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 – otázku 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 oxygráfu 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 praci prokázala způsobilost k tvůrčí vědecké činnosti, o čemž mimo jiné svědčí i spoluautorství na dalších 9 publikacích uvedených v autoreferátu. Chtěla bych vyzdvihnout mimorádný experimentální rozsah předkládané práce a tomu odpovídající množství hodnotných výsledků.

Po formální stránce předkládaná disertační práce 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 nezabírá do zbytečností a má obvyklou skladbu: Úvod a literární přehled, cíle, materiál a metody, výsledky, diskuse a závěr. Výsledky jsou rozčleněny do 3 kapitol podle publikace, ke které se diskutovaná data vztahují, přičemž v závěru každéze 3 oddílů výsledků autorka uvádí vlastní podíl prací. Kapitoly jsou doplněny 26 obrázků 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 zkratky ve vysvětlení již znova nepoužívám zkrácená slova
- slovo „matrix“ se neskošluje matrix – matrixu, str17
- ...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 citrátsyntázy. 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 ultrastruktuру mitochondrií a mitochondriální sítě?
Jaký je dopad působení metforminu na nervovou tkáň?

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

Můžete se podrobněji zmínit o metodice měření mitochondrií na Seahorse?


V Praze 27.9.2015

RNDr. Hana Hansíková, CSc