Lékařská fakulta
Univerzity Palackého
v Olomouci

Ústav farmakologie

prof. MUDr. Rostislav Večeřa, Ph.D.
tel.: 585 632 553
e-mail: vecera@seznam.cz

Oponentský posudek dizertační práce Mgr. Eriky Roušarové:

„Využití moderních analytických metod při studiu enzymové toxicity látek"

Hodnocená dizertační práce je poměrně rozsáhlá (164 stran) a již tradičně rozdělena do dvou částí. První je tvořena poměrně podrobným teoretickým úvodem do studované problematiky. Zde autorka podává nejen teoretický pohled na řešenou problematiku, ale poukazuje i na zásadní význam získávání nových vědeckých informací v oblasti metabolických dějů spojených především s paracetamolem, který je v naší populaci velice často užívaným analgetikem-antipyretikem. Druhá část dizertační práce je tvořena popisem prováděných experimentů, výsledky a diskuzí, za kterou následují tři impaktované publikace *in extenso*. V jednom případě je dizertantka hlavním autorem a ve dvou spoluautorem těchto prací. Celá dizertační práce je velice pečlivě zpracována včetně pěkných barevných schémat a obrázků. Po formální stránce nelze práci nic závažnějšího vytknout.

Jak jsem již předeslal, dizertantka v předložené práci popisuje řadu cenných a zajímavých výsledků. Mezi patrně nejvýznamnější patří zjištění, že konjugát glutathionu a paracetamolu, který je v literatuře většinou obecně považován za detoxikační produkt metabolismu tohoto léčiva, může být schopen indukovat produkci ROS (reactive oxygen species). Dále také může snižovat aktivitu klíčového enzymu recyklace glutathionu jakým je glutathionreduktáza. Vzhledem k tomu, že paracetamol je v populaci považován mylně

za zcela bezpečné léčivo (i díky tomu, že je volně prodejný), patří toxické poškození jater metabolity tohoto analgetika-antipyretika k nejčastějším důvodům transplantace uvedeného orgánu. Získané výsledky a závěry jsou proto velice cenné a potřebné.

Na závěr mého posudku bych chtěl konstatovat, že předložená dizertační práce zcela naplňuje požadavky na ní kladené. Ve zvoleném oboru je uchazečka velice dobře orientována a je také schopna používat celou řadu experimentálních metod a technik. Získané originální výsledky je pak schopna publikovat v prestižních periodicích s impaktním faktorem.

K práci mám následující otázky:

1. V teoretickém úvodu na straně 58 uvádíte, že po předávkování paracetamolem (>140 mg/kg) může dojít k poškození hepatocytů. Z jakého zdroje jste čerpala? Jaká je denní a jednotlivá maximální dávka paracetamolu v našem lékopisu?
2. V práci uvádíte, že paracetamol může poškodit játra nebo ledviny. Který další orgán může být užíváním tohoto léčiva poškozen?

K práci mám následující drobné připomínky:

- bylo by dobré v dizertační práci kromě impaktovaných publikací uvést i seznam všech prací autorky
- název acetaminofen je používán v literatuře amerických či kanadských autorů. Evropa preferuje název paracetamol, což je i uznávaný generický název tohoto léčiva.

Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc
tel.: +420 585 632 552
e-mail: farmakologie@upol.cz
web: farmakologie.upol.cz

Lékařská fakulta
Univerzity Palackého
v Olomouci

Ústav farmakologie

Předloženou dizertační práci rád doporučuji k obhajobě a na základě úspěšné obhajoby, doporučuji udělení akademického titulu doktor ve zkratce Ph.D. dle § 47 Zákona o vysokých školách č. 111/98 Sb.

V Olomouci 24. září 2015

prof. MUDr. Rostislav Večeřa, Ph.D.

Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc
tel.: +420 585 632 552
e-mail: farmakologie@upol.cz
web: farmakologie.upol.cz

Posudek doktorské disertační práce Mgr. Eriky Roušarové

Název práce: Využití moderních analytických metod při studiu enzymové toxicity látek

Oponent: doc. RNDr. Petr Fryčák, Ph.D.

Mgr. Erika Roušarová se ve své práci zabývá mechanismy toxického působení acetaminofenu (paracetamolu) jako velmi široce užívaného a volně dostupného analgetika a antipyretika. Nosnou linií práce je snaha o ověření kontroverzních poznatků týkajících se možného toxického působení aduktu acetaminofenu s glutathionem, který byl až do nedávna považován za netoxický metabolit.

