



UNIVERZITA KARLOVA 3. lékařská fakulta

ÚSTAV FYZIOLOGIE

Doc. Ing. Jana Jurčovičová, CSc.
Jana.jurcovicova@lf3.cuni.cz
Tel. +420 22490 2719

Oponentský posudek na disertační práci Ing. Lucie Holé

VZÁJEMNÁ INTERAKCE GHRELINU A JEHO NOVÉHO ENDOGENNÍHO ANTAGONISTY LEAP2: MOŽNÁ ÚLOHA V PATOLOGII OBEZITY

Předkládaná dizertační práce Ing. Lucie Holé byla vypracovaná během doktorandského studia na ÚOCHB AV ČR, pod vedením RNDr. Lenky Maletínské, DSc. Práce se věnuje velmi aktuálnímu tématu možného ovlivnění rozvoje obezity farmakologickou manipulací vzájemného vztahu ghrelinu a jeho relativně nedávno objeveného antagonisty, peptidu LEAP2. Práce je logickou součástí velmi erudovaného týmu zabývajícího se vztahy struktury a funkce peptidů působících jako antiobezitika.

Práce je formálně členěna do obvyklých částí představujících strukturu publikace, plus doplněna třemi *in extenso* publikacemi v časopisech s vysokým IF (4.4, 4.87, 6.21), a jednou prací, přijatou do tisku. Tato publikační činnost přesahuje požadavky kladené na PhD práci.

Práce je psána v anglickém jazyce, formální úprava je na vysoké úrovni, jak grafy, tak struktury jednotlivých molekul a mechanismů jejich působení. Obzvláště hodnotím schémata, která dokreslují relativně složité *in vivo* experimenty v „Methods“ a také souhrnná schémata v kapitole „Discussion“.

V teoretické části autorka shrnula dosavadní poznatky o centrální regulaci příjmu potravy a energetické rovnováhy a o možnosti farmakoterapie obezity, ovlivňováním centrálních regulačních okruhů. Důraz klade na studium interakce GHRS s ghrelinem, jeho syntetickými analogy a nedávno objeveným antagonistou GHRS, LEAP2. Strukturu a fyziologii LEAP2 jako i interakci ghrelinu a LEAP2 v působení na GHRS věnuje detailní pozornost, vzhledem k tomu, že manipulace a modifikace těchto dvou molekul může potenciálně představovat cestu k farmakoterapii obezity. Všechny popsané známé dráhy a mechanismy jsou tu podloženy velmi přehlednými schématy.

Cíle práce jsou stanoveny jasně, metody jsou popsány stručně, avšak v některých případech méně známých metod, např. FRAP, bych ocenila vysvětlení principů analýz. Zde vysoce hodnotím velkou paletu použitých *in vitro* metod, (lipidace LEAP2, velmi detailní vazebné studie jednotlivých analogů LEAP2, analýzy metabolického profilu, imunohistochemii řezů jater), což svědčí o velké laboratorní erudici autorky a umožňuje řešení problematiky z mnoha aspektů. Autorka prokázala také velkou zručnost v *in vivo* experimentech (manipulace příjmu potravy podáváním jednotlivých LEAP2, [Dpr³]Ghrelinu a zejména OGTT testy).

Práce je rozdělena do dvou částí: První část je věnována přípravě LEAP(1-14) a jeho analogů, myristoyl-Leap2(1-14), palmitoyl-Leap2(1-14), stearoyl-Leap2(1-14) a *in vitro* testování jejich afinity ke GHSR a také jejich vlastností jako antagonistů a/nebo inverzních agonistů.

Druhá část je věnována *in vivo* testům, kde se sleduje: 1) vliv analogů LEAP2(1-14) na akutní příjem potravy a také na akutním ghrelinem indukovaném příjmu potravy, 2) chronický vývoj obezity podáváním vysokotukové diety a glukózová tolerance, 3) chronický vývoj obezity a citlivost na Dpr³Ghrelin a palm-LEAP2(1-14), 4) možné preventivní ovlivnění rozvoje obezity podáváním palm-LEAP2(1-14).

