

## **Oponentský posudek na disertační práci MUDr. Kateřiny Jiroutkové: The Intensive Care Unit-Acquired Weakness: The role of mitochondrial dysfunction in its pathogenesis.**

Předkládaná práce je zaměřena na aktuální téma, úlohu dysfunkce mitochondrií a energetického metabolismu v patogenezi svalové slabosti u kriticky nemocných pacientů v protražované fázi onemocnění spojeném se sepsí a syndromem zánětlivé reakce (dále ICUAW) a specificky na detekci změn ve funkci a složení mitochondrií pomocí analýzy bioptických vzorků kosterního svalu. Práce o 80 ti stranách je členěna klasicky a v přílohách obsahuje 5 publikovaných prací disertantky – 4 původní práce v zahraničních impaktovaných časopisech (2x Journal of Parenteral and Enteral Nutrition, 1x Critical Care, 1x Mitochondrion) a 1 přehledný článek v Anesteziologii a intenzivní medicíně. Práce je v psaná v angličtině, obsahuje 10 tabulek, 23 figur a 239 citací.

V úvodní části (13 stran) je podán zasvěcený přehled o epidemiologii, klinice a rizikových faktorech svalové slabosti kriticky nemocných komplikující intenzivní péči pacientů se syndromem zánětlivé odpovědi, patofyziologii neuropatických a myopatických projevů, dysfunkci mitochondriální energetiky a terapeutických možnostech intenzivní péče vzhledem k následnému postižení kosterních svalů, procesu svalové regenerace a možnostech studia strukturních a funkčních změn bioptických vzorků svalové tkáně.

Následně jsou formulovány cíle – analyzovat metabolismus a strukturu mitochondrií kosterního svalu ICUAW pacientů vzhledem k předpokládanému postižení oxidativně fosforylačního (OXPHOS) aparátu, utilizaci substrátů a působení glutaminu pomocí citlivých funkčních metod. Tento zdánlivě jednoduchý záměr je ale primárně spojen s problematickou nebo chybějící experimentální metodikou pro studium mitochondriálních funkcí v bioptických vzorcích kosterního svalu. Proto podstatná část práce je zaměřená metodicky na aplikaci a optimalizaci citlivých oxygrafických technik a zavedení a ověření vhodných experimentálních modelů, které jsou shrnuty Materiálech a metodách (12 stran). Výsledky práce (16 stran) jsou členěny na optimalizaci metod, působení glutaminu a analýzu funkce a složení mitochondrií ve svalu pacientů a kontrol. Následuje podrobná diskuze (14 stran) a závěry.

Výsledkem disertační práce je úspěšné zavedení a praktické využití kombinace metod a *in vitro* modelů, které umožnily vytvořit systém pro komplexní fenotypizace mitochondrií ze svalových biopsií a aplikovat je na studium postižení kosterního svalu u ICUAW pacientů. Zahrnuje (i) vysoce citlivou oxygrafii čerstvých svalových homogenátů, měřenou systémem OROBOROS, zachovávající intaktní mitochondrie pro stanovení funkční kapacity jednotlivých komplexů respiračního řetězce, schopnosti syntetizovat ATP a spřažení oxidace substrátů s fosforylací. Naopak (ii) perspektivní systém Seahorse pro měření utilizace kyslíku a změn pH v médiu byl využit pro sledování oxidativního metabolismu a funkce mitochondrií a/nebo anaerobní glykolýzy v intaktních svalových buňkách. Tato měření kultivovaných svalových buněk testují aktuální mitochondriální tvorbu ATP i využití celkového potenciálu respiračního řetězce a přímo vypovídají o energetickém stavu buněk daném endogenními metabolity. Umožnily analyzovat nediferencované (myoblasty) i diferencované (myotuby) svalové buněky, oxidaci mastných kyselin a působení glutaminu.

V práci byly studovány svalové biopsie od 7 ICUW pacientů a 8 kontrol, které ukázaly u pacientů 50% redukci oxidační kapacity i fosforylace ADP odpovídající redukci množství mitochondrií, bez ovlivnění permeability vnitřní mitochondriální membrány. Současně byly



nalezeny kvalitativní rozdíly v OXPHOS aparátu, jmenovitě relativní zvýšení obsahu-kapacity respiračního komplexu II a GPDH, naopak snížení komplexu IV a III.

Endogenní respirace intaktních diferencovaných myoblastů od pacientů a kontrol se nelišila v tvorbě ATP, maximální respiraci, ani spřažení. Myotuby pacientů ale podstatně lépe utilizovaly exogenní mastné kyseliny. Dlouhodobá expozice myotub mastným kyselinám také vedla ke stimulaci bazální i maximální respirace u pacientů, ale ne u kontrol.

