

## Oponentský posudek

Dizertační práce:

### **Bioindikátory zánětu, oxidačního a nitračního stresu u potkana kmene Wistar po celotělovém a lokálním ozáření plic.**

Autor práce: **Mgr. Andrea Nagy**, Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Hradci Králové

Oponent: prof. RNDr. Rudolf Štětina, CSc., Fakulta vojenského zdravotnictví, Hradec Králové.

Předložená práce má celkem 128 stran textu včetně 23 grafů, 42 tabulek a 12 obrázků. Je doplněna o kopie dvou článků publikovaných ve vědeckých časopisech. V obou případech je autorka této práce také první autorkou článků.

Cílem dizertační práce bylo

-zhodnotit možnosti využití koncentrace oxidu dusnatého jako vhodného markeru celotělové expozice organismu ionizujícím záření a využít tohoto potenciálního markeru pro predikci rozvoje radiační pneumonitidy.

-vyhodnotit radioprotektivní účinky vybraných látek s antioxidačními vlastnostmi a inhibitorů NOS proti následkům celotělového ozáření. Byly testovány tyto látky : L-NAME, aminoguanidin, acetyl-L-karnitin. Dalším cílem bylo vyhodnotit a posoudit radioprotektivní účinky těchto látek proti následkům lokálního ozáření hrudníku.

Pro vyhodnocení těchto efektů radiace a ochrany proti ní autorka využila řadu moderních a náročných biochemických metod. Především, byla měřena koncentrace NO ve vydechovaném vzduchu u potkanů o ozáření. Metodou HPLC byla stanovena koncentrace malondialdehydu a dále koncentrace dusičnanů/dusitanů v plasmě.

Pomocí metody RT-PCR a také pomocí western blotingu byla stanovena genová exprese NO syntázy v plicích . Výsledky těchto biochemických analýz byly konfrontovány s obrazem histologických vyšetření sledovaných tkání plic.

Vhodnost použití sledovaných biomarkerů ukázaly první pokusy, když ihned po ozáření a za 6 hodin byly nalezeny významně snížené hodnoty vydechování NO . Toto snížení však nebylo nalezeno u zvířat, jimž byl aplikován lipopolysacharid (LPS). U těchto zvířat naopak došlo až padesátinásobnému zvýšení hodnot koncentrace vydechovaného NO oproti kontrolám v uvedeném čase . Těmto zjištěním odpovídala i silně zvýšená exprese iNOS v oplícní tkáni za 6 hodin po aplikaci LPS.

Ve studiích sledujících přežívání potkanů po ozáření se ukázalo, že látky L-NAME a ALC významně zlepšily přežívání ozářených potkanů.

Celotělové ozáření 8 Gy vyvolalo zvýšení koncentrace MDA v plasmě 1,8 krát. Na toto zvýšení měl vliv pouze ALC. Podobně po ozáření 8 Gy došlo k e zvýšení NOx 1,9x a na toto zvýšení měl vliv pouze L-NAME.

Podobně tyto parametry byly sledovány též při lokálním ozáření. Šlo o sledování změn ve fázi rozvoje radiační pneumonitidy po lokálním ozáření potkanů. Zde se neukázaly žádné změny ve vydechovaném NO v průběhu celých 8 týdnů po iradiaci. Takže změny ve

vydechovaném NO se nejeví jako vhodný biomarker rozvoje iradiační pneumonitidy u potkana. Nárůst MDA za 7 týdnů však svědčí o zvýšení oxidačního stresu v tomto intervalu. V plicní tkáni bylo zjištěno statisticky významné zvýšení exprese genů pro kationické aminokyseliny (CAT) CAT1, CAT2, CAT3. Histologicky bylo prokázáno, že za 7 týdnů se statisticky významně snižuje procentuální vzdušnost plic. Zároveň se zvýšil výskyt neutrofilů v plicní tkáni, což ukazuje na vnik radiační pneumonitidy.

Závěrem lze říci, že práce přináší nové poznatky o účincích ionizujícího záření jak při celotělovém, tak i lokálním ozáření hrudníku potkana, se zaměřením na metabolickou dráhu arginin-oxid dusnatý a markery oxidačního nitračního stresu, a to jednak ve včasné fázi do 72 hodin a jednak ve fázi radiační pneumonitidy (7 týdnů).

Výsledky získané pomocí neinvazivní techniky stanovení NO vylučují využití těchto markerů v biodozimetrii u potkanů, neboť tyto parametry se neliší od kontrolních hodnot ani v časné fázi po celotělovém ozáření (do 24 hodin), ani při sledování po dobu 7 týdnů po ozáření oblasti hrudníku. Výsledky ukázaly, že vydechovaný NO tedy nelze použít jako marker pro predikci radiační pneumonitidy.

Látka L-NAME po jednorázové aplikaci a ACL podávaný před ozáření působí radioprotektivně. Tyto látky podstatně zvyšují přežití potkanů sledované po dobu 30 dní po celotělovém ozáření dávkou 8 Gy.

ALC látka snižuje infiltrát v plicní tkáni a zvyšuje vzdušnost plic v 7. týdnu po ozáření. Zároveň ALC snižuje expresi arginázy 1 a transportérů CAT1 a CAT3, což by mohlo naznačovat, že ALC snižuje zánětlivou reakci.

Výsledky práce jsou publikovány v časopisech s náročným recenzním řízením, takže na práci lze jen těžko hledat nějaké nedostatky. Po věcné stránce nemám k práci připomínky. Vědecká úroveň práce je vysoká a splňuje nároky předepsané pro udělení hodnosti Ph.D. Práce má dobrou formální úroveň, přesto se zde vyskytují některé nepřesné výrazy, jako na str. 19 „kinázy na STAT proteinech, které pak po vstupu do jádra indukují tvorbu odpovídajících genů“.

Předložená disertační práce obsahuje výsledky publikované v prestižních mezinárodních vědeckých časopisech, což jasně dokládá jejich kvalitu a význam pro obor radiační biologie. Autorka zvládla velice náročné experimentální metody jako stanovení NO, zejména pak velice oceňuji sledování exprese genů souvisejících s radiační i odezvou pomocí metod RT-PCR a western blotting. Autorka prokázala schopnost kriticky posoudit získané výsledky v kontextu s nejnovějšími poznatky o a funkci studovaných genů a jejich roli v odezvě na radiaci. Prokázala také schopnost samostatně řešit náročné vědecké problémy a zároveň cíleně spolupracovat v rámci řešení vědeckého projektu. Proto doporučuji předložit uvedenou práci Mgr. Andrey Nagy jako podklad pro řízení k udělení titulu Ph.D. podle platných předpisů.

V Hradci Králové dne 2.4.2013

prof. RNDr. Rudolf Štětina, CSc.