

Hodnocení diplomové práce V. HAVLÍČKOVÉ

„Studium mitochondriálního metabolismu v jaterní tkáni v prenatálním období“.

Úvodem k hodnocení této práce bych rád uvedl, že představuje sondu do velmi obtížné oblasti biomedicínského výzkumu. Cílem práce je posoudit do jaké míry lze poznatky získané na laboratorních zvířatech aplikovat na lidské tkáně, rozšířit znalosti o prenatálním vývoji energetického metabolismu v hepatocytech a vypracovat soubor biochemických a molekulárně biologických a genetických metod využitelných pro prenatální diagnostiku vrozených poruch energetického metabolismu. Na tento typ prací nelze aplikovat stejná kritéria obvyklá u studií na laboratorních zvířatech, protože práce s tkáněmi získanými z lidských orgánů, převážně patologických je velmi limitovaná jeho dostupností a kvantitou, nutností pracovat se zamrazeným materiálem a deficitem kontrolních hodnot, které navíc vykazují vysokou variabilitu. Přes všechna tato omezení je třeba takováto měření provádět a počítat s tím, že na množství vykonané práce bude možno získat spíše omezené množství statisticky hodnotitelných rozdílů.

Cílem předkládané práce bylo hodnocení prenatálního vývoje mitochondriálního metabolismu hepatocytů u člověka. Protože biologický materiál lze získat z interrupcí byla snaha také hodnotit do jaké míry by se na patologickém stavu mohly podílet i defekty v biogeneze a aktivitě mitochondriálních enzymů.

Předkládaná práce vychází z poznatků získaných na laboratorních zvířatech, které prokázaly postupnou maturaci enzymového vybavení mitochondrií v průběhu embryonálního vývoje a transformaci anaerobního typu hepatocytu v aerobní. Základní složení enzymů aerobní tvorby ATP je přítomno již od počátku embryogeneze. V průběhu gestace pak

dochází v jednotlivých tkáních a v různých buněčných populacích ke specifickému vývoji struktury a funkce mitochondrií a k nárůstu jejich kvanta.

Specifické cíle práce jsou uvedeny na str. 28. Jsou formulovány spíše metodicky: ve vzorcích jaterní tkáně od potracených plodů izolovat mitochondrie, stanovit aktivity různých enzymů, provést proteinovou analýzu, stanovit množství mtDNA a analyzovat úroveň hematopoéze.

Z tohoto hlediska bylo pět stanovených cílů splněno vynikajícím způsobem, protože práce předkládá široký komplexní soubor metodik od morfologických a histochemických přes biochemické až k molekulárně biologickým a molekulárně genetickým upraveným pro potřeby klinické diagnostiky. Všechny tyto metody byly použity pro hodnocení souboru 20 zmražených vzorků získaných z jaterní tkáně lidských plodů v gestačním stáří 12-28 týdnů a skladovaných při -80°C .

Diplomová práce tak představuje soubor základních údajů o morfologii, kvantu a enzymové aktivitě řady mitochondriálních enzymů a o množství mtDNA v jaterní tkáni plodu v různých obdobích gestace. Tyto nálezy budou cenným přínosem pro hodnocení vývojových poruch.

Druhým aspektem práce bylo hodnocení prenatálního vývoje mitochondriálních enzymových aktivit a biogeneze mitochondrií. Autorka volila dvojí způsob hodnocení. Jednak srovnávala všechny naměřené hodnoty prenatální s hodnotami postnatálními, jednak se pokoušela hodnotit vývoj jednotlivých parametrů v průběhu gestace na základě vytvořeného souboru podskupin podle doby gestace.

Jak je uvedeno v závěrech, v mitochondriální frakci byly analyzovány aktivity komplexů respiračního řetězce I, II, III, I+III, II+III a IV a CS a PHD. Při srovnání fetálních a postnatálních hodnot byly signifikantní rozdíly aktivit u komplexu I a II. Množství proteinu

hodnocené imunochemicky ^{v sáh} rozdíly neprokázalo. Hodnocení mtDNA ^{v jaterní tkáni} prokázalo vzestup kvanta mtDNA v průběhu gestace.

K předkládané práci bych měl tyto připomínky:

1. V úvodu by bylo třeba upřesnit některá tvrzení jako na str. 6 „vnitřní mitochondriální membrána je volně propustná jen pro O_2 a CO_2 “, na str.9 „NADH vznikající v matrix při glykolýze..“
2. V cílech práce by asi bylo vhodné uvést ještě šestý bod a to, že na základě naměřených údajů bude hodnocen vývoj mitochondrií v průběhu gestace.
3. V metodické části by asi bylo vhodné věnovat více pozornosti izolaci mitochondrií, protože izolace mitochondrií ze zmrazené tkáně není zcela standardním postupem. Bylo by třeba se odvolat na případné citace a minimálně komentovat čím se liší izolace z čerstvé a zmrazené tkáně a asi by bylo vhodné mít údaje o obsahu membránového mitochondriálního enzymu v 600g sedimentu, mitochondriální frakci a supernatantu.
4. Pokud jde o popis výsledků, nedoporučoval bych používat spojení „nesignifikantní pokles“ (str.56).
5. Po zmrazení lze předpokládat, že dochází k fragmentaci mitochondriální membrány a tím i k vyplavení CS lokalizované v matrix. Tomu nasvědčují i údaje v tab. 4.2. Hodnoty CS v mitochondriích mají podstatně vyšší rozptyl než hodnoty v homogenátu.
6. V diskusi (odběr materiálu) by bylo vhodné hodnotit nejen vliv skladování na CS, ale i na aktivitu některého enzymu respiračního řetězce a také nejen závislost na době skladování, ale i hodnoty před a po zmrazení.

Závěrem mohu konstatovat, že předkládaná práce předkládá na unikátním souboru vzorků fetálních jater široké spektrum metod umožňujících hodnocení aktivity i kvanta mitochondriálních enzymů. Navíc přináší nové údaje o vývoji aktivit některých mitochondriálních enzymů a o biogeneze mitochondrií v průběhu ^{3^{as}} ~~text~~ace. V úvodu pak autorka podává přehled poznatků o struktuře a funkci a biogeneze mitochondrií a stručně shrnuje poznatky o fetálním vývoji získané na experimentálních zvířatech. Diskuze pak komentuje jednotlivé dílčí nálezy. Práce je psaná přehledně a je dokumentovaná řadou tabulek a grafů.

Předkládaná práce splňuje požadavky kladené na magisterskou disertaci.

Doporučuji proto její přijetí.

RNDr Z. Drahota DrSc
Fyziologický ústav AV ČR
V Praze 14. května 2007.