

Disertační práce „*Jiné faktory ovlivňující denní hladinu melatoninu*“

Autor: MUDr. Beáta Rác

Oponentský posudek

Struktura práce, formální úprava

Disertační práce se skládá ze 102 textů, z toho je věnováno 40 stran literárnímu úvodu, 10 stran metodickým postupům, 15 stran výsledkům, 6 stran diskuzi a 1 strana závěru. Autorka použila celkem 207 prací jako literární zdroje.

Přiložen je seznam vlastních publikací (2 práce v *Supplementum Physiological Research*, jedna z nich právě přijata do tisku. Na jedné z prací je Dr. Rác prvním autorem, na druhé je v pořadí třetím členem týmu). Kromě toho uvádí autorka seznam neimpaktovaných prací a prací, které nemají vztah k tématu disertační práce.

Na závěr disertační práce jsou přiloženy kopie obou publikací s IF a jedné neimpaktované práce, mající vztah k tématu.

Disertační práce má po formální stránce všechny náležitosti, ovšem formátování textu (malý počet znaků na řádek) se mi jeví jako nepatřičné. Práce by potřebovala místy jazykovou korekci, což je pochopitelné vzhledem k tomu, že čeština není mateřským jazykem autorky. V takovém případě je doporučováno, aby práci editoval některý z kolegů nebo aby byla práce napsána v anglickém jazyce.

Drobné připomínky k textu:

- popisy grafů by měly být v jazyce disertační práce

- tabulku na str. 17 je nutné doplnit citacemi

str. 7 – místo „CLOCK geny byly nalezeny“ by mělo být uvedeno „exprese hodinových genů byla zjištěna ...“

str. 7 – výraz „cirkadiánní chybění světla“ je nejasný

str. 9 – citace o regulaci tvorby melatoninu cirkadiánními hodinami by měla být primární práce, nikoliv odkaz na review.

str. 9 – tvrzení založené na citaci Karasek, 2004, že kolem 70. roku života je hladina melatoninu v noci stejná jako ve dne, neodpovídá skutečnosti. Existuje mnoho prací

ukazujících na existenci denního rytmu s vysokou hladinou melatoninu během noci u ještě starších lidí.

str. 34 – Autorka uvádí, že exprese hodinových genů (nesprávně označeno jako CLOCK geny) je v nadledvinách opožděna za SCN. Není však vysvětleno, jakou úlohu mají tyto geny v nadledvině a jak se podílí na regulaci tvorby kortikoidů.

Seznam příloh (str. 102) – pořadí neodpovídá přiloženým publikacím.

Drobné překlepy jsou vyznačeny přímo v textu. Také je vyznačeno, kde chybí citace.

Cíle a hypotéza

Práce se nazývá „Jiné faktory ovlivňující denní hladinu melatoninu“, velká část experimentální práce je však věnována také jiným hormonům či fyziologicky aktivním látkám a proto název nevystihuje dobře obsah disertační práce. Navíc na této druhé části výsledků je zřejmě podíl autorky vyšší než na výsledcích souvisejících s melatoninem, soudě podle pořadí autorů na vyšších publikacích (výsledky s melatoninem – práce Stárka a spol., 2008, výsledky s ostatními hormony – Rácz a spol., 2015).

Hypotéza disertační práce (str. 5) se týká pouze melatoninu, nejsou zmíněny ostatní hormony, jejichž hladiny byly stanoveny a výsledky představují jednu ze dvou předložených publikací. V tomto ohledu vidím nejslabší místo práce právě ve váze, která je dáána reakci melatoninu na úkor ostatních sledovaných hormonů. Je to dáno především tím, že jádro hypotézy, tj. intestinální zdroj systémového melatoninu je značně kontroverzní. Hormonální role střevního melatoninu není obecně vědeckou komunitou přijata a převažuje názor, že ve střevě tvořený melatonin (stejně jako melatonin tvořený v jiných extra-pineálních lokalitách) má pouze parakrinní úlohu. Systémové hladiny melatoninu měřené v tělesných tekutinách jsou dány produkcí z epifýzy. Během dne, kdy epifýza melatonin neprodukuje, jsou tyto hladiny na hranici detekce v závislosti na citlivosti použité eseje. Tvorba melatoninu v epifýze je časově velmi přesně regulována cirkadiánními hodinami a tato regulace je nezbytná pro zajištění hlavní úlohy melatoninu v těle, tj. zprostředkování výstupu z těchto hodin a převodu jejich rytmického signálu na fyziologické funkce v těle. Melatonin je hormon tvořený jako signál délky a načasování subjektivní noci. Již z této podstaty je nutné, aby systémové hladiny hormonu neodpovídaly pokud možno na jiné signály než ty, které souvisí s cirkadiánními hodinami. Proto není jasné, jakou fyziologickou úlohu by mělo mít případné ovlivnění hladin melatoninu příjmem potravy ve dne, kdy je žádoucí, aby absence hormonu signalizovala v organismu subjektivní den. Je ovšem samozřejmě možné, že hladiny melatoninu ve střevě by na příjem potravy mohly odpovídat, bylo by však nutné tomu uzpůsobit experimentální postup této práce a měřit hladiny melatoninu přímo ve střevě.

