

**Oponentský posudek doktorské disertační práce
Mgr. Michaely Svobodové**

**Amelioration of obesity – associated disorders by *n*-3 PUFA and oleuropein:
adipocentric view**

Rozsah práce

Předložená disertace je psána v angličtině a dokazuje jazykovou vybavenost autorky. Práce má klasickou formu a je členěna na úvod, vymezení cílů, stručnou metodiku, výsledkovou část a diskuzi integrující jednotlivá zpracovávaná témata. Celá práce je psána velmi jasným a věcným slohem, oceňuji zejména výstižnost a stručnost vyjadřování. Diskuze podává velmi jasný přehled dosažených výsledků v kontextu současného stavu problematiky, velmi přínosné je zpracování hlavních zjištění do přehledné tabulky, které umožňuje orientovat se v relativně velkém počtu experimentálních skupin.

Publikace

Součástí předkládané práce jsou tři publikace uveřejněné v mezinárodních renomovaných časopisech. Na jedné z publikací je předkladatelka prvním autorem. Podíl Mgr. Svobodové na jednotlivých publikacích je v disertační práci jasně uveden.

Cíle

Předkládaná disertace je zaměřena na studium strategií zaměřených na léčbu obezity, zejména na efekt *n*-3 polynenasycených mastných kyselin PUFA) v kombinaci buď s klasickou léčbou (thiazolidinediony, TZD), s režimovými opatřeními (mírná kalorická restrikce) nebo látkami odvozenými z přírodních polyfenolů (oleuropein). Jednotlivé studie, které zároveň představují jednotlivé kapitoly, rozpracovávají následující dílčí témata:

1. efekt kombinovaného podávání *n*-3 polynenasycených mastných kyselin a TZD (rosiglitazon, pioglitazon) na děje asociované s metabolickou inflexibilitou a poruchami metabolismu glukózy;
2. efekt kombinace podávání *n*-3 polynenasycených mastných kyselin a mírné kalorické restrikce s důrazem na úlohu bílé tukové tkáně;
3. charakteristik molekulárního mechanismu vlivu oleuropeinu (rostlinný polyfenol) na diferenciaci adipocytů.

Téma disertační práce je vysoce aktuální vzhledem k vysoké prevalenci obezity a s ní spojených zdravotních komplikací, zejména metabolického syndromu a diabetu 2. typu.

Úvod

předložené disertace je věnován literárnímu přehledu o současném stavu řešení problematiky. Zcela dostatečně pokrývá současný stav literatury vážící se k problematice řešené v předkládané disertační práci (regulace metabolických dějů v bílé a hnědé tukové tkáni, endokrinní funkce bílé tukové tkáně, známé metabolické účinky *n*-3 PUFA a rostlinných polyfenolů, proces diferenciacie adipocytů) a funkce jednotlivých adipokinů. Na této části práce lze vyzdvihnout konzistentní a věcný přístup, který poskytuje dostatečný přehled vztahující se k řešené problematice.

Metodická část

Dostatečně popisuje používané metodiky. Postrádám pouze popis měření oxidace mastných kyselin v m. soleus a m. gastrocnemius.

Výsledková část

Získané výsledky jsou přehledně popsány a názorně doloženy v grafech a tabulkách. Z hlavních výsledků lze uvést:

1. Z hlediska hledání nových terapeutických možností je velmi významné i zjištění, že kombinované podávání n-3 PUFA a nízkých dávek TZD (rosiglitazonu, pioglitazonu) má aditivní účinky v terapii dietně indukované hypertrofie tukové tkáně, hyperlipidemie a glukózové intolerance. Využití n-3 PUFA otvírá možnost snížit dávky TZD a omezit tak jejich negativní vedlejší účinky. Detailně provedené studie dále umožnily identifikovat rozdíly v působení jednotlivých TZD při kombinované léčbě TZD a n-3 PUFA (pouze rosiglitazon vede ke snížení váhového přírůstku, naopak pioglitazon snižuje ektopickou akumulaci triglyceridů v játrech, zlepšuje glukózovou toleranci a má větší vliv na produkci adiponektinu).
2. n-3 PUFA potencují efekt mírné kalorické restrikce při snižování dietně indukované obezity. V předkládané práci jsou identifikovány mechanismy podmiňující tuto synergii, a to indukce mitochondriální oxidace mastných kyselin v bílé tukové tkáni a následné potlačení projevů zánětu.
3. Unikátní zjištění představují výsledky studie zaměřené na vliv rostlinných polyfenolů na diferenciaci adipocytů bílé tukové tkáně. Autorka prokázala, že oleuropein, polyfenol izolovaný z olivových listů, inhibuje diferenciaci adipocytů prostřednictvím inhibice exprese PPARgamma, což představuje potenciální terapeutické využití při léčbě obezity.

Získané výsledky prokazují, že autorka dosáhla při řešení sledovaných otázek řady nových poznatků.

Diskuse

V diskuzi autorka podává komentář k získaným výsledkům, který svědčí o dobré znalosti problematiky.

Připomínky a dotazy:

Všechny publikované články prošly náročným recenzním řízením, které dostatečně prokázalo jejich kvalitu. K práci nemám žádné závažné připomínky, dotazy směřují pouze k upřesnění některých detailů nebo představují návrhy pro další práci.

