

# Oponentní posudek doktorské disertační práce

**Jméno disertanta:** Mgr. Alena Moravcová

**Název práce:** Studium mechanismů hepatotoxických a hepatoprotektivních účinků na modelově poškozených hepatocytech

**Oponent disertační práce:** prof. Mgr. Roman Kand'ár, Ph.D.

---

## **Aktuálnost zvoleného tématu**

Studentka se ve své práci zabývala porovnáním kultivace primárních hepatocytů v monovrstvě a sendvičovém uspořádání, modelem steatózy v primární kultuře hepatocytů vyvolané kyselinou palmitovou a olejovou, hodnocením ochranného účinku epigalokatechingalátu na hepatocyty v primární kultuře vystavené D-galaktosaminu, hodnocením citlivosti primární kultury hepatocytů, u nichž byla navozena steatóza kyselinou palmitovou a olejovou, na toxický účinek D-galaktosaminu, a nakonec hodnocením ochranného účinku epigalokatechingalátu na rozvoj steatózy v primární kultuře hepatocytů, která byla vyvolána kyselinou palmitovou a olejovou. Jedná se o aktuální téma, a jelikož v současné době není známá přesná patogeneze ani cílená léčba jaterní steatózy, je každá práce, která řeší tuto problematiku, přínosná. Závěrem lze tedy konstatovat, že zvolené téma je aktuální a přínosné.

## **Cíle práce**

Cíle práce porovnat kultivaci v monovrstvě a sendvičovém uspořádání, vytvořit model steatózy v primární kultuře hepatocytů přidáním kyseliny palmitové a olejové, zhodnotit ochranný účinek epigalokatechingalátu na hepatocyty vystavené účinkům kyseliny palmitové a olejové (navození steatózy) a D-galaktosaminu, a zhodnotit citlivost primární kultury hepatocytů se steatózou vyvolanou kyselinou palmitovou a olejovou na toxický účinek D-galaktosaminu, byly splněny.

## **Zvolené metody zpracování a postup řešení**

Studentka zvolila vhodné metody pro izolaci hepatocytů, určení jejich viability a hustoty v suspenzi. Primární kultury hepatocytů v monovrstvě a sendvičovém uspořádání zhotovila dle postupu, který je standardní a běžně používaným na pracovišti. K biochemickým testům zařadila stanovení aktivity laktátdehydrogenasy uniklé z hepatocytů do kultivačního média diagnostickou soupravou od firmy DiaSys a dehydrogenas (metoda s tetrazoliovou solí), stanovení hladiny malondialdehydu (přesněji látek reagujících s kyselinou 2-thiobarbiturovou), hodnocení tvorby reaktivních sloučenin kyslíku (metoda s CM-H<sub>2</sub>DCFDA), stanovení

intracelulární koncentrace glutathionu (metoda Hissina a Hilfa, kdy glutathion reaguje s *ortho*-ftaldialdehydem za vzniku fluoreskujícího derivátu), stanovení aktivity kaspasy 3 (metoda, kdy kaspasa 3 katalyzuje hydrolýzu *N*-acetyl-D-E-V-D-7-amino-4-methylkumarinu a vzniká fluoreskující 7-amino-4-methylkumarin), stanovení hladiny albuminu metodou ELISA (Bethyl Laboratories), stanovení koncentrace močoviny (dnes již málo používaná metoda s diacetylmonoximem), triacylglycerolů (enzymatická metoda s lipoproteinovou lipasou; Cayman Pharma) a bílkovin (metoda Bradfordové využívající specifické adsorpce barviva „Coomassie Brilliant Blue G-250“ na molekulu bílkoviny).

### **Zhodnocení výsledků dosažených disertantem**

Studentka zavedla na pracovišti metodu kultivace primárních hepatocytů potkana v sendvičovém uspořádání. Uvádí však, že pro účely studia mechanismů hepatotoxicity a potenciálních protektiv na jedno až dvoudenních kulturách by mohla postačovat kultivace v monovrstvě.

Přidáním kyseliny olejové a palmitové došlo u hepatocytů k zvýšené syntéze triacylglycerolů, v případě kyseliny palmitové také k zvýšené produkci reaktivních sloučenin kyslíku, poklesu membránového potenciálu a funkční kapacity.

Ochranný účinek epigalokatechingalátu na hepatocyty vystavené účinkům D-galaktosaminu (navození hepatotoxicity) a kyseliny palmitové a olejové (navození steatózy) nebyl prokázán.

Hepatocyty vystavené účinkům kyseliny palmitové a olejové (navození steatózy) byly více citlivé k toxickému poškození vyvolanému D-galaktosaminem.

Dosažené výsledky jsou přehledně uvedeny v grafech, případně obrázcích. Výsledky jsou dostatečným způsobem okomentovány, porovnány s dostupnou literaturou a vhodně diskutovány.

### **Význam pro praxi nebo pro rozvoj vědního oboru**

Disertační práce se zabývá problematikou steatózy jater a účinku epigalokatechingalátu (hepatoprotektivum) na hepatocyty s navozenou steatózou a hepatocyty vystavené účinku toxické látky (D-galaktosamin). Jedná se tedy o práci, která má význam v klinické praxi a rozvíjí svými výsledky vědní obor hepatologie.

### **Publikační aktivita disertanta**

Studentka Mgr. Alena Moravcová je autorkou nebo spoluautorkou pěti publikací s impaktním faktorem a jedné recenzované publikace. Je první autorkou jedné publikace s impaktním faktorem a jedné recenzované publikace. Počet citací v databázi Scopus je k datu 10. 1. 2022 126 (120 bez autocitací), h-index je 5.

## **Formální úprava disertační práce a jazyková úroveň**

Formální úprava a jazyková úroveň je největší slabinou předložené disertační práce. Některé věty jsou nesrozumitelné díky nevhodnému překladu z anglického jazyka.

### **Připomínky a dotazy k disertační práci**

Strana 20, poslední odstavec

„Alkohol je v játrech metabolizován dvěma cestami. První zahrnuje funkci alkoholdehydrogenázy (ADH) a vznik acetaldehydu, z kterého následně vzniká působením acetaldehyddehydrogenázy (ALDH) acetat. Tento nestabilní produkt se rozkládá na vodu a CO<sub>2</sub>.“ Opravdu je octan nestabilní a rozkládá se na vodu a oxid uhličitý?

Strana 36, druhý odstavec

„S-Adenosyl-L-methionin (SAM) ... Je prekurzorem pro syntézu glutathionu ...“

Můžete objasnit, jak je míněno, že SAM je prekurzorem pro syntézu glutathionu?

V česky psané práci byste namísto Germany, Denmark, apod. měla uvádět státy v jazyce českém.

Strana 53, odstavec první

„Analogicky zacházíme s kalibračními roztoky o známé koncentraci MDA.“ Jaký standard jste používali?

Popisek tabulky je obvykle nad tabulkou.

### **Závěrečné zhodnocení**

Předložená disertační práce splňuje požadavky kladené na tento typ práce. Práci doporučuji k obhajobě.

V Pardubicích dne 10. 1. 2022

.....  
jméno a podpis oponenta