Disertační práce má rozsah 128 stran, cituje celkem 150 literárních zdrojů a je vybavena přiměřeným množstvím ilustrací, schémat a tabulek. Práce je doplněna přílohami, v nichž se nacházejí podrobnější experimentální data a přetisky tří souvisejících časopiseckých sdělení se spoluautorstvím doktorandky. Práce je sepsána pečlivě, na dobré jazykové i grafické úrovni a působí uceleným dojmem. Členění práce je klasické, tj. na úvod, teoretickou část, experimentální část, výsledky, diskuzi a závěr. Obsažnost práce jako celku pokládám za vyhovující, nicméně kapitoly úvod a závěr jsou poměrně minimalistické a zasloužily by více rozvinout.

Teoretická část pojednává o biochemických pochodech souvisejících se syntézou a funkcí glutathionu jako látky zapojené v udržování stabilního redoxního prostředí buňky a v druhé fázi metabolismu xenobiotik. Zvláštní kapitoly jsou věnovány glutathionreduktáze, metodám její purifikace a inhibitorům tohoto enzymu, jehož inhibice je dále v práci rozsáhle studována. Následuje kapitola s popisem struktury a funkce mitochondrií, vysvětlením mechanismu dýchacího řetězce a oxidativní fosforylace a s tím související tvorbou reaktivních forem kyslíku. Poslední kapitola teoretické části je věnována metabolismu acetaminofenu a mechanismům jeho terapeutických a toxických účinků.

Ocenit je třeba jasné formulování ambiciózních cílů, které jsou následně systematicky dosahovány. Experimentální a výsledková část popisuje přípravu konjugátů acetaminofenu s glutathionem, purifikaci glutathionreduktázy z lidských erytrocytů a studium její inhibice jak acetaminofenem a glutathionem, tak i připravenými konjugáty. Dále je popsáno studium tvorby reaktivních forem kyslíku v mitochondriích za přítomnosti těchto látek. Výsledky jsou v následující části podrobně diskutovány.

K práci mám následující připomínky vesměs formálního charakteru:

- Název práce je vzhledem k jejímu obsahu velmi vágní. Na počátku doktorského studia zřejmě sloužil jako téma práce, ale zde měl být konkretizován, zcela jistě mělo např. v názvu figurovat slovo acetaminofen.

- Některá schémata jsou schematická až příliš (např. obr. 4: R-OH může z R-H vznikat pouze oxidací, ne redukcí nebo hydrolýzou), není v nich konzistentně používána čeština pro popis jednotlivých detailů (obr. 3).
- Tabulky I a II jsou zbytečné, informace mohly být uvedeny přímo v textu; naopak tabulkami mohly být podpořeny pro čtenáře nepříliš přehledné kapitoly 4.7.3.1 – 4.7.3.4.
- Kapitoly 4.6.1 a 4.6.2 by bylo možné snadno spojit do jediné.
- Na str. 59 by místo obchodního názvu acylpyrin bylo lepší užít chemického názvu sloučeniny (acetylsalicylová kys.).
- Na obr. 30 – 32 jsou uvedena hmotnostní spektra konjugátů. Všechny obrázky jsou v legendě označeny jako tandemová hmotností spektra, nicméně pouze na obr. 31 je MS/MS spektrum. Zbývající dvě spektra jsou MS.
- V textu jsou občasné chyby z nepozornosti (str. 31 – mezi dvěma oxidačními stavy FAD; str. 60 – 4-hydroxy-p-aminofenol a 3-hydroxy-p-aminofenol; str. 89 – několik krystalků dithioničitan sodný; str. 116 – pomocí Lineweaver-Burkovo transformace), stylisticky neobratné formulace (str. 60 – fenacetin způsobuje nefrotoxicitu) a obsolentní a nespisovné termíny (extinkční koeficient, vyprecipitovaný, zainhibovat). Množství těchto chyb je ale malé.

Prosím autorku práce, aby se v rámci obhajoby vyjádřila k níže uvedeným otázkám a komentářům:

1) Na str. 76 je uvedeno, že čistota připravených konjugátů byla nejméně 98%, ovšem z obr. 26 je patrné, že zejména minoritní konjugát $(APAP)_2$-SG není v chromatogramu dobře rozlišen od ostatních píků. Byla tato látka dále přečišťována? Je možné deklarovanou čistotu doložit podobným chromatogramem jako na obr 33?
2) Jak byla prováděna optimalizace purifikace glutathionreduktázy (kapitola 4.5.3)? Jak se výsledný postup lišil od citovaných prací?
3) Nepokládám za příliš šťastné počítat statistické ukazatele z pouhých dvou opakování (str. 89, graf 8 na str. 98, tab. VI na str. 106).
4) Proč byly při statistickém zpracování voleny různé hodnoty hladiny významnosti (str. 89, dále grafy 3, 4, 7, 8)?
5) Při předávkování acetaminofenem existuje předpoklad deplece hladiny glutathionu v hepatocytech tvorbou aduktu APAP-SG. Je vůbec v takové situaci aktivita příp. míra inhibice glutathionreduktázy relevantním parametrem? Z důvodu vysokého poměru GSH/GSSG za normálních podmínek je zřejmé, že buněčná zásoba oxidovaného glutathionu je nízká a nemůže být zdrojem podstatného množství GSH.
6) Je-li inhibiční konstanta GSH (1,3 resp. 0,8 mmol/l, viz str. 116 a 117) nižší než inhibiční konstanta konjugátu APAP-SG (4,8 resp. 5,4 mmol/l), aktivita glutathionreduktázy by měla být po předávkování acetaminofenem znatelně vyšší než za normálních podmínek. Tomu nicméně příliš nenasvědčuje srovnání dat v tabulkách Přílohy 1 a 3, resp. 2 a 4.
7) Je možné důvod toxicity acetaminofenu hledat i v obecném nárůstu oxidačně-redukčního potenciálu v buňce při odčerpání redukované formy glutathionu (Nernstova rovnice), což musí mít nutně vliv na jiné redoxní systémy přítomné v buňce?

