

Oponentský posudek disertační práce Mgr. Lenky Bittnerové:

Vlastnosti a apoptóza jaterních hvězdicových buněk v cirhotických játrech potkanů

Předložená disertační práce svým obsahem a řešením spojuje biochemické i patofyziologické aspekty jak v tématu, tak v jeho vlastním řešení. Písemný elaborát je středního rozsahu – 84 stran textu včetně obrázkové a grafické dokumentace, dále však spis obsahuje asi 60 stran příloh, sestávajících z publikací s tematikou obsaženou ve vlastní disertaci.

Z podstatných částí textu uvádím 20 stran popisujících současný stav řešené problematiky, asi 10 stran metodické části, výsledky jsou uvedeny na přibližně 30 stranách a jsou diskutovány v rozsahu 7 stran. Použitá literatura obsahuje asi 150 položek.

K formálnímu členění práce nemám zásadní připomínky, jde o tradiční postup.

S chutí jsem si přečetl Přehled současného stavu problematiky, který oživil a doplnil mé dosavadní znalosti o morfologii a funkci jater i o procesech fibrózy a cirhózy tohoto orgánu. Tato část též slouží autorce i čtenáři k pochopení cílů práce. Proto bych uvítal zařazení těchto cílů právě až za tento přehled.

K cílům práce patřilo především izolovat hvězdicové buňky z jater jak nepoškozených, tak akutně poškozených tetrachlormetanem, a charakterizovat je z hlediska morfologie, růstu i buněčného cyklu. Dále bylo cílem vytvořit model vhodný ke studiu apoptózy jaterních hvězdicových buněk jednak in vivo navozené tetrachlormetanem, jednak in vitro pomocí tří dalších toxických látek (gliotoxin, cykloheximid a cytochalasin D), indukujících apoptózu různými mechanismy. Konečně pak zjistit, jaký je vliv kolagenu typu I na apoptózu hvězdicových buněk a analyzovat geny asociované s apoptózou.

Metodická část zahrnuje široké spektrum postupů od izolace a kultivace hvězdicových buněk přes histologii, imunocytochemii, fluorescenční mikroskopii, cytometrii, analýzu fragmentů DNA, izolaci RNA, analýzu exprese genů a vyvolání apoptózy až po měření katalytické aktivity laktátdehydrogenasy.

Výsledky jsou vhodně prezentovány a zahrnují 9 grafů a 6 obrázků a tyto výsledky jsou dále přiměřeně diskutovány v samostatném oddílu.

Doktorandce se podařilo zvládnout všechny potřebné metody, mj. izolovat hvězdicové buňky z nepoškozených jater, zavést metodu studia aktivovaných hvězdicových buněk poškozených in vivo tetrachlormetanem a dalšími třemi látkami navozujícími apoptózu in vitro, kultivaci hvězdicových buněk na plastu a na kolagenním gelu a rovněž metody detekce apoptózy s využitím fluorescenčního barvení a průtokové cytometrie. Těmito postupy doktorantka zejména prokázala, že hvězdicové buňky jater jsou při kultivaci na plastu aktivovány, proliferyjí a mění fenotyp. Během aktivace dochází ke změnám v expresi různých skupin genů, např. dochází ke zvýšené expresi genů pro složky extracelulární matrix a k potlačení exprese řady metaloproteinů. Práce přinesla podle autorky i

některé spíše překvapivé výsledky, týkající se společných nebo obdobných účinků (gel z kolagenu typu I) na změny hodnot bez ohledu na mechanismus navození apoptózy.

Práce nepochybně přispívá novými poznatky k dosavadním znalostem o změnách v průběhu fibrotického a cirhotického procesu v játrech a perspektivách vratnosti nebo inhibice těchto dějů.

Připomínky a dotazy k práci:

- K navození apoptózy tetrachlormetanem: na str. 30 se píše, že intragastrické podání tetrachlormetanu bylo nejefektivnější. V jakém smyslu? V rychlosti účinku, intenzitě odpovědi, standardizaci postupu nebo odpovědi? Jaký byl postup? Lze porovnat v jednotlivých parametrech s možným intraperitoneálním podáním?

- K dávkování tetrachlormetanu (str. 42): nevhodnější byly 3 dávky a následná izolace. V čem?

- Stanovení LDH bylo prováděno na principu změny absorbance při 360 nm. Byla vlnová délka zvolena na základě přístrojového omezení nebo určité výhody této vlnové délky ve srovnání s vlnovou délkou, při níž je změna úměrná reakci maximální?

- Statistika: Uvádí se, že analýzy byly prováděny nejméně ve 3 provedeních. Výsledky jsou prezentovány jako průměr \pm SEM (= standard error of the mean; viz str. 39 a např. graf 1.). Jde tedy o hodnocení rozptylu hodnot jednotlivých měření u konkrétního vzorku (intervalu atp.), nebo o sledování rozdílu hodnot proměnné v průběhu experimentu? (SD?).

- Práce je (až na výhradu k bohatému využití zkratk, viz dále), napsána velmi čtivě, s malým počtem překlepů nebo chyb. Upozorňuji na to, že vedle „progresivního“ pravopisu, většinou použitého u chemické nomenklatury a s nímž se už smírám, se vyskytují obdobné termíny v „klasické“ formě (např. str. 32 – kolagenasa, pronasa, str. 36 peroxidasa, -methan). Předpokládám, že je to způsobeno využitím různých literárních zdrojů.

- Samostatnou část práce tvoří přehled zkratk. To je samo o sobě potřebné, protože zkratk je asi 70. Jejich použití v textu však přinejmenším tomu, kdo v řešené oblasti přímo nepracuje, poměrně znesnadňuje porozumění a snižuje čtivost textu, může dojít i chybám (EMC místo ECM na str. 13). Přitom zkratky jako Eln pro elastin nebo Col pro protokolagen I, III, GLT pro gliotoxin, AO pro akridinovou modř, HBSS pro Hanksův roztok jsou spíše zbytečné a text nijak významně nezkracují. Je zajímavé, že nejčastěji použitá zkratka, tj. HSC, v seznamu není.

- Sekvence aminokyselin Arg-Gly-Asp je označena jako „tzv. sekvence RGD“, což využívá výhodného popisu, zavedeného kdysi na Šormově Ústavu organické chemie a biochemie ČSAV v Praze. Předpokládám, že doktorandka ví, co tato písmena znamenají....

Publikace: Hodnota výsledků je doložena pěti publikacemi obsahujícími výsledky experimentů a rovněž přehledovým článkem. Doktorandka je první nebo jedinou autorkou u dvou prací. Jak by hodnotila svůj podíl a příspěvek u ostatních publikací?

Celkové hodnocení:

Předložená disertace přispívá novými poznatky k dosavadním znalostem o změnách v průběhu fibrotického a cirhotického procesu v játrech a perspektivách vratnosti nebo inhibice těchto dějů. To dokazují i publikované práce za účasti doktorandky a vážící se k těmto výsledkům. Výše uvedené dotazy a připomínky se týkají spíše drobností, nikoliv podstaty a hodnoty získaných výsledků.

Dovoluji si proto konstatovat, že práce splňuje požadavky, kladené na disertační práci PhD a jako podklad pro obhajobu ji plně doporučuji.

V Chloundku u Hořic 30. července 2013

Prof. MUDr. Jaroslav Dršata, CSc.

oponent