

Oponentský posudek magisterské diplomové práce: Bc. Aleš Mikulka: Mechanismus účinku katecholaminů v termogenezi izolovaných lidských leukocytů.

Předložená práce v rozsahu 55 stran je logicky rozčleněna podle předpokládaných požadavků Biologické fakulty (úvod 1 str., literární přehled 9 str., cíl práce 1 str., materiál a metody 8 str., výsledky 13 str., diskuse 5 str., závěr 1 str., literatura 6 str., seznam používaných zkratk 1 str. a příloha s podrobnějšími informacemi o používaných látkách 10 stran).

Cílem práce bylo na základě vlastních pokusů zjistit, jaký typ adrenergických receptorů izolovaných lidských leukocytů stimuluje jejich metabolismus (autor to popisuje jako hormonální termogenezi), který je měřen na základě spotřeby kyslíku, a také objasnit zda exogenní substráty mohou tento děj ovlivnit.

Literární přehled kvalitně popisuje základní principy termogeneze a její možné řízení, s výrazným zaměřením na účinky katecholaminů, které představují jedny z nejvýznamnějších regulačních látek v tomto procesu.

Metodika využívala vhodné experimentální metody na izolaci lidských leukocytů a měření jejich metabolismu ovlivňovaném specifickými agonisty nebo antagonisty přes různé typy adrenergických receptorů, aby se dalo posoudit, které typy adrenergických receptorů se na stimulaci zvýšené spotřeby kyslíku podílejí a odhadnout, jak se zde mohou uplatnit i substráty přidané do kultivačních médií.

Výsledky jsou přehledně a srozumitelně popsány a uvedené grafy znázorňují změřená data a jejich statistické posouzení. Autor využil řadu důležitých farmak pro otestování jejich vlivu na adrenergní receptory různých typů ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$) a zahrnul i část výsledků ze své bakalářské práce, které souvisejí s touto problematikou.

V diskusi, kde se snažil vhodně porovnávat vlastní výsledky s údaji zveřejněnými jinými badateli, kvalitní popis prokazuje autorův zájem o tuto problematiku a dobrou znalost literárních dat.

Závěr nakonec přehledně stručně shrnuje výsledky diplomové práce se zdůrazněním, že v lidských leukocytech se na metabolické stimulaci nejvíce podílejí $\beta 1$, $\alpha 2$ a $\beta 2$ adrenergní receptory, kdežto $\alpha 1$ a $\beta 3$ se na stimulované zvýšené spotřebě kyslíku v leukocytech neuplatňují. Rovněž vnější substráty nemají pravděpodobně nezbytnou úlohu v tomto procesu.

Práce je pěkně a přehledně sepsána a doporučuji její přijetí jako úspěšné magisterské diplomové práce.

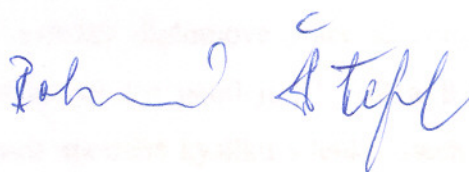
Připomínky a dotazy:

1. Pojem hormonální termogeneze není zcela běžný a je otázkou, zda při uplatňování v popisu měřených veličin u izolovaných leukocytů je nebo není vhodný. Měřená velikost spotřeby kyslíku leukocytů může souviset se zvyšováním jejich metabolismu z jiného důvodu než uvolňování energie ve formě tepla. Procesy odpráhování oxidační fosforylace v mitochondriích od syntézy ATP také nejsou v tomto experimentálním uspořádání měřené a pro eventuelní publikaci těchto výsledků by bylo vhodnější používat reálný pojem spotřeby kyslíku (nebo metabolismus) leukocytů místo hormonální termoregulace.

