

OPONENTSKÝ POSUDEK NA DIZERTAČNÍ PRÁCI

MUDr. JANA ŠKRHY jr.

„Patobiochemie diabetes mellitus a jeho komplikací – oxidační stres, mikrozánět a genetická predispozice“

Téma dizertační práce je vysoce aktuální. Diabetes mellitus patří mezi civilizační onemocnění s neustále vzrůstající incidencí a prevalencí. Na patogenezi tohoto komplexního metabolického onemocnění, kdy dochází k poruše glukózové homeostázy, se podílejí jak genetické a epigenetické faktory, tak faktory vnějšího prostředí a zejména u diabetu 2. typu k patogenezi přispívá velkou měrou nevhodný životní styl. I když se patogeneze diabetu 1. a 2. typu v mnohém liší, oba tyto typy diabetu jsou spojeny se závažnými mikro- a makrovaskulárními komplikacemi. Právě tyto chronické komplikace jsou příčinou vysoké morbidity a mortality pacientů s diabetem. Na rozvoji těchto komplikací se podílejí různé faktory – kromě hyperglykémie, alterovaného sacharidového a lipidového metabolismu, dlouhodobý oxidační stres a v neposlední řadě neenzymatické glykace. Konečnými produkty neenzymatických glykací jsou pokročilé produkty glykace (AGEs), které způsobují poškození funkcí intra- i extracelulárních proteinů. I přes velký pokrok znalostí, patobiochemické příčiny vzniku a rozvoje mikro- a makroangiopatie u diabetiků stále nejsou zcela objasněny. Pozornost výzkumníků je také zaměřena na hledání časných markerů, které by pomohly vytipovat osoby se zvýšeným rizikem, u kterých by byl vhodný preventivní/cílený terapeutický zásah.

Cílem dizertační práce bylo posoudit význam vybraných časnějších biochemických markerů cévního poškození u osob s diabetem 1. a 2. typu. Byl studován vliv polymorfismů genů *FN3K* a *GLO1*, které kódují ochranné deglykační enzymy fruktosmin 3-kinázu a glyoxalázu 1, na schopnost jedince vyrovnat se s dlouhodobou glykemickou náloží. Cílem bylo i otestovat novou neinvazivní metodu měření míry glykačního postižení tkání a její možné využití v predikci chronických komplikací.

Forma a rozsah práce: Dizertace je vypracována v českém jazyce, má logickou stavbu, je přehledná a srozumitelná. Teoretická část (19 stran textu), členěná do 6 podkapitol, je vynikajícím přehledem současných znalostí patogeneze diabetických cévních komplikací, podrobně je zde popsána zejména neenzymatická glykace, tzn. původ AGEs a jejich osud v organismu, jejich receptory a aktivace RAGE, deglykační mechanismy, metabolická paměť, možnosti detekce AGEs. Teoretická část dizertační práce, doplněná dlouhým seznamem citované literatury, svědčí o hlubokých znalostech této složité problematiky. Autor se dotýká všech aspektů, které bylo potřeba experimentálně řešit. Cíle práce jsou jasně formulovány. Následuje kapitola popisující stručně soubory pacientů, které byly využity v publikovaných studiích, použité biochemické metody (detailně je zde popsána zejména metoda stanovení sRAGE, EN-RAGE, HMGB1) a molekulárně genetické metody izolace DNA a stanovení polymorfismů genů *FN3K* a *GLO1*.

Výsledková část je opět přehledně členěna do podkapitol. Jádrem jsou 3 studie, které byly publikovány a jsou přiloženy *in extenso*. Následuje diskuse včetně nastínění dalšího směřování výzkumu. Práci uzavírá kapitola Závěr, kde jsou shrnuty základní výstupy, a dlouhý seznam použité literatury. Dizertační práce má celkem 107 stran, zahrnuje 160 citací, 7 obrázků a 7 tabulek. Zpracování svědčí o pečlivosti autora a vysoké formální úrovni celé dizertační práce.