Analýza buněk kosterního svalu dále ukázala, že pro proliferaci buněk je dostatečný cca 0,3 mM glutamin. Vyšší koncentrace neměly vliv na proliferaci ani na parametry respirace, s výjimkou permeability „leaku“ – glutamin indukoval rozpřažení mitochondriální membrány, která byla ale zvýšená pouze v diferencovaných myotubách.

Současný biomedicínský výzkum přináší stále více poznatků o účast mitochondrií v patogenezi lidských onemocnění. Vedle dědičných poruch mitochondrií, které jsou primární příčinou mitochondriálních encefalokardiomyopatií, se může mitochondriální dysfunkce podílet na patogenezi multigenních, komplexních onemocnění, ale v řadě případů se ukazuje, že dysfunkce mitochondrií sice nastává sekundárně a přesto významně ovlivňuje průběh a projevy onemocnění. Výsledky práce MUDr. Jiroutkové vypracované na 3. LF UK pod vedením Doc. MUDr. Františka Dušky, PhD. V jasně ukázaly, že funkční postižení kosterního svalu u ICUAW pacientů je spojeno s dysfunkcí mitochondrií, evidentně sekundární, která zahrnuje změny v obsahu i složení svalových mitochondrií a vede k lepšímu využití mastných kyselin. Tyto nové poznatky a metodické inovace představují perspektivní základ pro další poznání a možné ovlivnění adaptivních mechanismů na úrovni biogeneze a degradace mitochondriálních struktur. Kvalitu dosažených výsledků dokumentuje jejich publikace ve 4 původních článcích v renomovaných časopisech s IF 3,14-4.476, kde je disertantka 2x prvním a 2x třetím autorem.

Předkládaná práce je čtivě napsána kvalitní angličtinou, je formálně dobře zpracovaná a obsahuje minimum faktických nepřesností. V práci byla použita řada moderních analytických metod a elegantně byly kombinovány různé experimentální modely. Jak přehledný úvod, tak zasvěcená a koncizní diskuse dokumentují velmi dobrou orientaci disertantky ve studované problematice.

### **Komentáře a otázky:**

- 1) Měření respirace s glycerol-3-fosfátem po inhibici CI a CII není měřítkem aktivity CIII, ale aktivity mitochondriální glycerofosfát dehydrogenázy – mGPDH. Ta sama v případě kosterního svalu není schopná CIII saturovat. Naopak dobře hodnotí aktivitu CIII fotometrické stanovení se substrátem decylubichinonem, a jeho množství WB s protilátkou proti Core proteinu.
- 2) Stanovení množství mitochondrií je obecně problematické a je vhodné využít více markerů, např. obsah mtDNA nebo porin (VDAC) vnější mitochondriální membrány.
- 3) SEAHORSE analýzy kultivovaných buněk je možné doplnit o měření na digitoninem-permeabilizovaných buňkách, kdy lze na identickém vzorku testovat i kapacity jednotlivých respiračních komplexů a další parametry obdobně jako u měření respirace v tkáňových

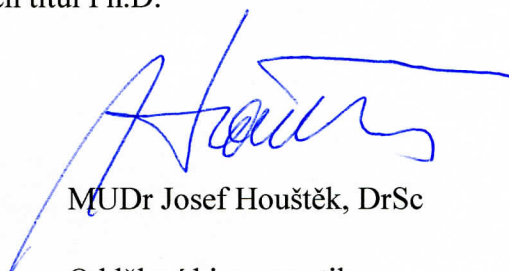
homogenátech.

4) Glutaminem-indukované rozpřažení otvírá řadu otázek. Co je podstatou a jak dlouho musí glutamin působit? Je rozpřažení reversibilní a je fakticky změněn membránový potenciál vnitřní mitochondriální membrány? Nabízí se měření pomocí TMRM, JC1 nebo TPP elektrodou. Je také změněna mitochondriální tvorba ROS a/nebo aktivita antioxidantních enzymů? Mění se exprese UCP2 a UCP3, nebo jejich buněčný obsah v myotubách?

**Závěr:**

Disertační práce jasně dokumentuje autorčiny velmi dobré teoretické znalosti, metodickou erudici a především, schopnost samostatně a originálně řešit zvolený problém. Protože práce dostatečně splňuje nároky kladené na doktorskou disertační práci, doporučuji, aby po řádné obhajobě byl MUDr Kateřině Jiroutkové udělen titul Ph.D.

V Praze, 6.10.2016



MUDr. Josef Houšťek, DrSc

Oddělení bioenergetiky  
Fyziologický ústav AV ČR  
Praha