

Posudek oponenta habilitační práce

Universita Karlova	1.lékařská fakulta
Obor řízení	Lékařská chemie a biochemie
Uchazečka	MUDr. Lucie Muchová, Ph.D.
Pracoviště uchazeče	Ústav lékařské chemie a laboratorní diagnostiky 1. LF UK a VFN
Habilitační práce (název)	Patofyziologický význam katabolické dráhy hemu
Oponent	Prof. MUDr. Jiří Ehrmann, CSc.
Pracoviště oponenta	II. interní klinika-gastro-enterologická a hepatologická LF UP a FN Olomouc

Text posudku

Rozsah práce a dokumentace

Předložená habilitační práce je napsaná na 77 stranách. Nicméně, vlastní výsledky práce jsou obsahem 23 in extenso do práce vložených publikací s IF, v nichž je MUDr. Muchová 3krát první autorkou a 10krát autorkou druhou a 10 krát třetí či další. Celé dílo je tak napsaná na téměř 300 stranách. Úvod do problematiky je na stranách 4 – 30. Cíle a výsledky jsou obsahem vložených publikací s 15ti stránkový komentářem. Literárních odkazů (mimo ty, které jsou součástí vložených publikací) je 235. Jsou starší i recentní a odrážejí vývoj výzkumu hemu novým pohledem, tedy nejen jeho biosyntézu ale především jeho degradační dráhy a její role v regulaci řady fyziologických a patofyziologických procesů. To je to nové, co habilitační práce prezentuje a vlastními výsledky obohacuje. Naši autoři mimo autocitace citovaní prakticky nejsou. I to ukazuje na originalitu výsledků v našem teoretickém i klinickém medicínském prostředí. Celá práce mimo vysokou odbornou úroveň, výsledky jsou publikovány v 23 časopisech s IF, má rovněž vysokou edukační hodnotu a i kliničtí pracovníci by s novými trendy výzkumu měli být seznámeni. V práci je 5 obrázků vhodně doplňujících text. Ten je psaný kultivovaným a čtivým jazykem, a to i přes jeho odbornou náročnost. Habilitační práce MUDr. Machové ale i celého pracoviště je výsledkem mnohaletého výzkumného zaměření na novou problematiku s u nás jedinečnými výstupy.

Cíle práce

Jsou obecné a specifické. Těmi obecnými je:

a/ charakterizovat patofyziologický význam katabolické dráhy hemu, především důsledky farmakologické regulace hemoxygenázy (HMOX) *in vivo* a *in vitro*.

b/ objasnit role katabolické dráhy hemu v patogenese jaterních onemocnění

c/ zhodnotit úlohy produktů metabolismu hemu (bilirubin a CO) v biologických stavech.

Teoretické předpoklady pro specifické cíle jsou rozvedeny v úvodu habilitační práce tj. hem a jeho syntéza a degradace; HMOX 1 a 2; oxid uhelnatý; bilirubinu – jeho struktury, transport v krvi, konjugace, sekrece do žluči, střevní metabolismus, toxické a cytoprotektivní účinky; klinický význam produktů katabolické dráhy hemu

s potenciálním využitím v terapii, a to jak využít molekul uvolňující oxid dusný, tak látek zvyšujících systémové koncentrace bilirubinu.

Aktuálnost tématu

Při vyslovení termínu bilirubin má většina i odborné lékařské veřejnosti na mysli žloutenku – ikterus, tedy žluté zbarvení tkání, především kůže, sliznic a sklér v důsledku zvýšené koncentrace bilirubinu v séru. Diferenciální diagnostika ikteru patří v medicíně mezi nejobtížnější, a proto je tímto směrem, pokud mluvíme o bilirubinu, orientováno pregraduální a postgraduální vzdělávání v medicíně. Z historického hlediska může být pro nás pozoruhodné, že to byl E. Talafant, biochemik LF v Brně, který nezávisle na dalších, tj. R. Schmidovi a B. Billingové, popsal/li v roce 1956 konjugaci bilirubinu s kyselinou glukuronovou. Objasnili tak princip van den Berghova objevu (1916) přímého a nepřímého bilirubinu (dnes konjugovaného a nekonjugovaného bilirubinu). Bez většího klinického povšimnutí však byly publikované z laboratoře zmíněného R. Schmida (R. Tenhunen 1968) práce týkající se degradace hemu (1968). Mělo se zato, že hem – katabolit porfyrinu je přes bilirubin z těla vyloučen jako látka již nepotřebná a to přesto, že H. Fischer nazval porfyriny zázrakem přírody způsobující, že krev je červená a zeleň listová zelená. Poznatky o antioxidačním účinku bilirubinu (R. Stoker 1986) pak otevřeli nový pohled na patofyziologický význam katabolické dráhy hemu, takže nejde jen o teoretický výzkum eliminace nepotřebné látky z těla, ale zcela nové pole výzkumu. Z tohoto pohledu je téma habilitační práce velmi aktuální a u nás, pokud to může oponent posoudit jedinečně.

Metodika a kvalita dosažených výsledků a jejich rozbor v porovnání se současným stavem znalostí

Předmětem všech 23 do práce inkorporovaných publikací je odpovědět na hlavní cíle habilitace:

a/ důsledky regulace exprese (HMOX 1) *in vitro* a *in vivo* jsou řešeny v 7 publikacích. Jde o objasnění regulace exprese HMOX 1 statiny, farmaky široce užívanými v léčbě dyslipidemií. Jejich indukční efekt na expresi HMOX 1 může zčásti vysvětlit jejich antioxidační a vasoprotektivní účinek. Autorka zkoumala účinek statinu na expresi HMOX 1 na tkáňových kulturách a *in vivo* na myších. Prokázala nejen mírný nárůst bilirubinu a CO ale i zvýšenou tkáňovou a systémovou antioxidační kapacitu. V této souvislosti byla studovaná otázka zvýšené hladiny bilirubinu u osob léčených statiny. Není jednoznačně zodpovězena. V předložené studii byl na souboru 54 nemocných prokázán mírný ale statisticky nevýznamný jeho vzestup. Nicméně, v podobné zahraniční studii na soubor 514 osob byla prokázána elevace bilirubinu o 7 % a zde je třeba připomenout práci z autorčina pracoviště, že již zvýšení bilirubinu o 1 $\mu\text{mol/l}$ snižuje riziko aterosklerózy o 6 %. Další publikace zahrnutá do habilitační práce se týká antiproliferačního, tedy jiného z pleomorfních účinku statinu. V experimentech na několika liniích karcinomu pankreatu byl sice v práci prokázán antiproliferační účinek statinů, nicméně účinek byl v nezávislosti na HMOX. Inhibiční efekt exprese HMOX byl předmětem studie, ve spolupráci s Jagellonskou universitou. Autoři popsali mechanismus inhibice exprese HMOX kyselinou valproovou, užívaného antiepileptika. Role počtu repetitivních GT mikrosatelitů v promotoru HMOX 1 byla studovaná na endoteliálních tkáních. Autoři potvrdili, že počet GT repetitivních ovlivňuje aktivitu HMOX 1 a její cytoprotektivní, promotogenní a protizánětlivou funkci v endotelu. Exprese HMOX 1 může být také indukovaná některými onkogeny. Na modelu chemicky indukovaného dlaždicového karcinomu kůže autoři zjistili, že HMOX 1 může oddálit ve zdravé kůži vznik tumoru, ale pokud vznikl, urychlí jeho progresi.

b/ role katabolické dráhy hemu v patogeneze jaterních onemocnění. Těmto otázkám je věnováno 6 publikací. Nejvýznamnější se týkají úlohy HMOX, bilirubinu a CO, které se

podílejí různým mechanismem na jaterních funkcích a syntéze a exkreci žlučových kyselin. Ty jsou ve vysokých koncentracích považovány za hlavní příčinu cholestatického poškození jater. Role prooxidačního účinku žlučových kyselin a antioxidačního účinku bilirubinu jsou předmětem experimentální práce na modelu obstrukční cholestázy u potkanů. Autorka habilitace prokázala, že stupeň jaterního poškození u cholestázy závisí na poměru žlučových kyselin a bilirubinu. Další autorčina práce se týká anticholestatického účinku HMOX 1 u potkanů s estrogenem vyvolanou cholestázou. Indukce HMOX 1 u nich zvýšila tok žluči. Tento efekt by se mohl uplatnit při léčbě cholestázy těhotných. Další práce se týkají gangliosidů, endotoxinové bakteriální sepse a protektivní antioxidační role HMOX. Poslední práce této kategorie se týká vztahu katabolické dráhy hemu a protektivního účinku kurkuminu, který je induktor HMOX 1 a je považován za hepatoprotektivum s antioxidačním, protizánětlivým, cytoprotektivním ale i antifibrotickým účinkem. Na modelu jaterního selhání u potkanů bylo prokázáno hepatoprotektivní působení kurkuminu (ALT, AST, bilirubin) spojené s modulací dráhy HMOX 1/NO.

