

Oponentský posudek na doktorskou dizertační práci Mgr. Jany Ždychové „Signalizace protein kinázy B a exprese cyklooxygenáz v časných fázích diabetické nefropatie“

Autorka se v dizertační práci zabývá experimentálně i klinicky velmi významným tématem, totiž patofyziologií diabetické nefropatie. Hlubší poznání změn postihujících ledviny u diabetiků je jedním ze základních cílů studia diabetické mikroangiopatie. Přitom morfologie ledviny při diabetu postihující různé typy buněk i pojivovou tkáň, umožňuje sledovat vliv různých faktorů na expresi strukturálních i funkčních proteinů představovaných na jedné straně kolagenem či fibronectinem a na druhé straně enzymy.

Po krátkém přehledu věnovaném jednotlivým patogenetickým mechanismům rozvoje diabetické angiopatie se autorka zabývá studiem vybraného úseku inzulinové signalizační kaskády se zaměřením na proteinkinázu B v experimentálních podmínkách dvou odlišných forem diabetu u potkanů. Ke studiu ji slouží streptozotocinový diabetes jako model diabetu 1. typu a dále obézní Zuckerovi potkani (ZDF) vytvářející model diabetu 2. typu. V obou případech studuje aktivitu proteinkinázy B (Akt kinázy) vyjádřenou mírou fosforylace glykogensyntázy 3 beta (GSK3) s využitím techniky immunoblottingu. Stejnou technikou byla vyjádřena exprese cyklooxygenáz (COX-1, COX-2), přirozeného antagonisty proteinkinázy B (PTEN) a efektorů této proteinkinázy (mTOR a eNOS). Tkáň ledviny byla též vyšetřena imunohistochemicky.

První experimentální studie byla provedena u Zuckerových potkanů, kteří se vyznačili zvýšenou tělesnou hmotností i hmotností ledvin, zvýšenou koncentrací inzulinu, glukózy, triacylglycerolů i neesterifikovaných mastných kyselin. Proti kontrolním zvířatům došlo po 12 týdnech ke vzestupu aktivity Akt kinázy (PKB) a vzestupu fosforylace mTOR, přičemž obě exprese byly inhibovány wortmaninem, inhibitorem fosfatidylinositol-3-kinázy. Tyto výsledky dokládají úlohu inzulinu na regulaci aktivit obou proteinů. Naproti tomu míra fosforylace NO syntázy (eNOS) byla u ZDF potkanů srovnatelná s kontrolní skupinou. Autorka vyvozuje, že tato porušená rovnováha, kdy dochází ke stimulaci Akt/mTOR a naopak k oslabení vasoprotektivní Akt/eNOS signalizace, může přispívat ke vzniku a rozvoji diabetické nefropatie.

Druhá studie byla provedena u streptozotocinových potkanů. Autorka vyšetřila 4 skupiny. Vedle kontrolního souboru byli sledováni potkani s diabetem bez léčby, dále skupina potkanů léčených 4 jednotkami inzulinu denně a konečně potkani léčení 12 jednotkami inzulinu denně. Měření probíhala 4 týdny po indukci diabetu. Navíc byli ještě kontrolní potkani (bez diabetu) vyšetřeni po léčbě čtyřmi jednotkami inzulinu denně. Největší změny byly patrné u neléčených diabetických potkanů, u nichž došlo k úbytku tělesné hmotnosti, nárůstu hmotnosti ledvin a pochopitelně k poklesu koncentrace inzulinu a vzestupu glukózy v plazmě. U této skupiny byla snížena aktivita i exprese Akt kinázy a podobně i mTOR proteinu, kdežto léčba inzulinem vedla k jejich navýšení. V případě Akt kinázy došlo k vyrovnání hodnot s kontrolními zvířaty, kdežto mTOR u léčených zvířat převýšily hodnoty kontrolního souboru. Autorka dochází tak k hypotéze, že za podmínek DM 1. typu je zřejmě mTOR ve vztahu k metabolické kompenzaci regulován ještě dalšími mechanismy.

Třetí studie se zabývá renální cyklooxygenázou 2 u obézních Zuckerových potkanů. Na rozdíl od COX-1, jejíž exprese klesla u ZDF potkanů, COX-2 naopak narostla spolu se zvýšeným výdejem prostanoidů močí. Podání wortmaninu vedlo k poklesu výdeje prostanoidů močí u ZDF potkanů, ale nikoli u kontrol. Pozorované změny mohou souviset se změnami renální hemodynamiky i s vývojem hypertenze prokazovanými v rámci rozvoje diabetické nefropatie.

V provedených experimentálních studiích autorka dochází k originálním pozorováním, které obohacují současné poznatky z patofyziologie renálních změn u diabetu ve vztahu ke kompenzaci onemocnění i hladinám inzulinu.

