

UNIVERZITA OBRANY V BRNĚ
Fakulta vojenského zdravotnictví
Třebešská 1575
500 01 Hradec Králové

OPONENTSKÝ POSUDEK DIZERTAČNÍ PRÁCE

Student: Mgr. Lubica Múčková

Název dizertační práce: *In vitro* charakterizácia látok modulujúcich aktivitu acetylcholinesterasy.

Posudek zpracoval: prof.RNDr. Rudolf Štětina, Csc.

Předložená práce má celkem 149 stran včetně 42 obrázků a 12 tabulek. Je zaměřena na *in vitro* hodnocení cytotoxicity látek modulujících aktivitu acetylcholinesterázy při využití různých buněčných modelů a různých metod umožňujících sledovat mechanismy působení studovaných toxických látek. V literárním úvodu práce je detailně podán přehled studovaných látek z kategorie inhibitorů a reaktivátorů acetylcholinesterázy a metod sledování jejich účinků. Úroveň zpracování úvodu svědčí o autorčině širokém rozhledu v problematice a její teoretické připravenosti k řešení daného tématu. Použité metody jsou popsány jasně a přehledně. Výsledky jsou popsány detailně a dokumentovány přehlednými tabulkami a grafy.

Hlavním cílem bylo stanovit cytotoxicitu 10 látek z kategorie reaktivátorů a 8 látek z kategorie inhibitorů acetylcholinesterázy. Pro stanovení cytotoxicity těchto látek bylo použito metody kolorimetrické (MTT test), metody elektroimpedanční, dále byla sledována indukce apoptózy. Pomocí fluorescenčních sond byla sledována též indukce volných radikálů a antioxidačních vlastností testovaných látek. Všechny tyto parametry byly stanoveny u 3 buněčných linií, a sice u linie HEPG2, SH-SY5Y, ACHN a u lidských fibroblastů.

Výčet použitých metod a buněčných modelů dokumentuje značnou metodologickou náročnost práce. Výsledky přinášejí úctyhodné množství dat a údajů o mechanismech působení inhibitorů a reaktivátorů acetylcholinesterázy. Velmi zajímavé je, že údaje o cytotoxicitě látek získané metodou MTT i metodou elektroimpedanční přinesly prakticky shodné výsledky. Velmi cenné jsou výsledky testování indukce volných radikálů (RONS) působením testovaných látek, a to při současném měření cytotoxicity. Zajímavé je zjištění, že

na rozdíl od jiných reaktivátorů v případě HI-6 nedošlo ke statisticky významným změnám RONS u buněk v průběhu jejich ovlivnění koncentrací odpovídající IC_{50} .

Velmi cenné je zjištění, že určité narušení oxidoredukční rovnováhy by mohlo být zodpovědné za cytotoxický účinek alespoň některých z testovaných látek. Autorka podrobně diskutuje možné vztahy mezi molekulární strukturou testovaných látek a jejich cytotoxicitou. Podobně diskutuje též vztah mezi poměrem buněk v časné a pozdní fázi apoptózy a nekrózy. Zde postrádám vysvětlení, čemu tento poměr odpovídá a jak je využitelný.

Práce přináší originální výsledky, které lze jen těžko uvádět do kontextu, protože podobné údaje o cytotoxicitě studovaných látek v podstatě chybí. Přínosem práce je zavedení několika metod využitelných pro studium cytotoxicity látek. Práce jasně dokazuje, že metody byly nejen zavedeny, ale validovány prověřením efektů řady testovaných látek.

Z uvedeného je zřejmé, že práce je zaměřena především metodologicky, s orientací na cytotoxicitu inhibitorů a reaktivátorů acetylcholinesterázy. Důležitý je též výběr modelových buněčných linií. Výsledky značně přispívají k vypracování relevantních postupů pro sledování cytotoxických účinků látek.

Předložená disertační práce je založena na moderních experimentálních přístupech. Ke splnění vytýčených cílů práce zaměřené na testování látek ovlivňujících aktivitu acetylcholinesterázy autorka zavedla a ověřila náročné metody jako je test MTT, elektrompedanční metoda, stanovení apoptózy metodou mikrokapilární průtokové cytometrie, měření hladiny volných radikálů a antioxidační potenciálu. Práce obsahuje přínosné nové poznatky, které mají význam pro obor toxikologie. Autorka zvládla velice náročné experimentální metody, prokázala schopnost kritického hodnocení získaných výsledků a schopnost uvést tyto výsledky do kontextu s nejnovějšími poznatky o struktuře a mechanismech působení inhibitorů a reaktivátorů acetylcholinesterázy. Prokázala tak schopnost samostatně řešit náročné vědecké problémy. Práce splňuje podstatné požadavky na závěrečné práce stanovené vnitřními předpisy Univerzity obrany. Proto práci doporučuji k obhajobě.

Závěrem bych se rád autorky zeptal na její názor na souvislost mezi dříve publikovaným nálezem indukce zlomů DNA působením HI-6 (Svobodová et. al. Gen. Physiol. Biophys. (2012), 31, 77-84. doi:10.4149/gpb_2012_010) a výsledky indukce apoptózy působením HI-6 popsané v této práci.

V Hradci Králové dne 8.9.2020

prof. RNDr. Rudolf Štětina, CSc.