získal titul Ph.D.

RNDr Zdeněk Drahoš, DrSc

V Praze dne 9. března 2013