

# OPONENTSKÝ POSUDEK DOKTORSKÉ DISERTAČNÍ PRÁCE

Název práce: *Studium změn antioxidační rovnováhy v hepatocytech po působení xenobioly in vitro*

Autor práce: *Mgr. Tomáš ROUŠAR*

Pracoviště: *Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Hradci Králové, Ústav fyziologie*

---

Předložená práce má 115 stran textu a zahrnuje 18 obrázků, 14 grafů a 9 tabulek. Je členěna do 8 kapitol podle přehledného desetinného třídění. Nadto jsou na začátku práce uvedeny český a anglický souhrn a důkladně zpracovaný seznam zkratk. Grafická úprava má vysokou úroveň, umocněnou zařazením autentické fotodokumentace a barevných grafů. Autor důsledně používá doporučený způsob psaní českých názvů enzymů.

Zpracování teoretické části bych označil za příkladné. Metodická část je dostatečně podrobná. Pokládám za vhodné zmínit, že se autor dokázal důsledně vyhnout i tak častému nešvaru, jako je udávání podmínek centrifugace počtem otáček; namísto toho správně uvádí násobky g. Poslední, osmá kapitola obsahuje seznam 108 reprezentativních prací zahraničních i českých autorů, vztahujících se k řešené problematice.

## **Téma práce:**

Tématem práce je studium změn oxidoredukční rovnováhy. Zahrnuje část metodickou a část modelových studií, v níž byly metodické postupy, vypracované autorem, aplikovány na řešení specializované xenobiolytické a toxikologické problematiky. Jde o aktuální téma, které se široce promítá do fyziologického, patofyziologického a farmakologického výzkumu.

## **Cíle práce:**

Cíle práce jsou precizně definovány. Autor se v metodické části zabýval optimalizací spektrofluorimetrické metody pro stanovení glutathionu. V části modelových studií zkoumal mechanismy toxického působení acetaminofenu v čerstvě izolovaných potkaních hepatocytech. Důležitou kapitolou je bližší prostudování změn aktivity glutathionreduktázy po působení acetaminofenu.

## **Metody zpracování:**

Výsledky disertační práce se opírají o využití moderních metod a postupů. Autor navázal v technické části své práce, kdy řešil problematiku spektrofluorimetrického stanovení glutathionu, na předchozí údaje publikované v literatuře a na základě jejich rozboru dokázal zvolit správné metodické východisko. Své výsledky ověřil analýzou HPLC/FL. V další části disertace, v modelové studii, využil moderní kultivační techniku čerstvých hepatocytů doplněnou adekvátními analytickými postupy. Přípravu acetaminofen-glutathionového konjugátu pro enzymovou inhibiční studii založil na nejnovějším literárním odkazu nalezeném rešerší.

## **Originální a prioritní výsledky:**

Dosažené výsledky, které jsou kvalitně dokumentovány tabelární, grafickou anebo obrazovou formou, přinášejí významná původní zjištění.

1. Autor úspěšně modifikoval metodu spektrofluorimetrického stanovení glutathionu a ověřil ji. Modifikace spočívala ve změně excitace, pH a teploty detekční směsi. Prokázal, že nová metoda je přesná a reprodukovatelná a že dovoluje odlišit obě formy glutathionu v jednom biologickém vzorku.

2. Autor získal prioritní data, která přesvědčivě ukazují na přímý inhibiční účinek acetaminofen-glutathionového konjugátu na glutathionreduktázu. Pokud budou jeho nálezy jednoznačně potvrzeny, znamenají podstatný příspěvek k oxidační hypotéze formulované pro objasnění toxických účinků acetaminofenu v buňkách.

#### **Splnění cílů:**

Práce disertanta jednoznačně splnila vytčené odborné cíle. Z přehledu publikací disertanta je patrné, že výsledky byly prezentovány na tuzemských i zahraničních konferencích a částečně také byly publikovány. Další publikace je přijata do tisku.

#### **Připomínky a otázky k diskuzi:**

Předložená práce poskytuje záruky, že autor má schopnosti a kapacitu vypracovat se k dokonalosti v oblastech, které zatím obsáhl v míře úměrné jeho věku a zkušenostem. Moje připomínky jsou proto spíše formálního rázu a míněny jako náměty k diskuzi, případně jako náměty pro další pokračování studie, než vyhledáváním nedostatků práce, jejíž vysokou úroveň lze sotva zpochybnit.

1. Z jazykových prohrěšků je zřejmě namístě upozornit autora práce alespoň na opakované nesprávné a bohužel i matoucí použití „x%“ vs. „x %“ (číselný údaj x + % bez mezery vs. totéž s mezerou).

2. Další připomínka se týká skutečnosti, že v práci nejsou zcela správně používány jednotky enzymové aktivity. Enzymologická veličina vyjadřovaná v jednotkách „U/mg proteinu“ má svůj odborný název – jaký? (Pokud autor označuje takový údaj jako „koncentrace“, a navíc místy uvede jen „U/mg“, není jasné, zda skutečně hovoří o „U/mg proteinu“, nebo zda jde jen o překlep a záměnu za „U/ml“.) Rovněž veličině vyjadřované v „U/ml“ přísluší jednoznačný odborný termín – jaký? Jaké jsou SI jednotky uvedených veličin?

3. Jakými enzymovými měřeními – a veličinami – by autor v principu mohl dále ověřit a blíže charakterizovat inhibiční účinky AAP-GSH?

#### **Závěr:**

Na základě výše uvedeného rozboru konstatuji, že posuzovaný literární celek splňuje všechny požadavky kladené na disertační práci. Proto **doporučuji**, aby byla přijata k obhajobě a aby byl na základě úspěšné obhajoby uchazeči udělen akademický titul Ph.D. v souladu s § 47 Zákona o vysokých školách č. 111/98 Sb.

V Olomouci dne 26. 5. 2008

Prof. MUDr. Jaroslav Veselý, CSc.,  
Ústav patologické fyziologie LF UP v Olomouci