Použité metody a experimentální postupy

Studie byla provedena na souboru osmi žen, které poskytly vzorky krve nejprve v průběhu 16 h během dne a následně ve druhém experimentu před snídaní na lačno a poté 5x v průběhu 2 hod. následujících po 4 různých intervencích – tj. po orální aplikaci glukózy, injekční aplikaci glukózy, příjmu potravy (snídaně) a příjmu nekalorické vlákniny (psyllium).

Názvy obou studií „16 hodinové sledování“ či „Sledování po různých stimulech“ nejsou dostatečně deskriptivní tak, aby si čtenář mohl udělat představu o tom, co a jak bylo v těchto studiích sledováno.

Vzhledem k tomu, že byly sledovány hladiny hormonů, které jsou regulovány cirkadiánními hodinami, nejsou v metodické části řádně definovány světelné podmínky studie, ať už ty aktuální během odběrů, tak i světelná historie (expozice světlu během týdne před odběry, roční doba apod.). Je velmi dobře známo, že všechny tyto podmínky mohou mít zcela zásadní vliv na aktuálně naměřené hladiny melatoninu a případně i jiných hormonů.

Účastnice studie by měly být též vyšetřeny na chronotyp, který může zásadně ovlivnit dobu ranního poklesu hladin melatoninu u jednotlivých osob. Tento faktor může významně ovlivnit výsledky a vést k jejich chybné interpretaci. Rozdíl v chronotypu u sledovaných subjektů, kteří byli pravděpodobně zahrnuti také do studie prezentované v disertační práci, je naznačen z výsledků individuálních hladin melatoninu publikovaných v práci Stárka a spol. 2008.

O absenci odběrů v kritických intervalech v době oběda a večere se autorka zmiňuje v závěrech práce. Tento zásadní hendikep by měl však být brán v potaz při interpretaci výsledků a zmíněn jako limitace studie v diskuzi.

Metodické postupy stanovení hladin hormonů nejsou dostatečně podrobně popsány. V disertační práci je obvykle postup metod podrobný natolik, aby bylo dle něj možno postup opakovat a výsledky ověřit.

Hlavní problém vidím ve zvoleném experimentálním postupu, a to především v první části práce. Není vůbec jasné, na základě čeho autorka vyvozuje změnu hladiny hormonů vlivem příjmu potravy a její statistickou významnost. Pokud bylo cílem práce sledovat vliv příjmu potravy na hladiny sledovaných hormonů, pak je zcela nezbytné zahrnout kontrolní skupinu bez příjmu potravy (není třeba absolutního hladovění, stačilo by, kdyby byla tak jako ve druhé části zahrnuta skupina s podáním psyllia). Při současném uspořádání, tj. při sledování fyziologicky se měnících hladin hormonů v průběhu dne (nejen cirkadiánní ale navíc i ultradiánní změny), nelze v žádném případě vyvozovat závěry o přímém vlivu potravy na tyto hladiny (viz dále).

Po formální stránce by měla být metodická část uspořádána tak, aby se zcela totožné kapitoly popisující analytické metody neopakovaly dvakrát.

Statistické vyhodnocení – data byla vyhodnocena metodou ANOVA s faktory čas a subjekt. Nebyl však proveden žádný post hoc test, který by umožnil vzájemné srovnání dat v rámci jednoho profilu. Pouze na základě takového vyhodnocení by bylo možné prohlásit, že hladina v čase X je statisticky významně vyšší či nižší než hladina v čase Y. Statisticky signifikantní rozdíl hodnot mezi jedinci nebyl nikde v celé práci vyhodnocen ani diskutován. Znamená to, že mezi jednotlivými subjekty byly významné rozdíly hladin v daných časech odběru (velká inter-individuální variabilita) a proto by správně měly být vyhodnoceny změny hladin hormonů v průběhu 16 h u jednotlivců a nikoliv pro celou skupinu. V publikaci Stárka a spol., jsou správně tyto hladiny prezentovány a hodnoceny jako jednotlivé profily. Není jasné, proč tomu tak není v disertační práci.

Výsledky a jejich interpretace

Hladiny melatoninu během dne se u člověka pohybují v rozmezí cca 5 – 10 pg/ml. Autorka v disertační práci uvádí jednotky cca 10 nmol/l, domnívám se však, že se jedná o chybu, jelikož v publikaci Stárka a spol. jsou tyto stejné výsledky uváděny v jednotkách ng/l.

V textu výsledkové části jsou profily hladin hormonů interpretovány ve smyslu signifikantních a nesignifikantních změn, avšak tato statistika není nikde dokumentována. Není také vůbec jasné, vzhledem ke kterým hodnotám je změna odečítána, např. na str. 55 se píše: „Hladina estradiolu (Graf 6b) signifikantně poklesla po obědě a večeři“ – dle grafu však hladina klesala již v době mezi 10 hod a 11 hod a též mezi již 16 hod a 17 hod., tj. ještě před jídly.

