OPONENTSKÝ POSUDEK

Doktorská dizertační práce, autor: Mgr. Martina Vrbová, 2016

Předkládaná doktorská dizertační práce „**Využití purifikovaných toxických látek při studiu nefrotoxicity *in vitro***" má celkem 149 stran vč. příloh a seznam literatury obsahuje 295 správně citovaných referencí. Součástí práce jsou také 3 publikace v impaktovaných časopisech, na jedné z nichž je Mgr. Vrbová první autorkou. Přiložena je též jedna práce bez IF. Práce má klasické členění, kde úvod na 55 stranách přehledně a důkladně seznamuje s řešenou problematikou. Velmi podrobně a pečlivě je zpracována experimentální část. Následuje vlastní výsledková část (25 stran) a diskuze (16 stran). Veškeré části jsou napsány čtivou a srozumitelnou formou bez závažnějších chyb. Oceňuji zařazení Přílohy I (Originální data), i když se nejedná o primární data, ale o statisticky zpracované podklady grafů.

Cíle práce jsou jasně formulovány a týkají se aktuální a zajímavé problematiky toxicity acetaminofenu, který patří v současné době mezi nejčastěji používaná analgetika a antipyretika. Mechanismus patologického účinku acetaminofenu vedoucí až k akutnímu poškození ledvin a zejména jater není dosud objasněn.

Autorka studovala nefrotoxicitu acetaminofenu *in vitro* na lidských imortalizovaných proximálních tubulárních buňkách (linie HK-2) a zaměřila se na ověření hypotézy, že toxický efekt způsobují konjugáty vzniklé oxidací acetaminofenu a jeho následnou reakcí s glutathionem (APAP-SG), který je metabolizován na cysteinový konjugát (APAP-Cys). Cílem práce bylo také posoudit možné využití stanovení koncentrace lipokalinu NGAL jako vhodného proteinového markeru pro detekci akutního poškození HK-2 buněk. K dosažení experimentálních cílů Mgr. Vrbová použila celé řady biochemických a buněčně biologických metod a využila dostupnosti na pracovišti připravených a purifikovaných APAP-SG a APAP-Cys konjugátů.

K práci mám jen několik **připomínek**:

Název práce mi přijde až příliš obecný.

Rozsáhlá diskuze (16 stran) často zeširoka opakuje fakta, která již byla představena v teoretické části.

Jednotky veličin v popisu os u grafů uvádět v kulatých a ne hranatých závorkách.

U mikroskopických snímků je v pravém dolním rohu ukázáno větší zvětšení, které není specifikováno a ani není zřejmé, co vlastně výřez ilustruje.

Hmotnostní spektra (graf 10, 11, str. 96, 97) jsou označena jako tandemová, ale ve spektru graf 10 postrádám fragmentační ionty. Naopak u MS2 spektra v grafu 11 by se mohl označit/okomentovat hlavní produktový ion m/z = 140.

Autorky bych se rád **zeptal** na následující:

1) Ukazujete, že HK-2 buňky metabolizují acetaminofen a vznikaji konjugáty APAP-SG a APAP-Cys. Nezkoušeli jste analyzovat i hlavní konjugáty, tj. glukuronáty a sulfáty a provést vzájemnou kvantifikaci?

2) Můžete okomentovat, zda jste případně vedle měření ROS a GSH též stanovovali hladiny hlavních antioxidačních enzymů (např. metodou Western blot)?

3) Máte nějaké vysvětlení pro nižší toxicitu 5 mM APAP-SG v porovnání s ostatními použitými koncentracemi?

Závěrem mohu konstatovat, že Mgr. Martina Vrbová přispěla k řešení zajímavé problematiky nefrotoxicity acetaminofenu a prokázala, že je schopná o své práci úspěšně referovat. Předkládanou práci **doporučuji** postoupit k obhajobě za účelem udělení titulu Ph.D. za jménem.

V Praze, dne 11.9.2016

RNDr. Marek Vrbacký, Ph.D.

Fyziologický ústav AV ČR, v. v. i.
Vídeňská 1083
142 20 Praha 4

jac brno

ÚSTAV ANALYTICKÉ CHEMIE
Akademie věd České republiky,
v. v. i.

Posudek disertační práce

Mgr. Martina Vrbová
Využití purifikovaných toxických látek při studiu nefrotoxicity *in vitro*

Disertační práce se zabývá studiem nefrotoxicity acetaminofenu a jeho metabolických derivátů, což představuje velice aktuální tématiku v oblasti výzkumu toxicity léčiv. Práce je logicky rozčleněna. Teoretická část pojednává o renální biotransformaci xenobiotik, akutní nefrotoxicitě způsobené léky včetně popisu možných markerů poškození ledvin. V experimentální práci se pak autorka zabývá studiem vlivu acetaminofenu a jeho derivátů na renální HK-2 buňky, kde využila optické mikroskopie a řady biochemických a imunochemických testů k popisu toxického působení testovaných látek. Na základě získaných výsledků autorka vznesla i vlastní hypotézy popisující nefrotoxický účinek acetaminofenu a jeho metabolitů.

Práce vychází ze tří přiložených publikovaných prací (dvě s impaktním faktorem), které prošly oponentským řízením, a jednoho rozšířeného abstraktu z konference CECE Junior 2013. Mgr. Martina Vrbová je u dvou prací uvedena jako první autorka.

Po formální stránce je práce zpracována na výborné úrovni a až na pár překlepů je téměř nemožné nalézt v ní jakoukoli chybu.

Po stránce obsahové rovněž nelze práci mnoho vytknout, neboť stěžejní část díla prošla oponentským řízením a byla publikována v časopise Physiological Research.

Autorka splnila vytčené cíle a k vlastní práci bych měla pouze několik dotazů a připomínek:

Uvádíte, že čistota testovaných látek byla ověřena pomocí MS s „elektronsprejovou" ionizací (str. 76) a použití tandemové MS, ale uvedené grafy ukazují pouze spektra z jednoduchých MS skenů (str. 96, 97). Mohla byste upřesnit postup Vašeho měření pomocí MS s ionizací elektrosprejem a vysvětlit rozdíl mezi elektronovou ionizací a ionizací elektrosprejem?

Můžete se vyjádřit k rozporuplným výsledkům inkubace buněk v přítomnosti 1 mM APAP-SG a 5 mM APA-SG (str. 99, 147)? Stanovení „LDH leakage" i morfologie ukazuje na vyšší poškození buněk v přítomnosti nižší koncentrace APAP-SG.

Jak si vysvětlujete nárůst intracelulární koncentrace GSH při inkubaci buněk s vyšší koncentrací APAP-SG (1 mM a 5 mM) oproti nízkým testovaným koncentracím (0,25 mM a 0,5 mM) (str. 103)?

Můžete vysvětlit odlišný trend vlivu délky inkubace na viabilitu buněk v případě inkubace v přítomnosti 5 mM APAP-Cys (str. 104)?

Jak si vysvětlujete, že produkce ROS není závislá na délce inkubace buněk, ale jen na koncentraci APAP (str. 116)?

Na str. 123 vznášíte hypotézu o indukci apoptózy působením APAP-SG. Jaké výsledky Vás vedou k této hypotéze?

Jaký je Váš názor na specifitu použitých biochemických testů, např. stanovení glutathionu v buněčných lyzátech. Jaké další látky mohou ovlivnit výsledky měření? Jaké jiné analytické metody by mohly být vhodnější?
Rovněž je patrná nelineární závislost počtu buněk na výsledek WST-1 testu (str. 80) – výrazně nižší hodnoty absorbance pro 20 tis. buněk vs. 30-50 tis. buněk. Jaká je specifita WST-1 testu?

Všechny experimenty byly prováděny na velkém počtu buněk (tisíce). Jak může takto velká a heterogenní populace buněk, i když se jedná o specifickou buněčnou linii, použitá v experimentech ovlivnit získané výsledky? Jak přínosné vidíte sledování toxického vlivu různých látek na jednotlivých buňkách a obecně potenciál „single cell analysis" přístupů v analytické chemii?

Uvedené drobné připomínky/dotazy nikterak nesnižují kvalitu předložené práce a vzhledem k výše uvedenému **doporučuji přijetí disertační práce k obhajobě.**

V Brně 12. září 2016

Křenková Jana

Mgr. Jana Křenková, Ph.D.
Ústav analytické chemie AV ČR, v. v. i.

Jy2pfgxdqOPONENTSKÝ POSUDEK

doktorské dizertační práce

„Využití purifikovaných toxických látek při studiu nefrotoxicity in vitro."

Autor práce: Mgr. Martina Vrbová
Pracoviště: Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická, Katedra analytické chemie
Vedoucí práce: prof. Ing. Karel Ventura, CSc.
Školitel-konzultant: doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.
Oponent: prof. MUDr. Stanislav Mičuda, Ph.D., Ústav farmakologie, Lékařská fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova

Obecná charakteristika práce:

Předložená dizertační práce obsahuje všechny předepsané náležitosti. Celkový rozsah práce je 162 stran včetně čtyřech přiložených publikací autorky. Samotný text je řádně strukturovaný a obsahuje teoretický úvod v rozsahu 69 stran, definici cílů práce, detailní popis použitých metod v rozsahu 16 stran následovaný 25 stránkami výsledků, 16 stranami diskuse, závěrem, přehledem použité literatury (citováno 295 prací), přehledem originálních dat a 4 přiloženými publikacemi. U dvou z těchto publikací se jedná o prvoautorské práce předkladatelky, přičemž jedna z nich je původní prací v časopise s impakt faktorem. Autorka tedy splňuje kritéria nutná pro zahájení procesu obhajoby kvalifikačního spisu této kategorie.