Hodnocení postupu, metodik a výsledků:

Autor se podílel na kompletaci souborů pacientů. Osvojil si metodiky klinicko-biochemické a molekulární DNA analýzy, zejména metodu RFLP, i fyzikální metodu měření kožní autofluorescence. Naučil se získané výsledky hodnotit za pomoci adekvátních statistických metod a prezentovat. V první studii (*Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2012, IF=1,89) bylo zjištěno, že pacienti s diabetem 1. i 2. typu mají významně vyšší hladiny markerů endotelové dysfunkce a ligandů RAGE oproti zdravým kontrolám. Koncentrace sRAGE byla signifikantně vyšší u diabetu 1. typu, u obou typů diabetu souvisela s dobou trvání diabetu a nejvyšší hladiny měli pacienti s albuminurií. Poprvé byla u obou typů diabetu popsána inverzní závislost mezi metaloproteázami MM2 a MM9, které se mimo jiné podílejí na vzniku sRAGE. V rámci druhé studie (*Physiol Res*, 2014, IF=1,53) byly studovány polymorfismy genů *FN3K* (rs1056534; rs3848403) a *GLO1* (rs4746) ve vztahu k přítomnosti diabetických mikro- a makrovaskulárních komplikací. Ačkoliv se asociaci s cévními komplikacemi nepodařilo prokázat, byla popsána asociace polymorfismů *FN3K* s koncentracemi sRAGE u diabetiků a asociace mezi polymorfismem *GLO1* a markery endotelové aktivace a dysfunkce. Třetí studie (*Journal of Diabetes Research*, 2013, IF=3,54) potvrdila, že metoda kožní autofluorescence dobře odráží akumulaci AGEs v podkoží, která je signifikantně vyšší u diabetiků oproti zdravým kontrolám, koreluje s markery endotelové aktivace/dysfunkce, korelace s glykovaným hemoglobinem však nebyla přesvědčivá. Nejvyšší hodnoty byly naměřeny u pacientů s pozitivní albuminurií, metoda tak může být vhodným ukazatelem rozvoje diabetických komplikací. Krom těchto 3 publikací, kde je MUDr. Jan Škrha, jr., prvním autorem, se dizertant podílel i na 4 publikacích s IF a 7 publikacích bez IF, které sice nejsou podkladem dizertační práce, nicméně se také týkají diabetu a jeho komplikací.

Dotazy:

1) V dizertační práci je zmíněna „metabolická paměť“, kdy se ukazuje, že ani dosažení uspokojivé kompenzace u diabetiků často nezabrání rozvoji mikro- a makrovaskulárních komplikací. Zřejmě se zde uplatňují vlivy chronického zánětu, oxidačního stresu a epigenetické změny. Existují již důkazy, že by se tyto epigenetické vlohly pro rozvoj cévních komplikací přenášely i na potomstvo?

2) V teoretickém úvodu pro mne vyvstala otázka, proč oscilující hodnoty glykemií způsobují větší poškození endotelu než pouze setrvalá hyperglykémie? A jak si vysvětlujete, že i hypoglykémie zvyšuje míru oxidačního stresu a zhoršuje funkci endotelu?


3) V Příloze 2 (Tab. 2) uvádíte incidence diabetických komplikací u souborů diabetiků 1. a 2. typu. Zajímavé je, že retinopatie je mnohem častější u diabetiků 1. typu, na rozdíl od nefropatie či neuropatie a makrovaskulárních komplikací, které byly zachyceny častěji u diabetiků 2. typu. Je pro to nějaké vysvětlení?

4) V práci zmiňujete i metodiku měření autofluorescence oční čočky, ale výsledky neuvádíte. Máte už k dispozici data, která by umožnila srovnání této metody s metodou měření kožní autofluorescence?

5) V 90. letech minulého století byl popsán vitamin C jako velmi účinný inhibitor vzniku AGEs u modelu potkana, u člověka bohužel tento efekt nebyl tak průkazný. Existují nějaká farmaka, která by zabraňovala tvorbě AGEs?

Závěr: Dizertační práce řeší aktuální problematiku významnou pro základní výzkum i přímé klinické aplikace. Dizertant prokázal, že ovládá vědecké metody, že má hluboké znalosti teoretické. Práce splňuje vytčené cíle, přináší nové výsledky, hodnocení je provedeno střízlivě za použití validních metod. Předkladatel prokázal, že umí výsledky své práce publikovat i prezentovat na odborných sympoziích doma i v zahraničí. Po formální stránce je práce zpracována vynikajícím způsobem. Předkládaná dizertační práce prokazuje předpoklady studenta k samostatné tvůrčí vědecké práci.

Na základě posouzení dizertační práce navrhuji MUDr. Janu Škrhovi jr., udělit akademický titul „*philosophiae doctor*“ (Ph.D.).



Doc. RNDr. Běla Bendlová, CSc.
Endokrinologický ústav, Praha

V Praze dne 29. 1. 2018