

Oponent: MUDr. Otto Kučera, Ph.D.

Oponentský posudek na diplomovou práci: „*Studium energetického metabolismu hepatocytů poškozených thioacetamidem v podmínkách in vitro*“ autorky Bc. Lenky Haňáčkové. Vedoucími diplomové práce byli RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D. a Mgr. Pavla Staňková, Ph.D.

Cílem předložené diplomové práce bylo studium metabolismu hepatocytů potkana poškozených thioacetamidem v primárních kulturách a popsat účinek thioacetamidu na hepatocyty *in vitro* a na izolované mitochondrie pomocí měření aktivity laktátdehydrogenázy v kultivačním médiu, produkce malondialdehydu a urey, WST-1 testu, vysokoúčinné respirometrie a měření mitochondriálního membránového potenciálu. Posledně jmenovanou metodu měla autorka diplomové práce optimalizovat pro podmínky laboratoře.

Diplomová práce má rozsah 91 stran, je vhodně doplněna 27 obrázky a grafy a 2 tabulkami. Je dokladována 121 citacemi publikovanými v zahraničních i českých odborných časopisech. Práce je klasicky členěna, v literárním přehledu autorka na 25 stranách předkládá souhrnné informace o morfologii a fyziologii jater, o mechanismu toxického poškození jater s důrazem na úlohu mitochondrií a o modelovém hepatotoxinu thioacetamidem. Metodická část je přehledně zpracovaná a dokazuje, že autorka je schopna samostatně provádět izolaci jaterních mitochondrií a měření nejen biochemických parametrů, ale i stanovení mitochondriálního membránového potenciálu pomocí methylesteru tetramethylrhodaminu, reaktivních forem kyslíku (ROS) pomocí sondy 5-(6) chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluoresceindiacetátu (CM-H2DCFDA) a spotřeby kyslíku permeabilizovanými hepatocyty a izolovanými mitochondriemi pomocí vysokoúčinné respirometrie. Výsledková část je uvedena na 10 stranách a dobře dokumentuje získaná data. Diskuse je koncisní a závěr práce přehledně shrnuje dosažené výsledky. Práce je po odborné stránce velice kvalitní, bohužel obsahuje řadu překlepů (hydroxylový radikál označen jako „OH-“, místo „OH“, „nekaptóza“ místo „nekroptóza“, „prednizol“ místo „prednizolon“), nejednotnosti v názvosloví („o-phthalaldehyd“ vs „o-ftalaldehyd“, „glutation“ vs „glutathion“), gramatických chyb (např. opakovaná záměna slovesa „vést“ za sloveso „vézt“, chyba ve slově „sukcinil“ (na str. 55) a mnoho interpunkčních chyb v celém textu). V seznamu použité literatury chybí 2 citace (Fitzhugh a Nelson (1948), Seglen (1976)).

K práci mám následující připomínky a dotazy:

1. Ke zkratkám mám pouze formální připomínky. GS• není thiylový radikál, jak autorka uvádí, ale jde o glutathiylový radikál. Podobně H⁺ není vodíkový proton, ale jde buď o proton, nebo o vodíkový kation. Ve vysvětlivce zkratky „HCV“ chybí, že jde o virus hepatitidy „C“. Ve zkratkách rovněž chybí vysvětlení některých běžných zkratk „TNF“, „HDL“, „LDL“, „VLDL“ a „GIT“, které jsou v textu používány.

2. Na straně 18 je uvedeno, že „Endotelové buňky ... jsou schopny endocytovat částice do velikosti 0,1 μm“. Správně je samozřejmě do 0,1 μm.
3. Na straně 34 píšete: „Pro aktivaci tohoto transportu (*myšleno RaM transport Ca²⁺ do mitochondrií*) je nutná koncentrace cytoplazmatického Ca²⁺ 200-300 nmol/l.“ O větu dále však píšete: „Naopak u RaM je typické, že reaguje na malé, ale rychlé změny koncentrace Ca²⁺. RaM je aktivován cytoplazmatickou hladinou Ca²⁺ < 100 nmol/l ...“. Mohla byste tento rozpor vysvětlit?
4. V kapitole 2.7 „Klinické projevy jaterního poškození“ na str. 26 – 28 popisujete virovou hepatitidu, cirhózu, steatózu, cholestázu a nádory jater. Z mého pohledu lékaře je nutné upřesnit, že klinickými projevy jaterního poškození se obvykle myslí žloutenka, tmavá moč, acholická stolice, pruritus apod.
5. V textu pod obr. 19 na str. 66 chybí vysvětlivka pro „***“. Dále je rozpor mezi texty uvádějící p<0,001 v kapitolách “4.3 WST-1 test” (str. 66), “4.4 Produkce ury hepatocyty” (str. 67) a “4.5 Stanovení koncentrace malondialdehydu” (str. 68) a příslušnými grafy, kde udáváte p<0,0001 (obr. 20, 21 a 22 na str. 67 a 68). Mohla byste to vysvětlit?
6. V grafu „Stanovení aktivity LDH“ (obr. 19 na str. 66) jsou uvedeny hodnoty aktivit LDH v médiu od cca 0,5 do 1,5 IU/l. V našich pokusech jsou však obvyklé aktivity LDH v kultivačním médiu v řádu stovek IU/l, mohla byste vysvětlit důvod Vámi naměřených nízkých aktivit?
7. Na str. 75 píšete, že „Glutathion je významný *protein*, ...“. Mohla byste své tvrzení okomentovat?
8. Na str. 76 uvádíte: „Tento úbytek intracelulárního GSSG může být částečně způsoben ... jeho vazbou na proteiny.“ Mohla byste blíže vysvětlit tento mechanismus?
9. V práci uvádíte, že kontrolní hepatocyty obsahovaly 88 % z celkového glutathionu ve formě GSH (str. 68). Jaký byl poměr GSH ku celkovému glutathionu v hepatocytech poškozených thioacetamidem?

Přes uvedené připomínky konstatuji, že diplomová práce Bc. Lenky Haňáčkové je velmi zdařilá a splňuje cíle uvedené v zadání, a proto ji jednoznačně doporučuji k obhajobě a z důvodu poměrně častých překlepů a formálních chyb ji hodnotím:

Výborně-M



MUDr. Otto Kučera, Ph.D.

V Hradci Králové 20. 5. 2010