

Oponentský posudek disertační práce

Transplantace hepatocytů u akutního selhání jater v experimentu

Autor: MUDr. Eva Koblihová

Studijní program: experimentální chirurgie

Předložená disertační práce je rozdělena do celkem 6 kapitol, vlastní popis práce je obsažen ve 4 kapitolách. Poslední dvě kapitoly obsahují seznam publikací autorky a seznam literatury. Většina textových kapitol obsahuje několik podkapitol různého řádu. Každá kapitola je zpracována velmi pečlivě, členění je logické a obsahově texty jednotlivých kapitol a podkapitol odpovídají svému názvu. Na čtenáře již při prvním čtení udělá velmi dobrý dojem kvalitní zpracování textu po formální stránce. Celý text disertace je psán zcela správně striktně odborným jazykem, v jednoduchých větách, které jsou přesně formulovány. Je užívána velmi dobrá čeština, odborná terminologie je užívána rovněž správně. Tyto rysy jsou klíčové pro dobré pochopení celého textu.

V kapitole nazvané „Úvod“, která má několik podkapitol až do 4. řádu a je psána na celkem 12 stranách, podává autorka stručný, ale výstižný a dostatečný přehled současných znalostí o akutním jaterní selhání. Dotýká se výskytu, příčin (u některých popisuje i známé patogenetické mechanismy vzniku selhání jater).

Cíle práce jsou formulovány jasně, přehledně a srozumitelně.

Nejdůležitější částí je přirozeně vlastní experimentální část popisující ve svých podkapitolách použité metody (včetně statistických), uspořádání experimentu, výsledky. Oceňuji pečlivé zdůvodnění výběru klíčových metod a zvoleného postupu experimentu. Velmi cenná je z mého pohledu diskuze, která ukazuje schopnost autorky kriticky zvážit výsledky svojí práce a rozumně je zasadit do kontextu literárních znalostí.

Ze seznamu publikací se vztahem k disertační práci vyplývají tyto skutečnosti:

- A) Výsledky byly publikovány celkem 2x v časopisech s IF (1,643 a 1,293)
- B) Výsledky byly publikovány celkem 1x v časopisech bez IF

Seznam použité literatury čítá 114 položek. Velká většina citovaných prací byla publikována v posledních 10 letech, takže literaturu lze celkově považovat za aktuální.

K celé práci mám několik drobných, zčásti formálních, poznámek či komentářů:

1. Ve většině textu používá autorka zcela správně pojem „koncentrace“ ve smyslu sérové koncentrace sloučenin jako je bilirubin, albumin apod.. Pouze na několika místech, zejména u albuminu, se píše o „hladině“. Tento termín a jeho užívání v dané souvislosti není správný.
2. Problematika sérové aktivity alaninaminotransferázy (ALT) a aspartátaminotrasferázy (AST). V práci se autorka o těchto parametrech zmiňuje jako o ukazatelích „jaterních funkcí“. Tyto testy nicméně v této souvislosti užívat a interpretovat nelze. Vzhledem ke své biochemické povaze, intracelulární lokalizaci a funkci jsou oba enzymy považovány za senzitivní a specifické markery hepatocelulárního poškození. Naopak za testy do určité míry odrážející skutečné „jaterní funkce“ je považována bilirubinémie, albuminémie a sérová koncentrace amoniaku.

Velmi citlivým ukazatelem jaterní funkcí je i koncentrace koagulačních faktorů. Pro složitost a cenu přímého stanovení koncentrace jednotlivých faktorů se přirozeně v praxi používá Quickův čas, obvykle vyjádřený jako normalizovaný mezinárodní poměr (INR). Další možností jak hodnotit proteosyntetickou funkci jater, a to zejména u rychle se rozvíjejících jaterních poškození, je například sérová koncentrace prealbuminu, který má řádově nižší biologický poločas než albumin.

3. Autorka se v úvodní části zmiňuje o mechanismech rozvoje poškození jater při intoxikaci paracetamolem. Z pohledu prováděných experimentů (viz také dále moje dotazy) by bylo zajímavé rozebrání patogeneze akutního selhání jater v důsledku požití *amanitinu* a *phalloidinu*, tj. otravy *Amanitou phalloides*. Amanitin a jeho metabolity prodělávají enterohepatální oběh a játra jsou tak opakovaně po jeho použití exponována toxické substancí. Jedná se tedy o mechanismus podobný opakovanému podání TAA, což je předmětem autorčina výzkumu.

