



Univerzita Karlova v Praze, 1. Lékařská fakulta
Klinika dětského a dorostového lékařství
Laboratoř pro studium mitochondriálních poruch
Ke Karlovu 2, 128 08 Praha 2
Tel./ Fax: + 420 224 967 099

**Oponentský posudek na doktorskou disertační práci
Mgr. Elišky Švecové**

„ Působení biguanidů na metabolismus jater“

Předkládaná práce je zaměřena na pochopení mechanismů působení biguanidů – látek které mohou ovlivňovat celou řadu metabolických dějů včetně mitochondriálního energetického metabolismu. Předkládaná práce potvrdila inhibiční vliv biguanidů na mitochondriální respiraci a tvorbu ATP po podávání metforminu *in vivo*, prokázala, že biguanidy ovlivňují odolnost MPTP k Ca²⁺ iontům a prokázala, že jedním z mechanismů podmiňujících antioxidační účinky metforminu je snížená tvorba ROS v mitochondriích.

Téma předkládané práce je vysoce aktuální, protože se podílí na řešení otázek spojených s jedním z civilizačních problémů současnosti – otázkou dopadu léčby vysoce rozšířeného onemocnění diabetu.

Cílem předkládané disertační práce bylo rozšíření současných znalostí v oblasti studia mechanismů působení již zmíněných látek biguanidů, konkrétně metforminu a fenforminu na funkci izolovaných jaterních mitochondrií *in vitro* a na energetický metabolismus v játrech *in vivo*. Mezi dílčí cíle práce patřilo:

- Porovnat izolované jaterní mitochondrie a jaterní homogenát a optimalizovat tak model pro studium účinku metforminu *in vitro*
- Studovat vliv metforminu na aktivitu komplexů dýchacího řetězce *in vitro*
- Porovnat mechanismy působení testovaných biguanidů na modelu izolovaných jaterních mitochondrií
- Sledovat vliv metforminu na energetický metabolismus *in vivo* a porovnat s experimenty *in vitro*
- Pokusit se zhodnotit antioxidační účinek metforminu při ischemii/reperfuzi

Doktorandka uplatnila při řešení problematiky racionální přístup, prokázala, že ovládá široké spektrum experimentálních metod včetně práce s laboratorními zvířaty, biochemických purifikačních metod, řadu funkčních metod pro studium mitochondrií včetně měření respirace pomocí oxygrafu i pokročilé techniky Seahorse, stanovení aktivit komplexů dýchacího řetězce, stanovení membránového potenciálu pomocí fluorescenčních metod, či metodu analýzy bobtnání mitochondrií a také metodu magnetické resonance na laboratorních potkanech.

K posouzení předložila úctyhodnou sérii výsledků, z nichž za významné považuji zejména tyto:

- potvrzení, že metformin *in vitro* inhibuje specificky aktivitu komplexu I dýchacího řetězce
- detekci kompenzačního efektu zvýšeným přísunem elektronů přes komplex II
- zjištění, že metformin zvyšuje odolnost MPTP k působení vápníku
- rozpoznání, že fenformin inhibuje i komplex II a IV dýchacího řetězce
- průkaz protektivního účinku metforminu

Na základě výsledků shrnutých v předložené práci, ale i souboru předložených publikací mohu konstatovat, že cíle doktorské práce byly splněny. Celá práce svědčí o velké teoretické a metodické zdatnosti autorky a o její píli a afinitě k vědecké práci. Autorka svou prací prokázala způsobilost k tvůrčí vědecké činnosti, o čemž mimo jiné svědčí i spoluautorství na dalších 9 publikacích uvedených v autoreferátu. Chtěla bych vyzdvihnout mimořádný experimentální rozsah předkládané práce a tomu odpovídající množství hodnotných výsledků.

Po formální stránce předkládaná disertace představuje soubor 3 původních prací publikovaných v časopisech s IF, u jedné z nich je doktorandka první autorkou. Doktorská práce je psána v českém jazyce. Publikacím předchází velice čtivý komentovaný přehled, který nezabíhá do zbytečností a má obvyklou skladbu: Úvod a literární přehled, cíle, materiál a metody, výsledky, diskuze a závěr. Výsledky jsou rozčleněny do 3 kapitol podle publikace, ke které se diskutovaná data vztahují, přičemž v závěru každé ze 3 oddílů výsledků autorka uvádí vlastní podíl prací. Kapitoly jsou doplněny 26 obrázky a grafy a 4 tabulkami, které ilustrují jednotlivé výsledky. Práce cituje celkem 92 literárních zdrojů. Autoreferát je stručný a přehledný a splňuje svůj účel.

K předložené práci mám drobné formální připomínky a tyto dotazy:

- v seznamu zkratk ve vysvětlení již znova nepoužívat zkrácená slova
- slovo „matrix“ se neskloňuje matrix – matrixu, str.17
- ...hepatické, vhodněji by bylo hepatální, str. 20
- pro triacylglyceroly se obvykle používá zkratka TAG, použité označení Tg může být zavádějící, str. 21
- dinitrofenol 2,4- str. 24 na 2,4-dinitrofenol (v elektronické verzi již opraveno)
- název tabulky 1. by měl být nad tabulkou, str. 26

Bylo zjištěno, že po přidání metforminu přímo k mitochondriím dochází kromě ovlivnění aktivity komplexu I dýchacího řetězce i ke snížení aktivity citrát syntázy. Jaké máte pro tento efekt vysvětlení?

Mění se po působení metforminu nějakým způsobem množství komplexu I, jeho podjednotek či dalších komplexů OXPHOS ?

Zajímalo by mne, zda existují práce, které by na úrovni buněčných kultur studovaly dopad inhibice komplexu I díky metforminu na ultrastrukturu mitochondrií a mitochondriální sítě ?

Jaký je dopad působení metforminu na nervovou tkáň?

Autorka píše, že fenformin je přeměňován cytochromem P450 2D6. Jsou známy práce, které by studovaly schopnost této látky indukovat P450 ?

Můžete se podrobněji zmínit o metodice měření mitochondrií na Seahorse ?

Závěr: Po stránce aktuálnosti řešeného problému, metodického přístupu, množství získaných nových poznatků a jejich významu jde o vynikající doktorskou disertační práci. Autorka prokázala potřebné odborné vědomosti i schopnost samostatné vědecké práce. Na základě uvedených skutečností doporučuji, aby byla doktorská disertační práce přijata k obhajobě a

aby byla Mgr. Elišce Švecové udělena vědecká hodnost „ PhD“.

V Praze 27.9.2015

RNDr. Hana Hansíková, CSc