2. Při posuzování naměřených hodnot jsou vidět značné rozdíly v klidové úrovni metabolismu leukocytů při testování vlivu různých agonistů, antagonistů a substrátů (např. na Obr.5.3.2. je klidová spotřeba kyslíku $0,723 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 10^{-6}$ buněk a na Obr.5.2.5 je klidová spotřeba kyslíku $0,195 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 10^{-6}$ buněk, která se po stimulaci noradrenalinem zvýšila na $0,651 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 10^{-6}$ buněk – a to je stále méně než klidová spotřeba na Obr. 5.3.2.). Co když už třeba vysoká klidová úroveň spotřeby kyslíku může negativně ovlivnit agonistickou nebo substrátovou stimulaci metabolických procesů? Tato záležitost také může souviset s případným rozdílem vlastností leukocytů pocházejících z jiných lidí (třeba se liší podle pohlaví, zdravotního stavu nebo nějakého jiného fyziologického rozdílu).

3. V seznamu literatury se trochu nepovedlo abecední uspořádání prací, ale není to tak zlé.

4. Chci se dotázat, jak se spočetl relativní procentuální podíl uplatnění adrenergních receptorů na stimulaci metabolických změn noradrenalinem a proč popisovaný součet zdaleka nedosahuje 100% (pouze $25+8+12$, tedy 45 procent)?



Doc. RNDr. Bohumír Štefl, CSc.
Katedra fyziologie živočichů a vývojové biologie
Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Praha

Posudek magisterské diplomové práce

Diplomant:
Aleš Mikulka

Název práce:
Mechanismus účinku katecholaminů v termogenezi izolovaných lidských adipocytů

Cílem práce je charakterizovat specifitu adrenergních receptorů, které se zúčastňují regulace spotřeby kyslíku v leukocytech z lidské periferní krve. Práce tak vychází z originálních výsledků školitele o indukovatelnosti spotřeby kyslíku-termogeneze v leukocytech noradrenalinem. Práce předpokládá, že adrenergně aktivovaná termogeneze v leukocytech z periferní krve by mohla být využita jako model pro studium regulace netřesové termogeneze u člověka. Z tohoto pohledu se jedná o velice originální projekt, jehož význam je však třeba dále zkoumat a prokázat. Diplomová práce tomuto záměru významným způsobem napomohla.

Práce je členěna obvyklým způsobem a po formální stránce je velmi dobrá. Z hlediska obsahu je možné ocenit kvalitu teoretického úvodu, který zdůrazňuje často opomíjený význam adrenergní termogeneze u člověka, upozorňuje na vážný nedostatek znalostí o mechanismech, který souvisí s metodickými problémy výzkumu adrenergní termogeneze u lidí a potřeby nových modelů. V této části se tak odráží bohaté zkušenosti a znalosti školitele. Také popis metodik je adekvátní a dostatečně propracovaný. Výsledkem práce je detailní charakterizace typů adrenergních receptorů, které ovlivňují spotřebu kyslíku v leukocytech a také průkaz vlivu endogenního cysteinu na respiraci.

Část výsledková a diskuze práce vybízejí k několika dotazům a polemice:

1. Jak by bylo možné vysvětlit negativní vliv Cirazolinu na spotřebu kyslíku v buněčném homogenátu (strana 21)?
2. Endogenní spotřeba kyslíku v buňkách za kontrolního výchozího stavu se mezi pokusy značně liší – není to známkou poškození buněk při izolaci?
3. V případě Clonidinu (strana 22) jsou pro ovlivnění spotřeby kyslíku používány poměrně vysoké koncentrace této látky. Z čeho tyto koncentrace vycházejí?
4. Autoři předpokládají vstup endogenního cysteinu do buněk (strana 36). Jaké jsou pro to důkazy? Není možné vysvětlit stimulační vliv cysteinu např. allosterickým vlivem na adrenergní receptory na povrchu buněk?
5. Autoři navrhují mechanismus aktivace UCP vlivem acetyl-CoA, který by vznikl v buňce během katabolizmu cysteinu a „vázal purinový nukleotid“ a předpokládají modulaci biochemické aktivity UCP v leukocytech oním nukleotidem. Tento mechanismus je však velmi nepravděpodobný, neboť pouze UCP1 (ale ne např. UCP2, který by mohl existovat v leukocytech) je regulován purinovými nukleotidy.

Práci pokládám za velmi dobrou a doporučuji k obhajobě.

V Praze, dne 24.5.2007

MUDr Jan Kopecký, DrSc