Změny hladin popisované v textu mnohdy neodpovídají výsledkům na grafech. Například v textu na str. 51 se píše: „Hladiny ghrelinu dosáhly maxima těsně v době oběda a večeře (graf 2a)“. V tuto dobu však nebyla krev odebírána a maximum hladin je však patrné v době před jídly, tj. v 10 hod a 16 hod.

Jak již bylo zmíněno, vzhledem ke zjištěným statisticky významným inter-individuálním rozdílům je zapotřebí sledovat individuální profily hladin hormonů během 16 h intervalu. Z průběhu průměrných hladin melatoninu během tohoto intervalu je patrný náznak mírného poklesu ve 14 hod. (odpovídající době 2 hod po obědě), není však jasné, zda se jedná o statisticky významný pokles vzhledem k času 12 hod a 16 hod., a zda je tento trend prokazatelný nejen v průměrných hodnotách, ale též u jednotlivých subjektů. Z výsledků publikovaných v práci Stárka a spol. (sledováno pouze 5 subjektů) se zdá, že tento pokles by mohl souviset se zahrnutím jednoho subjektu, který byl odebírán pouze v době od 13.15 do 21.30 a měl významně nižší hladiny melatoninu, než byla průměrná hodnota v těchto hodinách. Prezentace individuálních profilů hladin melatoninu by dala odpověď na tuto otázku.

V akutním experimentu, kdy byly hladiny hormonů sledovány ráno během 2 hodin, je patrný největší rozdíl hladin mezi skupinami již při odběru na lačno v čase 0, následně se v dalších odběrových časech jednotlivé skupiny již neliší od skupiny kontrolní, které bylo podáno pouze psyllium. Popisovaný nárůst hladiny melatoninu po aplikaci glukózy (str. 62, graf 12) není statisticky podložen. Podobně interpretace průběhu hladiny kortizolu (str. 63, graf 12) „došlo ke zpomalení poklesu hladiny kortizolu“ vyžaduje statistickou analýzu. Popis výsledků DHEA (str. 65, graf 15) je zcela nejasný. Je potřeba doplnit statistickou analýzu dat celého pokusu 2.

Na základě těchto skutečností (absence kontrolní skupiny, statistického srovnání hodnot mezi jednotlivými hodinami a skupinami, porovnání individuálních profilů apod.) je interpretace získaných výsledků týkajících se vztahu příjmu potravy a změny hladin melatoninu nedostatečně podložená.

Diskuze

Výsledky jsou diskutovány jednostranně, tj. s předpokladem efektu příjmu potravy na hladiny melatoninu a to i při absenci tohoto efektu.

Autorka by měla v diskuzi připustit skutečnost, že běžná strava během dne hladiny melatoninu významně neovlivní, což je v souladu s jeho hlavním účinkem v organismu. Pokud se vliv příjmu potravy na změnu hladiny melatoninu skutečně prokáže, měla by být též diskutována otázka případného fyziologického významu tak malých změn v hladinách melatoninu (kolísajících v rozmezí 5 – 10 pg/ml), které jsou obecně považovány za hladiny na hranici jeho detekce. Změny hladin ostatních hormonů mohou být potenciálně zajímavé v případě, že bude studie provedena tak, aby mohly být tyto změny statisticky prokazatelné.

Otázky pro autorku

Prosím o vyjádření k jednotlivým bodům posudku a především o vysvětlení, na základě čeho bylo usuzováno na významný vliv příjmu potravy na hladiny hormonů, především melatoninu.


Jaký je dle autorky předpokládaný mechanismus, kterým změna hladiny glukózy v těle ovlivní hladinu melatoninu?

V závěru diskuze autorka zmiňuje potenciální význam svých výsledků pro možnost ovlivňování hladiny melatoninu „dietními vlivy“. Pro správnou funkci časového systému a jeho schopnosti regulovat fyziologické funkce je však žádoucí udržení vysokých hladin melatoninu v noci a nízkých hladin ve dne. Bylo by tedy zapotřebí pro zvyšování hladiny

melatoninu přijímat potravu v noci. Takový režim je však pro zdraví jedince velmi rizikový. Jak je tedy myšlen závěr diskuze navrhuující využití získaných poznatků?

Vyjádření o předpokladech autora k samostatné tvořivé vědecké práci a k udělení titulu PhD za jménem

Disertační práce, v té podobě v jaké je předložena, vyžaduje zásadní úpravy dle shora zmíněných připomínek, tak aby splňovala požadavky kladené na vědeckou práci, a to především v interpretaci získaných výsledků vzhledem ke zvolenému experimentálnímu postupu. Nicméně i přes tyto nedostatky prokazuje autorčinu schopnost zpracovat přehledně souhrn literárních údajů a provádět organizačně náročnou experimentální práci s využitím humánních subjektů, která má blízký vztah ke klinickým studiím. Proto doporučuji, aby byl MUDr. Rácz udělen titul PhD.


jméno oponenta: PharmDr. Alena Sumová, CSc., DSc.

dne 20.8.2015