



V Praze dne 9. 1. 2020

Oponentský posudek na dizertační práci Ing. Pavla Abbafyho „Úloha oxidu dusnatého (NO) během embryonálního hojení a regenerace“

Předložená dizertační práce je založená na prvoautorské publikaci Abbafy et al. (2019), The role of nitric oxide during embryonic wound healing publikované v BMC Genomics (IF = 3,730). Některé výsledky, stanovení exprese proteinu jun po zablokování produkce NO v průběhu vývoje drápatky vodní, pochází z druhé publikace, Tomankova et al. (2017), The role of nitric oxide during embryonic epidermis development of *Xenopus laevis* otištěné v Biology Open (IF = 1,962). V dizertační práci jsou pak uváděny další čtyři publikace, z toho dvě under review, které s tématem souvisí metodicky (RNA sekvenace na úrovni jednotlivých buněk).

V literární rešerši autor popisuje dva základní způsoby hojení rány, a to jizvou což je typické pro dospělé a bez jizvy u embryí a časných pulců. V další části rozebírá signální dráhy a molekuly, které jsou pro proces hojení klíčové. Jedná se hlavně o volné kyslíkové radikály (ROS), vápník, ATP a gasotransmitery jako oxid uhelnatý (CO), sirovodík (H₂S) a oxid dusnatý (NO). Posledně jmenované molekule je pak věnován samostatný oddíl, kde se autor zabývá vlivem NO na regulaci fyziologického a patofyziologického hojení. Velice zajímavá je kapitola, kde autor porovnává hojení s nádorovým procesem z pohledu role oxidu dusnatého. Poslední část literárního úvodu je pak věnována modelovému organismu drápatce vodní, na které byly provedeny veškeré experimenty.

Hlavním cílem dizertační práce bylo studium produkce oxidu dusnatého v průběhu embryonálního vývoje drápatky v souvislosti s poraněním. Důležitost tohoto gasotransmiteru v procesu hojení byla testována na embryích s akutně (inhibitory nitric oxid syntáz) či chronicky (downregulace nitric oxid syntáz pomocí morpholino oligonukleotidů) zablokovanou produkcí oxidu dusnatého. Dalším bodem pak bylo sledování rozdílů v genové expresi u kontrolních a poraněných embryí a pulců včetně optimalizace metody RNA seq na úrovni jednotlivých buněk.

Kapitola Materiál a metody je sepsaná velmi přehledně a zevrubně a umožňuje čtenáři se velmi dobře orientovat v použitých metodách a hlavně provedené experimenty zopakovat či na ně navázat. Výsledky lze rozdělit do dvou částí. První je zaměřená na hojení z pohledu



**PŘÍRODOVĚDECKÁ
FAKULTA**
Univerzita Karlova

produkce oxidu dusnatého u časných embryí (stádium 26) a druhá na regeneraci po amputaci ocasní části (stádium 41). V obou případech pak byla provedena analýza genové exprese na úrovni jednotlivých buněk. Získané poznatky jsou dle mého názoru zásadního charakteru, ukazují, že oxid dusnatý je nepostradatelný v procesu hojení a regenerace a to jak u pulců ve stádiu 41, tak hlavně u časných embryí ve stádiu 26. Takto časná embrya nemají ještě vyvinutý imunitní systém, který je dlouhodobě považován za hlavního producenta oxidu dusnatého (makrofágy). Tento gasotransmitter má tedy i další producenty nezávislé na imunitním systému a jeho role je tak složitější, než se dosud myslelo.

Kapitola diskuze je víceméně zaměřená na prvoautorskou publikaci a je rozdělená na vliv oxidu dusnatého na jednotlivé fáze procesu hojení či regenerace (Hemostáze, proliferace, zánět a remodelace). Poslední část kapitoly je věnován vlivu oxidu dusnatého na proces hojení. V závěru dizertační práce autor rozebírá jednotlivé vytýčené cíle s ohledem na dosažené výsledky.

Po formální stránce mám k práci poznámku, a to, že i když obrázky pocházejí z prvoautorského článku, měly by být řádně citovány, což se nestalo. Naopak obrazová dokumentace z publikace Tomankova et al. (2018) je citována podle pravidel. Tento prohrěšek však nijak nesnižuje nespornou kvalitu dizertační práce a rád jí hodnotím velmi kladně a doporučuji udělení titulu PhD za jméno.

Otázky oponenta:

1. Autor použil k vyřazení NOS dvě morpholino oligonukleotidy. Produkci oxidu dusnatého ale zajišťují tři enzymy (iNOS, nNOS a eNOS). Proč autor nevyřadil z funkce všechny tři proteiny, ale pouze dva?
2. Na jak velkou vzdálenost může NO působit jako gasotransmitter? Bylo by možné o něm uvažovat jako účinném faktoru, který by byl rozváděný krví a působil tak i na větší vzdálenost v rámci hojení (remote control princip)?
3. Jak se liší exprese jednotlivých NOS (iNOS, nNOS a eNOS) z pohledu jednotlivých fází hojení? Liší se ty to enzymy k kvantitě produkce oxidu dusnatého?
4. Jaké buňky jsou hlavně odpovědné za produkci oxidu dusnatého v rámci hojení?

doc. RNDr. Ing. Vladimír Krylov, PhD.