Závěrem konstatuji, že výše uvedené připomínky nesnižují vědeckou úroveň práce, kterou pokládám za zdařilou a přínosnou z hlediska objasňování mechanismů toxicity acetaminofenu. To dokládá i publikace výsledků výzkumu doktorandky v kvalitních mezinárodních odborných periodicích a na mezinárodních konferencích. **Práci doporučuji k obhajobě.**

V Olomouci 15. října 2015

doc. RNDr. Petr Fryčák, Ph.D.
Katedra analytické chemie
Přírodovědecká fakulta
Univerzita Palackého v Olomouci

OPONENTSKÝ POSUDEK

Doktorská disertační práce, autor: Mgr. Erika Roušarová, 2015

Předkládaná doktorská disertační práce „**Využití moderních analytických metod při studiu enzymové toxicity látek**" má celkem 147 stran vč. příloh a seznam literatury obsahuje 150 správně citovaných referencí. Součástí práce jsou také 3 publikace v impaktovaných časopisech, na jedné z nichž je Mgr. Roušarová první autorkou. Práce sleduje klasické členění, přičemž podrobný úvod poskytuje čtenáři přiměřený vhled do řešené problematiky. Velmi podrobně a pečlivě je zpracována experimentální část. Následuje vlastní výsledková část (24 stran) a diskuse (14 stran). Veškeré části jsou napsány čtivou a srozumitelnou formou bez závažnějších chyb.

Cíle práce jsou jasně formulovány a týkají se aktuální a zajímavé problematiky toxicity acetaminofenu, který patří v současné době mezi nejčastěji používaná analgetika a antipyretika. Mechanismus patologického účinku acetaminofenu vedoucí až k akutnímu selhání jater nebo ledvin není dosud objasněn. Autorka se zaměřila na ověření hypotézy, že toxický efekt způsobuje konjugát APAP-SG, vzniklý oxidací acetaminofenu a následnou reakcí s glutathionem. Toto se podařilo prokázat pomocí metodicky rozmanitých experimentů, které zahrnovaly přípravu a purifikaci konjugátu, izolaci glutathionreduktázy pomocí bioafinitní chromatografie, a stanovení řady enzymatických a bioenergetických parametrů.

K práci mám jen několik drobných připomínek:

str. 41, legenda obr. 10, není uveden fluorofor, kterým jsou nabarveny mitochondrie (zelená); pomocí DAPI se značí jádra (modrá)

str. 47, 48, vodíkové ionty, správně protony

str. 66, ferrikyanid draselný, správně hexakyanidoželezitan

str. 72, hmotnostní spektrofotometr LCQ ion trap, správně hmotnostní spektrometr

str. 79, 81, molární extinkční koeficient, správně molární absorpční koeficient

str. 88, v podmínkách měření fluorescence uvádět i šířku štěrbin (Ex i Em)

Autorky bych se rád zeptal na následující:

1) Konjugát APAP-SG indukuje produkci ROS s i bez respiračních substrátů. Není možné, že se chová jako tzv. „redox cycler"?

2) Byl studován vliv APAP-SG na redox stav cytochromu *c*. Nemáte údaje i o vlivu na další mitochondriální mobilní přenašeč elektronů – koenzym Q? Zajímavý by též byl vliv na enzymové aktivity komplexů respiračního řetězce.

Závěrem je mi potěšením konstatovat, že Mgr. Erika Roušarová významně přispěla k řešení závažné problematiky toxicity acetaminofenu a prokázala, že je schopná o své práci úspěšně referovat. Předkládanou práci **doporučuji** postoupit k obhajobě za účelem udělení titulu Ph.D. za jménem.

V Praze, dne 18.10.2015

RNDr. Marek Vrbacký, Ph.D.

Fyziologický ústav AV ČR, v. v. i.
Vídeňská 1083
142 20 Praha 4