

Oponentní posudek

k disertační práci v doktorském studijním programu Biochemie a patobiochemie na 1. LF UK

Mgr. Nikola Capková: Studium bilirubinu a jeho oxidačních produktů

Předložená disertační práce je založena na čtyřech publikacích, jichž je doktorandka první autorkou či spoluautorkou a které byly všechny zveřejněny v zahraničních impaktovaných časopisech. Autorka k těmto čtyřem publikacím doplňuje společné kapitoly dle zažitých zvyklostí.

Disertační práce je psaná v anglickém jazyce. Společná část má 68 stran a zahrnuje abstrakt, úvod, cíle, použité metody, výsledky, diskusi, souhrn a seznam zkratk. Tato část obsahuje 11 obrázků (všechny v úvodu), tabulky práce neobsahuje žádné. Následují přílohy, které jsou tvořeny zmíněnými čtyřmi publikacemi.

Všechny čtyři publikované články, o které se disertace opírá, byly uveřejněny v roce 2021. Jde o původní sdělení z oblasti základního výzkumu. Mgr. Capková je sdílenou první autorkou článku, který v disertaci uvádí jako čtvrtý v pořadí, The Effect of Bilirubin and Lumirubin on the Differentiation of Human Pluripotent Cell-Derived Neural Stem Cells. Byl publikován v časopise Antioxidants skupiny MDPI (IF 7,675). Dle Web of Science byla tato práce dosud 4x citována. Dále je spoluautorkou dalších tří článků publikovaných v časopisech Pediatric Research (IF 3,953, zatím nebyl citován), International Journal of Molecular Sciences (IF 6,208, dosud 12 citací) a Frontiers in Pharmacology (IF 5,988, dosud 7 citací).

Disertace se věnuje bilirubinu a sloučeninám, které z něj vznikají při fototerapii modrozeleným světlem u novorozenců s novorozeneckou žloutenkou. Jde o aktuální a významné téma, neboť novorozenecká žloutenka je poměrně častý stav vyžadující léčbu a fototerapie je základní léčebnou metodou. Účinek fototerapie na snížení hyperbilirubinémie je dlouho známý, málo se však ví o produktech, které při ní z bilirubinu vznikají, jejich dalším metabolismu či účincích na organismus. Právě těmito tématy se předložená disertační práce zabývá, čímž jednoznačně přispívá k poznání biochemických a patobiochemických souvislostí fototerapie u novorozenců.

Všechny čtyři články, na nichž je disertace postavena, přinášejí nové vědecké poznatky. Využívají širokého spektra moderních laboratorních metod a experimentálních modelů, od pokusů in vitro přes práci s několika liniemi kultivovaných buněk až po experimenty prováděné na zvířatech. Mezi laboratorní techniky použité v práci patří LC-MS/MS, GC-MS, RT-qPCR, western blot, průtoková cytometrie, fluorescenční mikroskopie, imunochemické techniky a další. Mgr. Capková bohužel v disertační práci explicitně neuvádí, které části výzkumu prováděla sama a v jaké míře se podíleli další spolupracovníci. Oponent tak má k dispozici jen strohé deklarace autorských podílů z jednotlivých publikací. Jako nevýraznější je v tomto směru deklarován přínos doktorandky pro čtvrtý článek, kde se podílela na metodologii, validaci a vlastních experimentech. Tato práce byla založena na sledování diferenciac buněk pěstovaných v buněčných kulturách a využívala např. fluorescenční mikroskopii, RT-qPCR, western blot, kometový test, kolorimetrické metody, průtokovou cytometrii a další. V případě dalších metod je přinejmenším zřejmé, že doktorandka dokáže pracovat s daty pomocí nich získanými, dokáže je hodnotit a dále zpracovávat. Přesto doporučuji, aby podrobnější informace o podílu Mgr. Capkové na jednotlivých výsledcích byla uvedena v rámci obhajoby.

O adekvátnosti použitých metod a správnosti hodnocení výsledků i vyvozovaných závěrů svědčí, že všechny čtyři články prošly kompletním recenzním řízením v uznávaných časopisech. Z tohoto

hlediska doktorandka jednoznačně prokazuje schopnost vědecké práce, a to jak vlastního výzkumu, tak publikace jeho výsledků.

Ve společném úvodu disertační práce se autorka zabývá biochemií hemu a bilirubinu a patobiochemií novorozenecké žloutenky. Následuje čtivá a z hlediska celé disertace klíčová část věnovaná fotooxidativním produktům bilirubinu. Kvalita zpracování úvodu je ale bohužel nevyrovnaná. Čtivé a přehledné pasáže střídají úseky textu, které působí jako psané ve spěchu, obsahují velké množství jazykových chyb a typografická pochybení (např. chybějící indexy). Na některých místech je text až obtížně srozumitelný. Úvod bohužel také nepokrývá celou oblast, kterou autorka studuje, takže o mnoha výchozích konceptech, popisu současného stavu poznání a podkladu zkoumaných otázek se čtenář dozvídá až v diskusi. To je škoda, neboť práce se tím stává méně přehlednou a orientace v ní je obtížná.

Část věnovaná výsledkům práce je velmi stručná. Autorka zde uvádí jen seznam čtyř publikací, na nichž je disertace postavená, bez jakéhokoli popisu hlavních zjištění. Ta jsou sice uvedena dále v diskusi, i tak ale absence alespoň základních výsledků v této kapitole působí přinejmenším neobvykle a znesnadňuje orientaci v textu.