Zhodnocení dizertační práce:

V teoretické části autorka postupně seznamuje čtenáře s významem ledvin pro biotransformaci xenobiotik, s funkcí jednotlivých enzymových systémů a s rolí těchto mechanizmů pro vznik toxických produktů. Následuje popis mechanizmů nefrotoxicity léčiv se zaměřením na paracetamol a jeho metabolické dráhy, možné buněčné testy hodnocení nefrotoxicity a problematiku používání bioindikátorů poškození renálních tubulárních buněk (např. NGAL, KIM1, nebo markerů oxidačního stresu). Text je přehledný a umožňuje čtenáři pochopit následně formulované cíle práce, které jsou zaměřené na aktuální problematiku nových aspektů *in vitro* hodnocení tubulární toxicity paracetamolu a jeho metabolitů. Zvolené metody odpovídají cílům řešení a jsou náležitě popsané.

Výsledky práce prezentují postupné *in vitro* hodnocení toxicity acetaminofenu (APAP) a jeho dvou metabolitů – glutathionového (APAP-SG) a cysteinového (APAP-Cys) konjugátu. Použité testy na viabilitu a cytotoxicitu prokázaly toxický vliv mateřské na HK-2 buňky. Oba konjugované metabolity se jevily jako více toxické, tj. efekt nastupoval již v nižších koncentracích. Role hodnocení NGAL jako indikátoru buněčného poškození vykazovala nejasnosti v podobě variabilní reakce na použité nefrotoxiny. U obou metabolitů se rovněž těžce hledala koncentrační závislost s koncentracemi glutathionu nebo s únikem LDH. Dané poznatky přispívají nejen k poznání role konjugovaných metabolitů paracetamolu v rozvoji

nefrotoxicity, ale rovněž zpřesňují problematiku *in vitro* hodnocení nefrotoxity za použití HK-2 buněk.

Diskuse i závěr odpovídají dosaženým výsledkům. Autorce se podařilo přiléhavě interpretovat prezentovaná data v kontextu s recentními poznatky. Následně učiněné závěry jsou střízlivé a podtrhují význam získaných výsledků.

Připomínky oponenta:
Nemám.

Dotazy oponenta:

- Toxicita metabolitů APAP-SG a APAP-Cys byla hodnocena po 24 h inkubacích, nicméně za klinické situace se nefrotoxicita APAP rozvíjí s větším zpožděním. Nezkoušeli autoři i delší inkubace?
- Pro extrapolace do *in vivo* situace je nutno zhodnotit i biologický poločas eliminace těchto látek, který determinuje expozici organizmu. Jsou známa data, jak to probíhá u jednotlivých species? Může autorka případně (pokud byly někým publikovány) prezentovat křivky průběhu koncentrací APAP a jeho metabolitů v plazmě a moči a porovnat to s použitými koncentracemi mateřské látky a metabolitů?
- Jsou podobná *in vitro* data hodnocení nefrotoxicity pro NAPQI. Pokud ano, může autorka porovnat s výsledky své práce? Je známo jakých dosahuje během intoxikace NAPQI systémových koncentrací?
- Porovnání toxického potenciálu hodnocených látek by pomohlo vypočtení hodnot IC_{50} – pokoušeli se autoři o jejich určení?
- Nezkoušeli autoři na daném modelu porovnání výsledku NGAL s dalšími indikátory nefrotoxicity jakým je např. KIM-1?
- Může autorka specifikovat rozsahy prací, na kterých se během řešení podílela?

Závěr:

Dizertační práce autorky spolu s doloženými výstupy dokladuje její intenzivní výzkumnou aktivitu, která dále rozvíjí dlouhodobé směřovaní zkušeného výzkumného týmu, jehož byla členkou. Lze jenom konstatovat, že oponovaná dizertační práce Mgr. Martiny Vrbové splňuje formální i faktické požadavky kladené na takovýto kvalifikační spis. Autorky dle mého názoru prokázala schopnost samostatně úspěšně řešit složité vědecké problémy, využívat k tomu nejmodernější metody a přístupy a výsledky vhodnou formou prezentovat.

Doporučuji proto kladné přijetí dizertační práce a její podstoupení k dalšímu řízení, jehož zakončením bude udělení hodnosti PhD.

V Hradci Králové dne 20.9.2016

prof. MUDr. Stanislav Mičuda, PhD.
Ústav farmakologie
UK, LF v Hradci Králové