

Oponentský posudek k disertační práci MUDr. Anny GERMANOVÉ "Genetická predispozice a nové biochemické markery u vybraných stavů v porodnictví" vypracované na 1. LF UK v Praze v roce 2014 .

Dizertační práce k získání hodnosti Ph.D. v oboru biochemie a patobiochemie předložená MUDr. Annou Germanovou z Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze má rozsah 124 stran vlastního textu a obsahuje 23 obrázků, 24 tabulek a 3 originální práce týkající se dané problematiky, které byly zveřejněny v impaktovaných časopisech se souhrnným impakt faktorem 5.196. Celkově byla MUDr. A. Germanová prvním autorem ve 4 impaktovaných článcích, spoluautorem v dalších 7 impaktovaných článcích, a spoluautorem ve 2 neimpaktovaných publikacích. Souhrnný IF má v jejím případě hodnotu 19.621. V literárním přehledu této práce bylo citováno 228 prací.

Ve svém posudku jsem se zaměřil vzhledem ke své specializaci v oboru biochemie především na problematiku biomarkerů v léčbě a diagnostice žen s patofyziologickým průběhem těhotenství, genetickou problematiku jsem sledoval jen okrajově.

Cílem předkládané práce je výzkum polymorfismu receptoru pro koncové produkty pokročilé glykace (RAGE) a polymorfismu detoxikačního enzymu glyoxalasy 1 spolu s výzkumem změn koncentrací rozpustné formy receptoru pro koncové produkty pokročilé glykace (sRAGE) v cirkulaci v souvislosti s fyziologickým a patofyziologickým průběhem těhotenství, které je obecně doprovázeno zvýšeným oxidačním stresem. Ten může vést k biosyntéze heterogenní směsi reaktivních látek označovaných jako koncové produkty pokročilé glykace (AGEs), které vznikají v důsledku řady reakcí, mezi které patří i neenzymatická glykace proteinů, lipidů a jejich oxidace, na které se podílí kromě jiného i superoxidový anion. Výsledkem je vznik peroxidů a v důsledku návazné Fentonovy nebo Haber-Weissovy reakce i tvorba zvláště nebezpečných hydroxylových radikálů. AGEs mohou poškozovat tkáň přímo změnou její integrity v důsledku fyzikálně-chemických interakcí, výsledkem je vznik mikrozánětů, nebo nepřímo interakcí s RAGE, jehož aktivace vede k prohloubení negativních účinků oxidačního stresu, k vyvolání zánětů a proliferativních změn souvisejících s poškozením tkáně. Z hlediska eliminace negativních účinků oxidačního stresu je výskyt pouze extracelulární smyčky RAGE, tzv. rozpustný sRAGE, příznivý, protože je schopný blokovat účinky produktů pokročilé glykace tím, že se na ně váže a zabraňuje tak i jejich interakci s RAGE. Podobně příznivé je i působení glyoxalasy 1, detoxifikačního enzymu obsahujícího zinek, jehož substrátem jsou prekursori AGEs typu glyoxalu a methylglyoxalu. Snížená aktivita tohoto enzymu vede ke zvýšené koncentraci AGEs. AGEs a RAGE jsou součástí patofyziologických procesů u řady chronických onemocnění s prozánětlivými a trombogenními účinky, jako je diabetes mellitus a jeho komplikace, rozvoj aterosklerózy, hypertenze, kardiovaskulární, chronické ledvinové, autoimunitní nebo neurodegenerativní onemocnění, případně i malignita a vývoj metastáz.

Význam předkládané práce spočívá ve výzkumu sRAGE jako případného biochemického markeru patologického průběhu těhotenství a ve výzkumu genetických změn u RAGE a glyoxalasy 1, které by mohly vysvětlit a případně i predikovat patofyziologický průběh těhotenství a přispět tak k jeho zdárnému průběhu s vysokou mírou eliminace negativních jevů, které těhotenství mohou doprovázet v důsledku zvýšeného oxidačního stresu. Výzkum týkající se RAGE a sRAGE v souvislosti s těhotenstvím je relativně nový, první publikace na toto téma byly uveřejněny v roce 2003, glyoxalasa 1 v tomto směru ještě podrobně studována nebyla.

Cílem práce bylo objasnit úlohu RAGE, sRAGE a glyoxalasy 1 ve fyziologickém i patofyziologickém průběhu těhotenství v souvislosti s oxidačním stresem a mikrozáněť, které jsou pro tento stav pacientek typické.