O diskusi lze z formálního hlediska říci totéž co o úvodu – kvalita textu je nevyrovnaná, střídají se zajímavé čtivé pasáže s textem na hraně srozumitelnosti. I v tomto případě text obsahuje větší množství jazykových chyb. Diskuse je členěná podle publikací, na nichž je disertace založena. Autorka v ní namnoze fakticky doplňuje úvod, rozebírá výsledky a provádí jejich vlastní diskusi v kontextu literatury a zjištění jiných autorů. Je škoda, že v této části (či spíše v kapitole věnované výsledkům) zcela chybí obrázky a grafy, autorka jen odkazuje na obrazovou dokumentaci v přílohách. Je to škoda tím spíše, že publikované výsledky jsou opravdu zajímavé a čtenáře se zájmem o obor potěší. Nemluvě o tom, že již první článek je ukázkou, jak zajímavý, aktuální a vědecky významný a publikovatelný může být i negativní výsledek. Autoři této publikace se zabývali otázkou, zda je vztah mezi vylučováním nekonjugovaného bilirubinu a cholesterolu transportem přes střevní sliznici (transintestinální exkreci). Obě látky se totiž tímto způsobem vylučují u modelového organismu s nekonjugovanou hyperbilirubinemií (Gunnův laboratorní potkan). Vylučování cholesterolu transintestinální sekrecí lze farmakologicky ovlivnit a bližší poznání souvislostí mezi vylučováním obou látek by tak mohlo přinést nové terapeutické přístupy pro léčbu nekonjugovaných hyperbilirubinemií. Autoři nicméně přesvědčivě ukazují, že mezi transintestinální exkrecí cholesterolu a nekonjugovaného bilirubinu není jednoduchý kvantitativní vztah.

Ve druhém článku autoři zkoumají, jaký účinek mají různé intracelulární koncentrace bilirubinu na produkci a účinek reaktivních forem kyslíku v několika typech buněk. Bilirubin je dobře známý scavenger ROS, avšak ve vyšších intracelulárních koncentracích je toxický, pravděpodobně i v důsledku prooxidativních účinků. Práce se zabývá tím, při jakých koncentracích se bilirubin chová jako antioxidant a při jakých jako prooxidant a jasně demonstruje rozdíly mezi různými typy buněk.

S oxidativním stresem a bilirubinem souvisí i třetí práce. Věnuje se účinkům bilirubinu a lumirubinu, tedy jednoho z produktů bilirubinu po fototerapii, na oxidativní stres a metabolickou aktivitu kultivovaných buněk a na některé děje in vitro. Popisuje řadu účinků bilirubinu a, zjednodušeně řečeno, dokládá, že většina jeho toxických účinků se fotooxidací na lumirubin snižuje.

V posledním článku autorka zkoumá účinky bilirubinu a lumirubinu na diferenciaci neurálních kmenových buněk. I v tomto případě získaná data dokládají vyšší toxicitu bilirubinu než lumirubinu. Práce popisuje řadu morfologických a biochemických účinků obou látek na kultivované neurální kmenové buňky.

Úvod a diskuse předložené disertační práce se opírají asi o 210 citací, z nichž většina je z let 2010-2020, nejnovější z r. 2023, nejstarší z r. 1938. V závěru disertace je seznam zkratk, který bohužel není úplný, a naopak obsahuje i položky, jež nejsou zkratkami. Jak již bylo uvedeno, za textem disertace následují čtyři přílohy tvořené uvedenými čtyřmi autorčinými publikacemi. Přílohy jsou bohužel vloženy v nízké technické kvalitě, což znesnadňuje práci s nimi.

I přes všechny uvedené výhrady je po podrobném prostudování disertační práce třeba konstatovat, že **autorka jednoznačně prokázala schopnost samostatné tvůrčí vědecké činnosti. Prokázala schopnost výzkumné práce v oblastech základního výzkumu s přesahem do biomedicínských aplikací, demonstrovala znalost celé řady laboratorních metod a postupů, zpracování a interpretace výsledků a dokázala opakovaně publikovat v mezinárodních recenzovaných časopisech s IF. Jednoznačně také prokázala schopnost spolupráce ve vědeckém výzkumném týmu. Disertační práce může být i přes uvedené nedostatky předložena k veřejné obhajobě a při splnění všech dalších požadavků může být uchazečce udělen titul Ph.D.**

Pro obhajobu disertační práce si dovoluji autorce položit následující otázky:

1. Ve své práci podrobně zkoumáte účinky bilirubinu a lumirubinu na diferenciaci neurálních kmenových buněk (NSC). In vivo dochází k vývoji CNS, během něž se tyto buňky diferencují, převážně v časnějších fázích embryonálního vývoje, zatímco k hyperbilirubinémii dochází až v době kolem porodu a stejně tak lumirubin vzniká až post partum. Co je známo o úloze a diferenciaci NSC u novorozenců? Do jaké míry lze pozorování in vitro extendovat na situace relevantní in vivo v době kolem porodu?
2. Ve své práci diskutuje účinky bilirubinu a jeho derivátů na expresi prozánětlivých cytokinů. Co je známo o účinku prozánětlivých cytokinů v mozku novorozence?

V Praze 11. dubna 2023

MUDr. Martin Vejražka, Ph.D.

Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky

1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy