



**PŘÍRODOVĚDECKÁ
FAKULTA**
Univerzita Karlova
Katedra biochemie

Oponentský posudek

na doktorskou disertační práci Mgr. Petry Valáškové nazvanou: „Antioxidační a prozánětlivé účinky bilirubinu.“

Předložená doktorská disertační práce Mgr. Petry Valáškové je zaměřena na studium vlastností a funkcí bilirubinu v organismu. Bilirubin byl dlouho považován pouze za odpadní molekulu s potenciálně toxickými účinky zejména na centrální nervový systém. Později bylo zjištěno, že bilirubin působí i cytoprotektivně a mírně zvýšené koncentrace této látky vykazují antioxidační, protizánětlivé a imunomodulační účinky, nicméně přesné mechanismy jsou stále předmětem intenzivního výzkumu. Hlavním cílem disertační práce Mgr. Petry Valáškové bylo studium protektivních účinků bilirubinu na experimentálních *in vivo* a *in vitro* modelech ve vztahu k zánětu a oxidačnímu stresu. Dílčím cílem práce bylo také zavedení a validace analytické metody pro stanovení bilirubinu a lumirubinu. Vzhledem k významu bilirubinu v důležitých fyziologických a patologických procesech, je téma této práce aktuální a studium této látky a jejich komplexů velmi žádoucí.

V rámci *in vivo* experimentů byla zavedena a optimalizována metoda restriční analýzy pro genotypizaci normo- a hyperbilirubinemických potkanů. Hyperbilirubinémie u potkanů kmene Gunn po expozici lipopolisacharidů (tj. po indukci zánětu) vedla ke snížení systémové zánětlivé odpovědi a hepatoprotekci. Bylo zjištěno, že tento efekt je pravděpodobně spojený s modulací vrozené imunity spolu se snížením produkce prozánětlivých cytokinů a modulací zánětlivé dráhy NF- κ B. Výsledky *in vitro* studií zabývající se možnou úlohou hemoxygenasy při metabolismu gangliosidů ve vztahu k oxidačnímu stresu potvrdily antioxidační působení bilirubinu a vliv oxidačního stresu na metabolismus GM3 gangliosidu. Bilirubin v těchto experimentech snižoval oxidační stres vyvolaný kyselinou chenodeoxycholovou. Dále byla zavedena kvantitativní analytická LC-MS/MS metoda umožňující stanovení bilirubinu a lumirubinu v séru a dalších biologických tkáních v jedné analýze. Tento výsledkem má velký aplikační potenciál v klinické praxi, protože díky této přesné metodě lze pozorovat změny v séru novorozence během fototerapie, snížit opakované odběry krve a množství vzorku potřebného pro analýzu.

Předložena disertační práce prezentuje velké množství originálních a zajímavých výsledků, které byly publikovány ve třech původních článkách v kvalitních časopisech (dva časopisy s IF), přičemž Mgr. Petra Valášková je prvním autorem jedné z nich. Další práce zabývající se zavedení a validace analytické metody pro stanovení bilirubinu a lumirubinu je rozpracovaná. Z tohoto hlediska se jednoznačně jedná o kvalitní práci, která ukazuje na fakt, že autorka získala značné zkušenosti s experimenty na *in vivo* (práce s potkany) a *in vitro* (izolace a kultivace hepatocytů) modelech stejně jako s moderními analytickými postupy

(chromatografie s detekcí hmotnostní spektrometrií). Disertační práce je psána klasicky a obsahuje úvod, cíle práce, metodickou část, výsledky, diskusi, závěr a seznam použité literatury. Práce je psána česky a z formálního hlediska je dle mého názoru vše v pořádku. Přítomnost gramatických chyb a formulačních nepřesností je minimální, i když z angličtiny odvozeného slova „enzymatický“ místo správně česky „enzymový“ se autorka nevyhnula. Nicméně přivítala bych, kdyby u jednotlivých publikací byl specifikován autorský podíl doktorandky na dané publikaci, která je vždy dílem autorského kolektivu.

K problematice diskutované v doktorské disertační práci mám následující dotazy a náměty pro diskusi:

1. Obecně se uvádí, že fyziologická koncentrace celkového bilirubinu v lidské krvi je mezi 2 až 17 $\mu\text{mol/l}$. Je taková koncentrace bilirubinu i v jednotlivých buňkách a liší se obsah bilirubinu v různých buňkách lidského těla?
2. Jeden z použitých experimentální modelových organismů představoval potkan kmene Gunn se sérovou koncentrací bilirubinu kolem 60 $\mu\text{mol/l}$ - jedná se v tomto případě o hyperbilirubinemi konjugovanou, smíšenou nebo nekonjugovanou? Je fyziologické rozmezí koncentrace bilirubinu v séru v případě potkanů (kontrolních zvířat) stejné jako v případě člověka?
3. Který jev tzv. „bilirubinového pumpingu“ (tj. změn v metabolismu buněk vystavených dlouhodobé hyperbilirubinémii) považujete za nejpodstatnější pro hodnocení vlivu bilirubinu na modelový organismus?
4. Jak by se antioxidační účinky a hepatoprotekce bilirubinu daly využít v klinické praxi? Je zvažována aplikace nějakých derivátů bilirubinu, nebo spíše podpora jeho nadprodukce (např. inhibice UDP-glukuronosyltransferasy)?

Závěrem konstatuji:

Předložená doktorská disertační práce Mgr. Petry Valáškové představuje významný přínos ke studiu vlastností a funkcí bilirubinu. Práce je psána srozumitelně, pečlivě, výsledky byly publikovány v kvalitních mezinárodních časopisech. Autorka ve své disertační práci prokázala předpoklady k samostatné tvořivé vědecké práci a k udělení titulu „Ph.D.“ za jménem.

V Praze, 15. srpna 2019


doc. RNDr. Markéta Martínková, Ph.D.
Katedra biochemie
Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy
Hlavova 2030
128 43 Praha 2
Tel: +420 221 95 1242
E-mail: marketa.martinkova@natur.cuni.cz