Autorce si dovoluji položit následující dotazy:

1. Jak jsem zmínil výše sérové aktivity ALT/AST jsou markerem hepatocelulárního poškození spíše než jaterních funkcí. Z tohoto pohledu se mi jeví jako dobře vysvětlitelné Vaše zjištění, že vyšší vzestup ALT/AST u kmene Lewis, který jste v experimentu prokázala, je asociován s lepším přežitím zvířat. Z klinických prací v humánní medicíně je totiž také známo, že rychlejší a masivnější zánik hepatocytů je asociován s významně lepším spontánním přežitím nemocných. Fulminantní selhání jater má u člověka lepší prognózu než akutní či subakutní v definici O'Gradyho.

Naopak velmi dobrým ukazatelem jaterní funkce je hyperbilirubinémie. Proto také rozumím Vašemu závěru, že pozorovaný pokles hyperbilirubinémie je odrazem dobré funkce transplantovaných buněk. Sérový bilirubin je transplantovanými funkčními hepatocyty standardně vychytáván a metabolizován, takže díky přítomnosti funkčních transplantovaných hepatocytů dochází k poklesu původní hyperbilirubinémie vzniklé toxickým působením dané substance, která takto indukovala jaterní selhání.

Nicméně tento koncept pro ALT/AST neplatí. Transplantovaný (nebo *in vivo* regenerovaný hepatocyt) se na biodegradaci ani jednoho z těchto enzymů nepodílí. Degradace je záležitostí jiných buněčných kompartmentů.

Otázka: Pokud se podíváte na Vaše zjištění z tohoto pohledu, existuje nějaké vysvětlení popsaného poklesu sérové aktivity ALT/AST? Je možné, že spolu s podanou suspenzí hepatocytů dochází k převodu i jiných buněčných elementů, které by se na biodegradaci ALT/AST mohly podílet? Nebo dochází k aktivaci degradačních mechanismů jiným způsobem v rámci indukovaného jaterního selhání?

2. Velmi oceňuji Vaše vysvětlení, proč transplantované buňky nefungují u zdravých jater. Rozhodující je charakteristika mikroprostředí, které zůstává v játrech po rozsáhlé, můžeme říci i kompletní hepatonekróze. Zde je opět souvislost s výše zmíněným lepším přežíváním

fulminantního selhání jater proti akutnímu a subakutnímu. Pokud hepatonekróza vznikne po jediném podání hepatotoxické látky (paracetamol, TAA), je mnohem větší šance, že nedojde k rozvoji na hepatocelulární nekrózu navazujících dějů vedoucích také k destrukci intercelulární matrix. Ta za daných okolností funguje jako kostra pro nově regenerované (či transplantované) hepatocyty. V případě, že je inzult opakovaný (amaninitin, Vaše opakované podání TAA v určitém časovém intervalu) dojde nejenom k prohloubení rozsahu hepatocelulárního poškození, ale postupem času se rozvíjí i postižení původní intercelulární matrix, která přestává existovat a tím dochází ke ztrátě mikroprostředí nutného pro zachování viability hepatocytů. Tato úvaha mě přivádí k hypotéze: Pokud bychom uměli stav zachovalosti mikroprostřední charakterizovat, mohli bychom do značné míry predikovat klinický vývoj akutního selhání se všemi důsledky (indikace k transplantaci, arteficiální náhradě atd.).

Otázka: jsou dostupné nějaké informace o tom, jakým způsobem lze existenci, zachování, vhodného mikroprostředí monitorovat v experimentu nebo v klinice?

3. I z Vaší experimentální práce vyplývá, že zdravá játra nejsou vhodným prostředím pro udržení viability transplantovaných hepatocytů. Což mě přivádí k následující hypotéze: pokud bychom uměli nasimulovat nebo indukovat mikroprostřední vhodné pro udržení viability transplantaci hepatocytů i ve zdravých játrech, mohli bychom stimulovat jaterní regeneraci či využít techniku transplantace hepatocytů u pacientů s jaterními resekcemi. Tento typ výkonu je velmi často limitován nedostatečným objemem remnantu jater po resekci. Dosud používané techniky k řešení problému (embolizace portální žíly apod.) mají řadu limitací svého použití v praxi.

Otázka: Máte nějakou informaci či dokonce zkušenost s tímto tématem?

Závěrem s potěšením konstatuji, že předložená práce MUDr. Evy Koblihové splňuje veškeré parametry disertační práce a proto doporučuji práci v předložené podobě přijmout a na jejím základě udělit kandidátce vědecký titul Ph.D.

V praze dne 26. dubna 2022

Prof. MUDr. Petr Urbánek, CSc.

