



UNIVERZITA KARLOVA
Přírodovědecká fakulta
Katedra biochemie

Posudek na disertační práci Mgr. Lea Njeka Wojnarové

Posuzovaná disertační práce Mgr. Lea Njeka Wojnarové, nazvaná „**Perspektivy farmakologického a klinického přínosu aktivátorů a inhibitorů Sirtuinu 1 a AMPK při zánětlivém a oxidativním poškození v jaterní tkáni**“, je experimentální studie založená na výsledcích 3 publikací autorky uveřejněných v mezinárodních periodících s impaktním faktorem. Disertantka je spoluautorkou ještě dalších 2 publikací. Na 2 člancích je uvedena jako první autor.

Jednotlivou myšlenkou předkládané práce, která je sepsána v anglickém jazyce, je komplexní problematika hepatoprotektivního působení sirtuinu 1 (SIRT1) a AMP-aktivované proteinové kinasy (AMPK) při akutním poškození jater. Práce je předepsaným způsobem členěna a obsahuje všechny závazné oddíly. Součástí práce jsou plné texty tří relevantních článků disertantky.

V úvodní části práce autorka logicky seřazenými informacemi uvádí čtenáře do problematiky chorob jater a úlohy hepatotoxických a hepatoprotektivních sloučenin. Dále disertantka popisuje role SIRT1 a AMPK v procesu poškození jater a jejich zapojení do signálních drah. Pozornost věnuje i experimentálním modelům hepatotoxicity, zejména z pohledu jejich výhod a nevýhod. Škoda, že nejsou též diskutovány často používané buněčné linie jako např. HepG2. Následují přehledně sepsané cíle práce a hypotézy, v nichž autorka formuluje jednotlivé dílčí úkoly práce a představuje hypotézy pro experimentální prověření. Na tento oddíl navazuje metodická část práce, kde jsou shrnuty základní materiály a experimentální přístupy. V některých případech je zestručnění postupů až na úkor porozumění, jak přesně práce probíhaly. Na druhou stranu jsou ke každé technice vždy uvedeny literární odkazy. Nejdůležitější částí práce je oddíl věnovaný výsledkům, v němž disertantka komentuje experimentální data získaná při použití dvou způsobů navození hepatotoxicity jak *in vivo* u potkanů kmene Wistar, tak *in vitro* na buněčných kulturách primárních hepatocytů. První způsob je založen na jednorázovém podání D-galaktosaminu a lipopolysacharidu (D-GalN/LPS), zatímco druhý na aplikaci paracetamolu (APAP). V obou případech byl aplikován resveratrol nebo další modulatory sirtuinu 1 a AMPK. Efekty expozice potkanů či buněk těmito látkám byly vyhodnocovány na základě stanovení biochemických parametrů hepatocelulárního poškození. Jednalo se o proměření aktivit aminotransaminas a stanovení koncentrací bilirubinu, markerů oxidačního stresu a lipidové peroxidace v plazmě či jaterním homogenátu potkanů a v kultivačním médiu hepatocytů. Pro doplnění byla vyhodnocena histologie jater, životnost hepatocytů a aktivita a exprese proteinů SIRT1 a AMPK.

Díky tomuto opravdu komplexnímu pohledu na studovanou problematiku se disertantce podařilo prokázat, že hepatocyty poškozující účinek D-GalN/LPS a APAP je spojen se sníženou aktivitou a/nebo expresí SIRT1 a AMPK. To do určité míry koreluje se zvýšeným oxidačním stresem v hepatocytech, který může být významně snížen přítomností selektivního aktivátoru SIRT1. Dalším důležitým výsledkem z pokusů *in vitro* je zjištění, že hepatoprotektivní efekt SIRT1 vůči hepatotoxicitě způsobené APAP není zcela závislý na aktivitě AMPK. V této části disertace je možno disertantce vytknout jen nízkou kvalitu obrázků (grafů), která znesnadňuje čitelnost popisků. U Fig. 5 není zřejmé, proč schází výsledky kontrolního pokusů, jen se samotným EX-527 (SIRT1 inhibitor).

Velmi pozitivně lze hodnotit, že díky této široce pojaté a systematické studii, která zkoumala současné působení nízkomolekulárních modulátorů SIRT1 a AMPK na různých modelech poškození jaterních buněk, se podařilo odhalit hlubší souvislosti zapojení těchto enzymů do důležitých signalizačních drah buněk. Je zřejmé, že pozitivní modulace aktivity SIRT1 a AMPK by mohla poskytnout nové terapeutické možnosti při léčení poškození jater.

Hodnotím-li vědeckou úroveň a přínos práce pro základní badatelský a orientovaný základní výzkum, je třeba konstatovat, že se jedná o práci velmi kvalitní, v níž disertantka dokázala soustředěně řešit vytčené cíle a získat hodnotné výsledky. Komplexní řešení přineslo významné vědecké výstupy s aplikačním potenciálem.

Předkládaná práce je přehledně a pečlivě vypracována. V textu se objevuje jen minimum překlepů a chyb. Přestože nedokáži zcela posoudit kvalitu angličtiny, některé formulace se nezdají být v souladu s anglickou syntaxí a frazeologií. Jako důkaz, že byla práce detailně prostudována a kriticky posuzována, uvádím např.: nevhodně použité slovo „subtracted“ (str. 34), překlep „conjigated dienes“ (str. 41) a chybějící délkové úsečky u mikroskopických obrázků řezů tkání (Fig. 12). Má další připomínka se týká uvádění literárních zdrojů. Jsou paralelně využívány zkratky časopisů a i celé jejich názvy, stránkování citací není jednotné a odkazy na knižní zdroje postrádají podstatné informace, např. chybí vydavatel či editor.

Závěrem této části posudku mohu konstatovat, že zmíněné drobné nedostatky nikterak nesnižují vědeckou hodnotu předkládané práce.

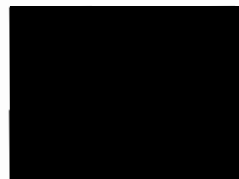
K autorce mám následující dotazy:

1. Jak přesně navozuje D-galaktosamin poškození hepatocytů, uveďte molekulární mechanismus „poškození membrán“.
2. Proč byla při *in vivo* pokusech na modelu poškození hepatocytů indukovaného účinkem D-GalN/LPS použita dávka resveratrolu (na kg) cca 13x nižší než v případě APAP modelu?
3. Nevede použití diethylétheru při euthanasii potkanů k interferencím a následnému zkreslení výsledků pokusů?
4. Byla již některá z použitých modulačních látek klinicky testována?

Závěrem je možno konstatovat, že Mgr. Lea Njeka Wojnarová prokázala jak velmi dobrou orientaci ve studované problematice, tak schopnost vědecké práce, včetně publikace získaných výsledků v impaktovaných mezinárodních časopisech. Je potěšivé, že při řešení studované problematiky byly získány originální výsledky naznačující možné aplikace studovaných modulačních sloučenin.

Předkládanou práci hodnotím jako kvalitní vědeckou studii, která splňuje veškeré požadavky kladené na disertační práce. V souladu ustanovením § 47, odst. 4, zákona č.111/1998 Sb. o vysokých školách uchazečka prokázala schopnost a připravenost k samostatné činnosti v oblasti výzkumu a vývoje. Dále potvrzuji, že práce byla objektivně a kriticky hodnocena a byla shledána jako vyhovující. Proto doporučuji, aby byla disertační práce přijata k obhajobě a aby na základě úspěšné obhajoby byl Mgr. Lea Njeka Wojnarové udělen akademický titul Ph.D.

V Praze, 23. 2. 2022



Prof. RNDr. Petr Hodek, CSc.