Výsledky ukázaly, že v *in vitro* systému nejvyšší afinitu ke GHSR prokázal palm-LEAP2(1-14), tento analog měl i největší účinek na redukci příjmu potravy *in vivo* a také zablokoval u myši Dpr³Ghrelinem vyvolanou stimulaci růstového hormonu. Ve chronickém experimentu došlo ke snížení glukózové tolerance po podávání vysokotukové diety a 3 týdny po přechodu na normální dietu glukózová tolerance se upravila k normálu. Také se snížily hladiny leptinu, exprese LEAP2 v játrech a upravily se i zvýšené hladiny cholesterolu. Podávání vysokotukové diety způsobilo v chronickém experimentu rezistenci na ghrelin a také na palm-LEAP2(1-14), přičemž rezistence na ghrelin se po přechodu na normální dietu upravila, avšak nikoli rezistence na palm-LEAP2(1-14).

V diskusi autorka analyzuje dosažené výsledky a konfrontuje je se současnou literaturou.

Závěry jsou formulovány jasně, kriticky hodnotí pozitiva i negativa palm-LEAP2(1-14). Celá práce je podpořena 154 citacemi.

Za nejvýraznější výsledek považuji fakt, že po DIO dochází ke ghrelinové rezistenci, která se ale upraví, avšak rezistence na Leap2 se neupraví standardní dietou. Tento nálezn komplikuje využívání palm-Leap2(1-14) k omezení příjmu potravy, avšak představuje výzvu na syntézu a testování dalších analogů, vzhledem k tomu že ovlivnění poměru LEAP2/ghrelin představuje v současné době hlavní možnou dráhu farmakoterapie obezity.

Otázky

- 1) V „Introduction“ se uvádí že GHRS jsou exprimovány ubikválně ve většině tkání. Může mít farmakologická manipulace těchto receptorů z důvodu ovlivnění příjmu potravy i vedlejší nežádoucí efekty?
- 2) V Methods se uvádí pro krátkodobé experimenty myši C57B1/6J a pro chronické experimenty myši C57B1/6N. V čem se liší?
- 3) Jaký byl důvod ke zvýšení dávky palm-Leap2(1-14) z 5 mg/kg na 10 mg/kg v posledním chronickém experimentu?
- 4) Ve chronickém experimentu vysokotuková dieta zvýšila hladiny cholesterolu, která se po přechodu na normální dietu upravily k normálu. TAG ale vysokotuková dieta neovlivnila. Jaké máte vysvětlení, vzhledem k tomu že obézní jedinci mají zvýšené hladiny i TAG.
- 5) V pozorované rezistenci na ghrelin může hrát roli i zvýšená hladina leptinu? Dala by se analyzovat ghrelinova rezistence na primární kultuře hypotalamických neuronů?
- 6) Jako si vysvětľujete mechanismus glukózové intolerancia při ghrelinovej rezistencii? Vzhledem k tomu, že ghrelin (podobně jako kortizol) stimuluje hladiny glukózy a také snižuje citlivost k inzulínu, dalo by se předpokládat, že v situaci nefunkčnosti ghrelinu fungují jiné mechanismy.
- 7) Výsledek o zablokování ghrelinem indukovaného vzestupu GH po podání palm-LEAP2(1-14) je velmi zajímavý a může mít dopad na normální fyziologické hladiny GH, který má metabolické funkce nejen u adolescentů ale ve všech věkových kategoriích. Doporučuji při hledání nových analogů Leap2 vzít tento fakt do úvahy.
- 8) Mají inverzní hladiny LEAP2/ Ghrelin i vzájemný regulační vztah?

Technické poznámky:

Str 41, 3.3.3.2, druhý odstavec popis podávání látek je identický s popisem pokusu 3.3.2.1, str 38, poslední odstavec. „At 8:00 a.m. on the day of experiment mice were SC injected“. To nesedí, v serii Long term in vivo study 2 se nepodávaly látky za sebou v 15 min intervalech. V suplementu v publikaci je to uvedeno správně.

V Introduction ...pharmaceutical intervention.... bych změnila na pharmacotherapy, anebo pharmacological intervention.

Závěr:

Předložená dizertační práce řeší velmi aktuální téma, které je důležité dále rozvíjet. Má velmi vysokou úroveň jak po stránce formální, tak i odborné a splňuje všechny požadavky kladené na doktorskou dizertační práci. Proto po úspěšné obhajobě doporučuji Ing. Lucii Holé udělení titulu PhD v oboru Biochemie a patobiochemie.

V Praze, 12. 9. 2023

Doc. Ing. Jana Jurčovičová, CSc