

Univerzita Karlova

Lékařská fakulta v Hradci Králové

Disertační práce

Vliv vybraných léků na kostní metabolismus

The effect of selected drugs on bone metabolism

Autorka: **Mgr. Iva Karešová**

OPONENTSKÝ POSUDEK

Předložená disertační práce je psána v českém jazyce a má celkový rozsah 112 stran včetně přehledu literatury a příloh.

Disertace obsahuje 36 dílčích tabulek, 3 grafy a 7 obrázků, v textu je použito celkem 54 zkratk, jejichž přehledný seznam autorka uvádí za obsahem jednotlivých kapitol.

V seznamu použité literatury je citováno 105 publikací.

Členění práce je standardní – po teoretickém úvodu a přehledu současných poznatků následuje stanovení cílů a hypotézy vlastní práce, charakteristika zkoumaného souboru experimentálních zvířat, použitá metodika, statistická analýza a prezentace výsledků, diskuse a závěry. K disertaci jsou dále přiloženy tři významné původní práce uchazečky (dvakrát je první autorkou), publikované v časopisech s impakt faktorem – *Pharmacology* 2023, *Pharmacological Reports* 2019 a *European Journal of Pharmacology* 2018.

Autorka se ve své práci zaměřila na problematiku terapie antiepileptiky v souvislosti s jejich možným negativním účinkem na kostní tkáň. Vycházela z literárních průkazů rozvoje osteopenie a osteoporózy u dlouhodobě léčených epileptiků. Je opakovaně doloženo, že tradiční antiepileptika mohou indukovat enzymy biotransformace, což vede ke zvýšenému jaternímu katabolismu 25-hydroxyvitaminu D. Dalším mechanismem může být přímý negativní účinek na denzitu kostního minerálu. Pro novější antiepileptika však nejsou příslušná data k dispozici. Byla tedy stanovena hypotéza, že moderní antiepileptika, zavedená

do praxe v posledních dvou dekadách, jsou ke kostní tkáni šetrnější. Na základě toho si autorka za cíl svého výzkumu zvolila posouzení vlivu orchidektomie a několika zvolených antiepileptik nové generace na kvalitu kostní tkáně a kostní metabolismus u mladých potkanů. Vybrán byl zonisamid (derivát benzisoxazolu, užívaný při monoterapii parciálních záchvatů a jako přídatná léčba fokálních záchvatů se sekundární generalizací); pregabalin a gabapentin (analog kyseliny gamaaminomáselné s antikonvulzními, antinociceptivními a anxiolytickými účinky) a levetiracetam (analog piracetamu, podávaný při parciálních, generalizovaných a posttraumatických záchvatech). K pokusům autorka zvolila osmitýdenní samce potkanů albínů kmene Wistar, kteří byli za účelem studie chováni ve standardních podmínkách (protokol experimentu schválila Odborná komise na ochranu zvířat proti týrání UK – LFHK). Celkovou zkoumanou kohortu představovalo 80 pokusných zvířat.

Vlastní práce spočívala v jejich náhodném rozdělení na jedince určené k orchidektomii na počátku experimentu nebo gonadálně intaktní samce, kteří podstoupili pouze řez na skrotu. V obou skupinách pak vznikly stejně velké podskupiny, jež autorka po dvanáct týdnů vystavila účinkům zvolených antiepileptik. Po ukončení této fáze byla zvířata usmrcena, jejich sérum alikvotováno a zamraženo k následné analýze ukazatelů kostního obratu - aminoterminálního propeptidu prokolagenu typu I (P1NP); ligandu pro aktivátor nukleárního faktoru kappa B (RANKL) a osteoprotegerinu (OPG). U levetiracetamu se ještě stanovoval C-terminální telopeptid kolagenu typu I (CTX-I). U všech zvířat byla na konci pokusu měřena denzita kostního minerálu pomocí dvouenergievé rentgenové absorpciometrie (DXA) se zhodnocením denzity celotělové, v oblasti bederních obratlů a femurů. Pomocí modifikované metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie s detekcí na hmotnostním spektrometru typu trojitého kvadrupólu byly v krevním séru na konci experimentu stanoveny hladiny zonisamidu, gabapentiu a pregabalínu. Koncentrace levetiracetamu byla určena metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV detekcí fotodiodovým paprskem.

Kostní homogenát, připravený z vypreparovaných femurů pak posloužil ke stanovení hladiny sklerostinu a aktivity kostní alkalické fosfatázy (BALP). Uskladněné zamražené femury také autorka využila k testování mechanické odolnosti kostní tkáně pomocí třibodového ohýbání kostí.

Statistické zpracování naměřených dat odpovídá designu a cílům práce. Při porovnání dvou skupin byl použit dvouvýběrový t-test s případnou Bonferoniho modifikací. Pokud nelze předpokládat normální rozdělení pravděpodobností, hodnocení proběhlo pomocí neparametrických testů (Mann-Whitney nebo Kolmogorov-Smirnovův test).

