



Charles University in Prague

First Faculty of Medicine

Institut of Pharmacology

Prof. H. Farghali, Ph.D., D.Sc.



Albertov 4
128 00 Prague 2, Czech Republic

Phone / Fax : +420 224968106
E-mail : hfarg@lf1.cuni.cz

**Oponentský posudek doktorské disertační práce: Mgr. Tomáš Roušar
„Studium změn antioxidační rovnováhy v hepatocytech po působení
xenobiotiky in vitro“**

Předložená disertační práce Mgr. Tomáše Roušara je v rozsahu 115 stran, obsahuje 8 kapitol. Hlavním cílem této disertační práce bylo přispět k zavedení a optimalizaci metody ke stanovení glutathionu, která je lepší ve srovnání se současně zavedenými metodami. Kromě toho autor přehodnotil toxicitu po acetaminofenu v kultuře hepatocytů s využitím vyvinuté metody pro stanovení glutathionu. Hepatotoxicity po acetaminofenu je velmi důležitá z hlediska předávkování a léčby v klinické toxikologii. Teoretická část obsahuje shrnutí nejnovějšího literárního přehledu o daném studijním tématu. Pak následují hlavní cíle této disertační práce, různé experimentální metody, výsledky a nakonec je uvedena část diskusní a závěrečná, následovaná 106 citacemi. Chtěl bych zdůraznit, že vlastní výsledky disertace byly publikovány ve formě 6 původních prací v odborných vědeckých časopisech, a ve 3 přehledných člancích, z nichž u dvou je uveden Mgr. Tomáš Roušar jako první autor. Takže celková jeho publikační činnost představuje 9 publikací, dotakem jsou ještě mnohé prezentace ve formě abstraktů.

Téma disertace je nanejvýš aktuální, uvážíme-li, že změna antioxidační rovnováhy v buňkách po působení xenobiotika je velmi důležitou oblastí. Například větší nebo dokonce nižší dávky acetaminofenu mohou vyvolat hepatotoxicitu a renální toxicitu. Užití-spolykání 15 g acetaminofenu může být fatální a smrt je zapříčiněna vážnou hepatotoxicitou s centrilobulární nekrózou, spojenou s renální tubulární nekrózou. Mimoto glutathion, který byl pečlivě autorem zkoumán, je nejhojnějším intracelulárním neproteinovým thiolem (tripeptid) a patří k nejmocnějším antioxidantům.

Cílem této disertační práce bylo zavést a optimalizovat metodu ke stanovení glutathionu, která ve srovnání s existujícími metodami by měla být přesnější, rychlejší, citlivější, velmi dobře reprodukovatelná a dokonce lacinější. Vedle vylepšení analytické metody pro stanovení glutathionu bylo provedeno hodnocení dalšího mechanismu paracetamolové toxicity.

K řešení zadaných úkolů autor použil adekvátní metodické postupy odpovídající současným požadavkům, což velmi dobře popsal na více nežli 20 stranách.

K výsledkům disertační práce.

Autor v uvedených experimentálních podmínkách přispěl k vylepšení spektrofluorometrické metody pro stanovení glutathionu, jež je založena na měření reakčního produktu mezi O-ftalaldehydem a glutathionem ve srovnání k existující HPLC metodě, která se rutinně používá. Autor usoudil, že optimalizovaná glutathionová metoda má vysokou specifitu, citlivost, přesnost a je srovnatelná s metodou HPLC a při použití kultury hepatocytů je méně náročná na čas. Autor objevil na dávce závislý pokles v glutathionreduktázové aktivitě jako funkci koncentrace acetaminofenu v hepatocytech vlivem vytvořeného metabolitu acetaminofenu, který byl dosud považován za neškodný. To vede k pochopení jiného mechanismu paracetaminofenové toxicity vedle tvorby vysoce aktivního a toxického metabolitu (N-acetyl-p-benzochinonimin), který se vytváří jen při vyšších dávkách, avšak snížení glutathionreduktázy se objevuje při nižších dávkách, což je právě důležitý objev potenciální toxicity u acetaminofenu, který je uveden v této práci.

Práce Mgr. Tomáše Roušara je precizní a dobře zdokumentovaná. Kvalita této vědecké práce byla zdůrazněna autorovými publikacemi

K předložené práci mám tyto následující připomínky a dotazy:

- Chemická a toxikologická charakterizace elektrofilní povahy reaktivního metabolitu má vest k vývoji účinných antidot (např. N-acetylcystein), které by chránily oběť od náhle vzplanuvší (fulminantní) hepatotoxicity a smrti. Proč nelze použít aplikace GSH jako antidota in vivo?
- V části "Výsledky" na straně 84 – velmi zajímavé je vyjádření průběhu AAP koncentrace toxického efektu jako uvolňování LD nebo pomocí WST-1 testu. Autor dokázal, že AAP 1 mM je netoxické po 24 hodinách kultivace pomocí LDH testu, avšak vykazuje vysokou toxicitu s použitím WST-1 testu. Můžete se vyjádřit k těmto výsledkům a vysvětlit tyto rozdíly?
- Opět v části "Výsledky" na straně 87: 1 mM koncentrace APP vyvolala statisticky významné snížení glutathionreduktázové aktivity po 3 hodinách inkubace, ale nikoliv po 12 nebo 24 hodinách. Prosím o vyjádření a vysvětlení.
- V současné době je metoda Hissina a Hilfa nejcitovanější metodou pro glutathion. Jejich vylepšení ve vztahu ke specificitě metody je nejdůležitější, jestliže se testuje hepatocytární kultura. Myslíte si, že Vaše metoda bude také lepší vůči současným metodám, které se provádějí s jinými tkáněmi? Zamýšlíte se na testování metody s dalšími tkáněmi?

Formální připomínky k práci žádné nemám.

Závěr:

Práce řeší závažné téma, které má nejen teoretickou, ale i praktickou důležitost. Zaměření práce, výběr metod i interpretace výsledků jsou na velmi dobré odborné úrovni.

Závěrem konstatuji, že Mgr. Tomáš Roušar prokázal, že si osvojil základy samostatné vědecké práce a předložený spis splňuje požadavky kladené na doktorskou disertační práci, a proto komisi jednoznačně

d o p o r u č u j i,

aby byla práce předložena k obhajobě a na základě úspěšné obhajoby byl uchazeči udělen titul Ph.D.

V Praze dne 28. 5. 2008.

Prof. Dr. H. Farghali, DrSc.