Část I:

V této studii byla provedena rozsáhlá cílená metabolická analýza metabolitů nacházejících se v plazmě s cílem identifikovat metabolity/děje rozdílně ovlivněné působením rosiglitazonu a pioglitazonu v kombinaci s n-3 PUFA. Acylkarnitiny byly identifikovány jako jedna ze skupin s rozdílným zastoupením a na základě tohoto zjištění autorka odvodila závěry týkající se vlivu na mitochondriální oxidaci ve tkáních (jakých?). Moje výhrada se týká relevantnosti tohoto zjištění. Acylkarnitiny se vyskytují v matrix mitochondrie. Transport acylkarnitinů z mitochondrií ven do cytosolu je umožněn díky koordinované činnosti dvou mitochondriálních systémů – CrAT a CACT, avšak efektivita přenosu významně a progresivně klesá s délkou acylového řetězce. Biologicky významný je export acetylcarnitinu, kdy se jedná o mechanismus, který umožňuje buňkám zbavit se nadbytku energetického substrátu (určitý typ wasting) (Muio BBA 1801 (2010) 281-288; Noland JBC (2009) 284: 22840-22852). Rutinní stanovení obsahu acylkarnitinů, které se provádí u novorozenců s cílem identifikovat poruchy beta oxidace mastných kyselin, se provádí ve vzorku plné krve a sleduje se obsah acylkarnitinů v krevních buňkách (obsahujících mitochondrie). Práce Schooneman et al ukazuje srovnání obsahu acylkarnitinů v plazmě a ve tkáních (játra, m.

soleus, m. gastrocnemius, srdce, WAT, BAT) při hladovění a v sytém stavu. Autoři neprokázali korelaci mezi obsahem acylkarnitinu v plazmě a v žádné ze sledovaných tkání. Domnívám se, že tuto skutečnost je třeba vzít při interpretaci dat v úvahu. (BBA 2014, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2014.04.001>)

Část II:

Autorka vysvětluje pozitivní působení n-3 PUFA a mírné kalorické restriktce prostřednictvím zvýšené mitochondriální kapacity pro oxidaci mastných kyselin. Při formulaci této hypotézy se opírá o tyto výsledky:

- Zvýšená exprese genů funkčně asociovaných s metabolismem mitochondrií.
- Přímé měření respirační kapacity permeabilizovaných adipocytů.
- Měření utilizace palmitátu v izolovaných hepatocytech *in vitro*.

Při interpretaci dat týkajících se mitochondriálního metabolismu je třeba mít na paměti základní pravidlo, které říká, že energie se nemůže ztratit. Mitochondriální respirace je pod přísnou respirační kontrolou (intenzitu určuje dostupnost ATP) a pokud tedy není prokázán wasting, je nutné vysvětlit jak je vytvořená energie (ATP) využita. Souhlasím s vysvětlením, které autorka předkládá v případě tukové tkáně, a to využití energie na zrychlení lipolyticko/reesterifikačního cyklu, i když této teorii úplně neodpovídá exprese glycerol kinázy v epididymálním WAT (je ovšem dobře možné, že aktivita enzymu může být zvýšená, bylo by dobré doložit měřením nebo kvantifikací reesterifikace v této tkáni). Není mi ale jasné, jak vysvětlit zvýšenou „oxidaci“ palmitátu v izolovaných hepatocytech. Měřeným parametrem byla koncentrace ASM, které samy o sobě představují marker nekompletní oxidace a zvyšují se v případě, že nabídka redukovaných ekvivalentů přesahuje kapacitu mitochondriálního řetězce. Zvýšená koncentrace ASM je podle mě pouze ukazatelem vyšší beta-oxidace. Nezkoušela autorka stanovit produkci ketoláték *in vitro*, popř. obsah ketoláték v séru? Tvorba ketosloučenin může představovat alternativní cestu, jak se zbavit nadbytečného substrátu. Další možností je stanovit obsah acyl(zejména acetyl)carnitinů v moči, což rovněž představuje alternativní dráhu odstranění přebytečných mastných kyselin + navíc regeneraci volného CoA.

Část III:

Jak byly stanoveny referenční (housekeeper) geny při analýze genové exprese u nediferencovaných a diferencovaných adipocytů? Podle našich zkušeností i podle literárních údajů (Arsenijevic T et al. PLoS ONE 7(5): e37517. Doi:10.1371/journal.pone.0037517) se exprese téměř všech genů během diferenciací velice mění. Uvědomuji si, že ve vašem případě jste srovnávali expresi sledovaných genů ve stejném časovém bodu (11. den diferenciací), ale buňky rostoucí v přítomnosti 400 uM Oleu měly částečně nediferencovaný fenotyp. Prosim o vyjádření.

Závěr:

Předložená práce řeší aktuální a významnou problematiku. Studie byly provedeny na pracovišti, kde oblast výzkumu biologie tukové tkáně má tradičně vysokou úroveň, ke které přispívá i dlouholetá zahraniční spolupráce. S tím souvisí i použité metody, které jsou na špičkové úrovni a odpovídají současným trendům v dané oblasti výzkumu. Příložený soubor publikací dokumentuje, že výsledky studií byly publikovány v mezinárodních impaktovaných časopisech. Pečlivé shrnutí současných poznatků o problematice a věcná interpretace získaných výsledků dokazuje, že autorka je seznámena s problematikou v dané oblasti a je schopna rozvíjet vědecké přístupy při

řešení zvolené problematiky. Celkově má kandidátská disertační práce velmi dobrou úroveň.

Práce prokazuje předpoklady autorky k samostatné tvořivé vědecké práci a k udělení titulu „PhD.“ za jménem.

Monika Cahová, PhD.
Centrum experimentální medicíny
IKEM, Praha

Praha 19. 10. 2014