



**UNIVERZITA KARLOVA**  
**Farmaceutická fakulta**  
**v Hradci Králové**

**OPONENTSKÝ POSUDEK DISERTAČNÍ PRÁCE**

**Univerzita obrany v Brně, Fakulta vojenského zdravotnictví, Hradec Králové**

**Doktorský studijní program:** Toxikologie  
**Student:** Mgr. Ľubica Múčková  
**Název disertační práce:** *In vitro* charakterizácia látok modulujúcich aktivitu acetylcholinesterasy  
**Oponent:** Doc. PharmDr. Iva Boušová, Ph.D.  
**Pracoviště oponenta:** Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova, Hradec Králové

Předkládaná disertační práce Mgr. Ľubici Múčkové se zabývá *in vitro* hodnocením cytotoxicity reaktivátorů a inhibitorů acetylcholinesterasy (AChE) a hledáním možných mechanismů toxicity těchto látek. Zvolené téma je vysoce aktuální, protože inhibitory AChE (iAChE) jsou běžně využívány v terapii neurodegenerativních chorob včetně Alzheimerovy choroby. Reaktivátory AChE (rAChE) slouží jako antidota při léčbě otrav organofosfátovými pesticidy a nervově paralytickými bojovými plyny. Poznání mechanismů toxicity těchto látek má velký význam z hlediska bezpečnosti terapie i vývoje nových léčiv.

Disertační práce je předložena ve slovenském jazyce v klasickém formátu a obsahuje teoretický úvod, popis použitých metod, výsledky, diskuzi, přínos práce a závěr. Práce má 150 stran a je doplněna 42 obrázky a 12 tabulkami. V práci bylo citováno celkem 154 publikovaných prací, z nichž třetina byla uveřejněna v posledních pěti letech.

V **Úvodu** jsou přehledně a čtivě shrnuty poznatky o *in vitro* modelových systémech využívaných v toxikologických studiích a možnostech *in vitro* stanovení cytotoxicity látek a proliferace buněk. Dále je pozornost věnována úloze oxidačního stresu v buněčné smrti a možnostem stanovení biomarkerů oxidačního stresu a volných radikálů. V poslední části je představena struktura a funkce acetylcholinesterasy a látky modulující aktivitu tohoto enzymu.

Na tento oddíl navazují **Cíle práce**, které jsou rozděleny do čtyř bodů: (1) stanovení cytotoxicity látek pomocí kolorimetrické a elektorimpedanční metody v buněčných modelech HepG2, ACHN, SH-SY5Y a NHLF, (2) stanovení apoptotického profilu buněk HepG2, ACHN, SH-SY5Y a NHLF po ovlivnění studovanými látkami v koncentracích odpovídajících hodnotám IC<sub>50</sub>, (3) sledování změny intracelulární hladiny volných radikálů pomocí různých fluorescenčních sond, (4) sledování antioxidačních účinků jednotlivých testovaných látek pomocí fluorescence. Tento poslední bod by mohl být podrobněji specifikován, protože „sledování pomocí fluorescence“ je poněkud vágní vyjádření.

V další kapitole (**Materiál a metodika**) jsou popsány metody, které byly použity v experimentální části práce. U většiny popisovaných metod jsou uvedeny jejich princip, po němž následuje popis praktického provedení. Tento formát považuji za zdařilý.

Dosažené výsledky jsou přehledně a výstižně popsány, následně diskutovány a shrnuty v závěru. Za slabinu této části práce považuji to, že doktorandka diskutovala každou část práce zvlášť a nesnažila se dát např. výsledky sledování apoptotického profilu buněk po ovlivnění testovanými látkami do souvislosti s jejich schopností tvořit reaktivní formy kyslíku a dusíku. Takto je diskuze fragmentována do čtyř vzájemně nepropojených oddílů.

Předkládaná práce je přehledně a čtivě sepsaná a pěkně zpracovaná. Nicméně jako v každé práci většího rozsahu lze i zde nalézt některé formální nedostatky. V textu se vyskytují drobné překlepy a chyby, avšak v množství nepřesahujícím úroveň obvyklou pro tento typ práce. K práci mám následující formální **připomínky**:

- Mezi zástupce volných radikálů nepatří peroxid vodíku a peroxinitritový anion (str. 36), jedná se o neradikálové reaktivní formy kyslíku a dusíku. HOCl je kyselina chlorná nikoliv hypochlorná (str. 37).
- Domnívám se, že v tabulce 9 a 10 jsou chybně uvedeny hodnoty  $IC_{50}$  pro látky 7-MEOTA a Cl-THA a tyto hodnoty pak neodpovídají slovnímu komentáři k tabulce.
- Zavedená a v literatuře obecně používaná zkratka pro redukovaný glutathion je GSH (pro oxidovaný pak GSSG).
- V souvislosti s rivastigminem se obvykle hovoří o pseudo-irreverzibilní inhibici“.
- V česky/slovensky psaném odborném textu by bylo vhodné vyvarovat se používání anglickanismů (např. „level ATP“).

Přes všechny připomínky mohu konstatovat, že zmiňované drobné nedostatky nesnižují vědeckou hodnotu předkládané práce.

Z hlediska vědecko-výzkumné úrovně se jedná o práci kvalitní, v níž uchazečka prokázala schopnost soustředěně řešit vytčené cíle a získat cenné výsledky. Výsledky této práce byly publikovány ve třech impaktovaných publikacích, na nichž je doktorandka autorkou či spoluautorkou. Kromě těchto prací je spoluautorkou dalších 15 publikací. V průběhu řešení této práce zavedla Mgr. Múčková na pracovišti fluorescenční metody pro sledování vzniku reaktivních forem kyslíku a dusíku v buňkách.

K autorce mám následující **dotazy**:

- 1) Jaká kritéria jste použila při výběru buněčných linií, u kterých byla sledována cytotoxicita rAChE a iAChE? Neuvažovala jste o použití primárních kultur, např. hepatocytů, které by odrážely fyziologickou situaci lépe než nádorové buněčné linie?
- 2) Jakých plasmatických koncentrací rAChE a iAChE lze u člověka dosáhnout při terapeutickém podání těchto látek?
- 3) Jednou z metod použitých v této práci pro sledování cytotoxického účinku studovaných látek byla elektroimpedanční metoda měřená pomocí přístroje xCELLigence. Mohla byste srovnat výhody, nevýhody/limitace a možnosti použití této metody?

## Závěr

Předkládanou práci hodnotím jako kvalitní vědeckou studii, která splňuje veškeré požadavky kladené na disertační práci. Uchazečka prokázala schopnost a připravenost k samostatné vědecké práci. **Doporučuji tedy, aby byla předložená disertační práce přijata k obhajobě.** Doporučuji po úspěšné obhajobě udělit Mgr. Lubici Múčkové, v souladu s § 47 zákona o vysokých školách č. 111/1998 Sb., akademický titul Ph.D.

V Hradci Králové, 31.7.2020

doc. PharmDr. Iva Boušová, Ph.D.

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Akademika Heyrovského 1203/8, 500 05 Hradec Králové



UNIVERZITA KARLOVA  
Farmaceutická fakulta  
v Hradci Králové