

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 dekádách, 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 (analogy 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