Autorka důkladně zpracovala zadané téma a v práci jsou uvedeny podrobné biochemické i genetické poznatky o povaze RAGE a jeho účincích, diskutují se zde jeho interakce s různými ligandy a je široce diskutována rozpustná forma RAGE (sRAGE), způsob jejího vzniku a mechanismus jejího působení. Podobná pozornost je věnována i glyoxalase 1. Popsán je rovněž vznik a povaha AGEs, i když výzkum v tomto směru ještě není ukončen. Podrobně jsou probírány i příčiny patologického

průběhu těhotenství v souvislosti s předčasným porodem, přičemž jen v České republice je tímto stavem ohroženo 7 % těhotných žen. Diskutovány jsou hypertensní poruchy v těhotenství, gestační hypertenze a preeklampsie, intrahepatická cholestáza těhotných a intrauterinní růstová restrikce plodu

Výzkum uvedený v předkládané práci byl rozsáhlý a byl prováděn na skupině 120 zdravých těhotných žen s fyziologickým průběhem těhotenství a 24 zdravých netěhotných žen (kontroly), u 99 těhotných pacientek se symptomy předčasného porodu, z nichž 75 předčasně porodilo do 24 hodin po náběru krve, na skupině 35 těhotných žen trpících preeklampsí, u 22 pacientek s intrauterinní růstovou restrikcí plodu a u 14 těhotných pacientek trpících intrahepatickou cholestázou. Metodika výzkumu je v práci detailně popsána jak u imunoanalytických a biochemických stanovení, tak i v rámci genetických analýz.

Z výsledků vyplývá, že koncentrace sRAGE se při fyziologickém průběhu těhotenství podstatně (statisticky významně) sníží (přibližně o 60 %) v porovnání s netěhotnými zdravými ženami, nízkých hodnot je dosaženo již v 1. trimestru, ve 2. trimestru dochází k statisticky významnému nárůstu koncentrace sRAGE o přibližně 30 % v důsledku kompenzačních mechanismů adaptace na zvýšený oxidační stres, ve 3. trimestru se hladina sRAGE snižuje na úroveň 1. trimestru pravděpodobně v důsledku prozánětlivých procesů spojených s porodem. Koncentrace sRAGE byla u žen s náběrem krve těsně před proběhlým předčasným porodem statisticky významně snížena v porovnání s ženami, u kterých k předčasnému porodu nedošlo. Naproti tomu u žen trpících preeklampsí byla hodnota sRAGE statisticky významně vyšší v porovnání s těhotnými zdravými ženami ve všech trimestrech, mechanismus vzniku tohoto zvýšení ale není znám. Koncentrace sRAGE u žen s intrauterinní růstovou restrikcí plodu a s intrahepatickou cholestázou se statisticky významně nelišila v porovnání se skupinou zdravých těhotných žen. Nebyla nalezena žádná asociace mezi polymorfismem RAGE nebo glyoxalasy 1 a koncentrací sRAGE v cirkulaci.

K práci mám tyto dotazy a připomínky:

Práce je psána v anglickém jazyku, graficky i stylově je zdařilá, výborně upravená, na její kvalitě jí neubírá ani několik drobných nejasností, které jsem našel.

Od autora bych se rád dověděl:

- 1) Jak probíhá metabolismus sRAGE. Může se v průběhu jeho eliminace uvolnit vazba ligandů (především AGEs), které by se tak mohly vrátit do cirkulace?
- 2) Jaké máte zkušenosti s imunoanalytickým stanovením sRAGE? Byla z praktického hlediska správnost imunometrického ELISA stanovení sRAGE dostačující ve smyslu pravdivosti a přesnosti analýzy?

Závěr

Předložená práce se zabývá vysoce aktuálními problémy spojenými s patofyziologickým průběhem porodu. Lepší porozumění mechanismů spojených s fyziologickým i patofyziologickým průběhem porodu může podstatně zlepšit zdravotní péči v porodnictví a zamezit tak případným ztrátám na životě jak matek, tak i jejich plodů. Změny sRAGE v cirkulaci by mohly být prediktorem patofyziologického průběhu těhotenství ve smyslu nebezpečí předčasného porodu nebo vzniku preeklampsie, výzkum v tomto směru by měl dále pokračovat. Disertační práce pojednává o aktuálním tématu, splnila vytčené cíle, použila adekvátní metody a přináší nové poznatky v oblasti porodnictví, ale i klinické biochemie.

Autorka předkládané disertační práce MUDr. Anna Germanová prokázala schopnost a připravenost k samostatné činnosti v oblasti výzkumu a vývoje a splnila tak požadavky a podmínky kladené na disertační práci podle zákona č. 111/1998 Sb. **Doporučuji proto předloženou disertační práci přijmout jako podklad k udělení titulu Ph.D. v oboru biochemie a patobiochemie.**

V Praze 29.8.2014

Doc. Ing. Razouvan Bilek, CSc.
Endokrinní ústav v Praze