Ve výsledcích autorka uvádí, že orchidektomie neměla vliv na hmotnost pokusných zvířat, nedošlo ani k významným změnám ukazatelů kostního obratu. Orchidektomovaní potkani nicméně měli oproti gonadálně intaktní skupině statisticky významně nižší hodnoty denzity kostního minerálu na všech měřených místech, významně klesl i průměr jejich femuru a mechanická odolnost kosti při tříbodovém ohýbání. Zonisamid nezpůsobil žádné významné změny ukazatelů kostního obratu, denzity kostního minerálu ani mechanické odolnosti kosti. Použití gabapentinu vedlo ke statisticky významnému zvýšení hladiny RANKL u orchidektomovaných zvířat oproti neléčené skupině. Denzita kostního minerálu ani mechanická odolnost kosti se však mezi skupinami nelišila. Při podávání pregabalínu významně stoupla hladina sklerostinu u gonadálně intaktních potkanů vůči neléčené skupině. U orchidektomovaných zvířat se statisticky významně zvýšil RANKL. Mechanická odolnost kosti a denzita kostního minerálu se ani zde nelišila. Ve skupině s levetiracetamem pokleslo u gonadálně intaktních potkanů množství tukové tkáně, významně se zvyšuje BALP, CTX-I a RANKL. U obou aktivně léčených skupin statisticky významně narůstá celotělová denzita kostního minerálu. Na ostatních měřených místech ani v testech mechanické odolnosti kosti k významným změnám nedošlo.

V diskusi autorka rozebírá svá pozorování a provádí jejich rozbor na základě známých literárních údajů. Významné snížení denzity kostního minerálu v oblasti celého těla, bederních obratlů a femurů bylo u orchidektomovaných zvířat očekáváno v souladu se známým faktem, že androgenní deprivace je spojena s jejím poklesem. U zonisamidu stále není vyjasněný mechanismus účinku na kostní tkáň. Na rozdíl od literárních dat v této práci jeho negativní vliv na denzitu kostního minerálu nalezen nebyl. Nelze vyloučit, že je zde závislost na výši dávky a účinek látky bude bifázický. U gabapentinu a pregabalínu se zdá, že riziko případných negativních účinků může záviset na hormonální situaci exponovaného jedince. Levetiracetam má zřejmě též dvoufázový účinek. Zvýšení ukazatelů kostní resorpce i formace ukazuje na zrychlení kostního obratu, který však neměl vliv na mechanickou odolnost kosti. Zjištěný pokles tukové tkáně je údajem překvapivým, který možná lze vysvětlit nižším množstvím přijímané stravy.

Závěr

Po dvanácti týdnech podávání antiepileptik typu zonisamidu, gabapentinu, pregabalínu a levetiracetamu nebyl nalezen jejich statisticky významný vliv na denzitu kostního minerálu, a to u gonadálně intaktních ani u orchidektomovaných potkanů. Jednotlivé účinné látky způsobily změny některých sledovaných ukazatelů kostního obratu, ale žádný z použitých preparátů nevedl k významné změně mechanické odolnosti kosti bez ohledu na skupinu

pokusných zvířat. V předložené práci tak autorka demonstruje, že dlouhodobé podávání nových antiepileptik lze ve vztahu ke kostnímu zdraví považovat za méně rizikové.

Kritické poznámky oponenta

-byla nalezena chyba v číslování obrázků: po obr. 4 následuje obr.6. Obrázek číslo 5 chybí

-tabulky nejsou očíslovány (ale jsou přehledné)

-namísto výrazu “kostní hustota” - opakovaně se vyskytuje v celém textu – by bylo vhodnější používat termín “denzita kostního minerálu”

Nutno ovšem podotknout, že výše uvedené nedostatky nejsou zásadního významu.

Otázky oponenta

-jedním z mechanismů negativního ovlivnění kostní tkáně u starších antiepileptik je zvýšený jaterní katabolismus 25-hydroxyvitaminu D. U léků novější generace jste o žádném účinku na metabolismus vitaminu D neuvažovali?

Předložená práce vnáší nové poznatky o možném vlivu antiepileptik posledních generací na kostní metabolismus. Zvolené metody a cíle práce odpovídají jejímu zaměření. Téma je aktuální a pro obor Klinická biochemie přínosem. Závěry jsou formulovány věcně a přehledně.

Svým přístupem autorka prokázala schopnost systematického vědeckého myšlení a syntézy poznatků. Za kladné lze též považovat pojetí diskuse se zdravě kritickým náhledem k možnostem své vlastní práce.

Na základě výše uvedeného hodnocení předloženou disertační práci

doporučuji

k obhajobě za účelem získání akademického titulu Ph.D. podle § 47 Zákona o vysokých školách č.111/1998 Sb.

V Praze dne 20.10.2023

prof. MUDr. Milan Bayer, CSc