

Oponentský posudek

Disertační práce : „**Antioxidační a protizánětlivé účinky bilirubinu**“

Autorka : Mgr. Petra Valášková, 1. lékařská fakulta, Univerzita Karlova v Praze

Předložená disertační práce je vyhotovena na 88 stránkách, obsahuje 4 tabulky a 30 obrázků. Je členěna na 2 části – teoretický základ (27 stran) a vlastní studii s metodikou, výsledky, závěry a diskuzí (48 stran), dále seznam použité literatury a nezbytné formalities.

Další součástí práce jsou „Přílohy“, které obsahují 2 publikace otištěné v časopisech s impakt faktorem a jeden manuskript. Všechny uvedené publikace se týkají tématu disertační práce. Po formální stránce je práce stylizována dle zvyklostí.

V teoretickém **úvodu** práce autorka shrnuje biologické funkce hemu a jeho katabolismus, dále pak chemické a biologické vlastnosti bilirubinu a jeho izoforem, jeho transport a exkreci. Biologické účinky bilirubinu jsou rozděleny na toxické, antioxidační a protizánětlivé. Je zmíněna diferenciální diagnostika hyperbilirubinemií, patofyziologie novorozenecké žloutenky a mechanismus účinku fototerapie. Značné antioxidační účinky bilirubinu, jehož koncentrace jsou fyziologicky nižší, jsou vysvětlovány existencí biliverdin-bilirubinového redoxního cyklu a také inhibičním efektem na běžné izoenzymy NADPH-oxidázy. Jsou zmíněny příznivé efekty vyšší sérové koncentrace bilirubinu na riziko rozvoje aterosklerózy, astmatu, schizofrenie, diabetu, roztroušené sklerózy, systémového lupus erythematoses nebo obezity. Další kapitola shrnuje efekt bilirubinu na všechny etáže imunitního systému. Poslední kapitola úvodu se zabývá problematikou laboratorního stanovení koncentrace bilirubinu, úskalími nejpoužívanější metody stanovení pomocí diazoreakce a možnostmi použití nejmodernějších detekčních technologií. Zmíněna je zejména metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie na reverzní fázi s ultrafialovo-viditelnou spektroskopií, která byla na pracovišti autorky zavedena v roce 2008 a umožňuje stanovení bilirubinu v nanomolárních koncentracích v séru, buňkách i tkáních.

Teoretický přehled je dostatečný k úvodu do problematiky a je v něm zdokumentována potřeba dalšího výzkumu v této oblasti. Je tak zdůrazněna aktuálnost

zvoleného tématu. V přehledu použité literatury je citována jak aktuální literatura, tak literatura vhodně dokumentující vývoj poznatků v dané oblasti, citovány jsou i domácí práce.

Cílem vlastní práce bylo: 1./ Genotypizace normo- a hyperbilirubinemických potkanů, 2./ Posouzení vlivu bilirubinu na systémový zánět vyvolaný lipopolysacharidem *in vivo*, 3./ Izolace primárních hepatocytů z uvedených potkanů a studium vlivu bilirubinu *in vitro* a 4./ Hodnocení efektu bilirubinu na oxidační stres *in vitro*. Dílčím cílem dále bylo zavést a validovat analytickou metodu stanovení koncentrace bilirubinu a jeho fotooxidačního produktu lumirubinu v séru pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie (LC-MS/MS).

V **metodice** jsou podrobně popsány veškeré použité metody (jako např. genotypizace potkanů, stanovení zánětlivých markerů, práce s buněčnými kulturami, stanovování exprese genů), které ukazují na vysoký podíl práce samotné autorky. Jako zvířecí model hyperbilirubinémie byli zvoleni potkani kmene Gunn. V další části je pak podrobně popsán postup přípravy a stanovení koncentrace bilirubinu a lumirubinu metodou LC-MS/MS, kterou autorka zavedla. Použití jednotlivých metod je zcela adekvátní a odpovídá současným moderním poznatkům.

Mezi nejdůležitější **výsledky** patří zavedení metody genotypizace potkanů kmene Gunn pomocí analýzy délky restrikčních fragmentů a metody stanovení koncentrace bilirubinu a jeho fotoproduktů metodou LC-MS/MS. Obojí umožňuje další zpřesnění a rozšíření výzkumných možností daného tématu. Dále bylo prokázáno, že vyšší hladina bilirubinu u použitého zvířecího modelu vedla ke snížení systémové zánětlivé odpovědi a nižšímu vzestupu parametrů jaterního poškození. Tento efekt byl přičítán přítomnou modulací vrozené imunity, modulací dráhy NF- κ B a snížené produkce prozánětlivých cytokinů. Dalším poznatkem je pak ovlivnění metabolismu gangliosidů oxidačním stresem a prokázaný antioxidační efekt bilirubinu.

V **diskuzi** autorka podrobně komentuje dosažené výsledky.

Téma práce je velmi aktuální a práce přispívá k rozšíření teoretických znalostí o protektivních účincích bilirubinu. Zavedení nových analytických postupů navíc umožňuje další výzkum na poli experimentálním i klinickém. Vytyčené cíle práce byly splněny.

K autorce mám následující dotazy a poznámku:

- 1. Jaké spatřuje autorka výhody nově zavedené metody LC-MS/MS oproti uváděné dříve zavedené metodě s HPLC?*
- 2. Jsou nějaké další patologické stavy kromě novorozenecké žloutenky, kde by se nová metoda stanovení bilirubinu, jeho izomerů a metabolitů dala využít?*
- 3. Existují nějaké způsoby navození hyperbilirubinémie u jedinců bez přítomnosti genetické dispozice?*
- 4. V citované literatuře je celkem 7 prací uvedeno dvakrát.*

Závěrem lze říci, že práce plně odpovídá požadavkům na Ph.D. práci. Řeší aktuální problematiku, splnila cíle, které si autorka stanovila odpovídajícími metodami. Výsledky přinesly nové informace o protektivních vlastnostech bilirubinu a byly publikovány v časopisech s impakt faktorem. Dále byly zavedeny nové metody umožňující další výzkum této problematiky.

Disertační práce prokazuje předpoklady autorky k samostatné tvořivé vědecké práci a k udělení titulu Ph.D.

MUDr. Karel Dvořák, Ph.D.

Liberec, 5. 9. 2019

*IV. interní klinika 1. LF UK
U Nemocnice 2
128 08 Praha 2 – Nové Město
Tel: 602189694
Email: karel.dvorak@nemlib.cz*