Po formální stránce dizertační práce je zpracována na 73 stránkách, citováno je 269 prací, z nichž 42 je z posledních pěti let. Vlastní text je přehledně členěn do šesti kapitol, po obecné stati o patogenetických mechanismech diabetické nefropatie autorka uvádí stručnou charakteristiku použitých zvířecích modelů, dále charakterizuje proteinkinázu B a její úlohu, podává charakteristiku mTOR proteinu a v následujících třech kapitolách uvádí výsledky 3 studií, jejichž text „in extenso“ je uveden v příloze. Jedna ze studií byla již publikována a kopie publikace tvoří jednu z příloh.

Dotazy a připomínky:

Studie jsou logicky strukturované, vedou k odpovědi na položené otázky, jejich zpracování v příložených rukopisech je perfektně dokumentované. Nemám k nim proto žádné zásadní připomínky. Následující dotazy vyplývají z vlastního textu dizertační práce.

1. Z předložené dizertační práce nevyplývá, jakou část experimentální práce prováděla autorka sama, což by bylo vhodné uvést.
2. Podle současných představ je mTOR významným proteinem, který se podílí na rozvoji inzulinové rezistence. Tomu by mohl zčásti napovídat i obr. 5 na str. 21. Existují doklady o poklesu exprese či aktivity Akt při zvýšené expresi mTOR?
3. V citacích je uvedena jedna přehledná publikace autorky o charakteristice proteinkinázy B, která byla již publikována ve *Physiological Research* a mohla být též uvedena jako jedna z příloh.
4. V textu je použita řada zkratk, většina je správně vysvětlena, u některých plný název chybí (viz např. ROS na str. 4, UCP na str. 5 aj.). Práci by prospěl přehled použitých zkratk uvedený jako samostatný seznam.
5. Na str. 4 autorka v prvním odstavci hovoří o neenzymové glykaci. V nadpisu odstavce by bylo proto vhodnější zvolit termín „glykační produkty“ a nikoli glykosylační (podobně i na str. 5, 6 a 7). Glykosylace označuje děj katalyzovaný enzymem, o čemž se v tomto případě nejedná.
6. Na str. 5 by byla vhodná úprava formulace 2. věty prvního odstavce. Z použité formulace vyplývá, že „reaktivní formy...“ nestačí zneškodnit antioxidační systém. Opak je pravdou, neboť antioxidační systém je má likvidovat.
7. V odborném textu bych doporučil jiné vyjádření než pomocí slova „díky“ - viz 2. odstavec na str. 5 hned ve třech větách po sobě.
8. Na str. 7 měla autorka pod pojmem „plasminogen-aktivující inhibitor“ na mysli zřejmě „inhibitor tkáňového aktivátoru plazminogenu“ (tj. PAI-1).
9. Na str. 9 na obr. 2 dole vpravo chybí jeden pojem, zřejmě „tubulointersticiální fibróza“.
10. Co znamená „rodina AGC proteinových kináz“? Co znamená tato zkratka? (viz str. 11)

11. Některé pojmy v přepisu do češtiny vycházejí zřejmě z angličtiny, která je ponechána (viz str. 12, Tab. 1 „Purkyňovy buňky“ místo Purkinjovy, nebo v Tab. 2 první řádek „Faktor“ místo Factor, podobně na str. 7 první odstavec „inhibitor metaloproteináz“ místo metalloproteinases).

12. K obr. 3 chybí odkaz v textu.

13. Na str. 31 v Tab. 5 ve sloupci označeném hmotnost pravé ledviny v řádce ZDF 12 chybí desetinná čárka (má být $1,295 \pm 0.04$).

14. Na obr. 20 a 21 by mělo být označení „Výdej PGE a TxB v moči“ a nikoli „produkce“. Jedná se o výdej moči. Viz též příslušný graf v původní publikaci uvedené jako příloha 3.

15. Pomíjím drobné překlepy v textu.

Shrnutí a celkové hodnocení:

Práce výborně dokumentuje přínos autorky po stránce odborné problematiky. Téma práce je velmi aktuální a významné nejen z hlediska experimentální fyziologie, ale i praktické medicíny. Jedná se o hlubší poznání mechanismů rozvoje diabetické nefropatie, které jsou důležité pro volbu vhodných léčebných opatření do budoucna. Použité metody v práci jsou moderní a na vysoké úrovni. Autorka získala prioritní výsledky, z nichž logicky vyvozuje závěry pro vysvětlení některých patofyziologických souvislostí. Považuji tyto výsledky za vysoce cenné. Uchazečka zvládla metodu vědecké práce od přípravy experimentu po zpracování výsledků a přípravu rukopisu na takové úrovni, aby mohl být publikován v zahraničním časopise s impakt faktorem. Tím naplňuje kriteria požadovaná k disertační práci doktorského studijního programu.

Uvedené připomínky nikterak nesnižují význam disertační práce, kterou uchazečka dokládá, že splňuje předpoklady pro předložení práce k obhajobě.

Práce dokumentuje, že autorka má předpoklady k samostatné tvůrčí vědecké práci. Na základě výše uvedených skutečností doporučuji, aby mgr. Janě Ždychové byl udělen po obhajobě disertační práce titul „PhD“.

V Praze, 20. srpna 2008

Prof. MUDr. Jan Škrha, DrSc.