c/ role katabolické dráhy hemu v biologických systémech je předmětem dalších 11 publikací. Kvůli citlivosti molekuly bilirubinu na zevní vlivy autoři vyvinuly metodu pro kvantifikaci nekonjugovaného bilirubinu. V další práci sledovali metabolismus bilirubinu v tkáních během stresu. Zjistili, že indukce HMOX 1 a systémová hyperbilirubinémie vedou k akumulaci bilirubinu ve tkáních, které jsou tak chráněny před peroxidací. Jiná práce se týká biopyrinů. Byla pozorovaná negativní korelace mezi jejich vylučováním do moči a hladinou bilirubinu v krvi u Gilbertova sy. Autorka v jiné práci prokázala negativní korelaci mezi sérovým bilirubinem a klinickou manifestací systémového lupusu (259 nemocných). Další práce se týkají střevního metabolismem bilirubinu (kmen *Clostridium perfringens*) a ovlivnění jeho extrahepatální cirkulace, účinkem zinečných solí na modelu kongenitálně hyperbilirubinemických potkanů. Biologické účinky tetrapyrrolických sloučenin z jedlých řas (podobající se bilirubinu) byly předmětem studie k ověření hypotézy, že ateroprotektivní a protinádorové účinky produktů katabolické dráhy hemu mohou být podobny těm z řas. Poslední práce se týká produkce, distribuce a biologického účinku CO coby produktu katabolické dráhy hemu. Praktické využití naráží na jeho toxicitu ve vyšších dávkách. Autoři ve spolupráci se skupinou prof. Klány z MU v Brně vyvinuli molekulu s minimálně toxickým uvolňováním CO s možností ovlivnění jeho uvolňování intenzitou infračerveného světla.

Vyhodnocení použitých metod a postupů a zhodnocení kvality práce:

jde o nadstandardně kvalitní habilitační práci. Množství otázek souvisejících s katabolickou dráhou hemu je neobvykle široký a nabízí nový pohled na tradiční téma medicíny „bilirubin“. Výsledky studií jsou u nás originální. Všechny jsou publikovány v časopisech s IF a habilitační práce představuje jejich zobecnění. Doplnuje mosaiku poznatků na novém poli výzkumu zcela akceptovatelnou zahraničními výzkumnými pracovišti. Habilitační práce má vysokou edukační úroveň. Oponent by chtěl zvlášť zdůraznit naléhavost aby teoretické části a ale i praktické výstupy práce byly inkorporovány do pregraduální a postgraduální výuky v medicíně.

Dotazy oponenta k obhajobě habilitační práce:

připomínky technické ani věcné nemám. Mám na autorku tyto dotazy.

- a. Z klinické praxe víme, že hodnoty tzv. jaterních testů tj. ALT, AST, GGT a ALP nesouvisí přísně s hodnotami bilirubinu. Lze to vysvětlit také pohledem indukce ev. inhibice HMOX ?
- b. Jedním z produktů katabolismu hemu je železo. Jakou roli v katabolismu hraje s ohledem na další produkty katabolismu hemu tedy bilirubin a CO?
- c. Jaký má autorka názor na vztah katabolické dráhy hemu a NAFLD resp. AFLD.

Závěr:

Habilitační práce MUDr. Lucie Muchové, Ph.D. „Patofyziologický význam katabolické dráhy hemu“ nadstandardně *splňuje* požadavky kladené na habilitační práce v oboru lékařská chemie a biochemie.

V Olomouci dne 27. 8. 2018

prof. MUDr. Jiří Ehrmann, CSc.

