



**UNIVERZITA KARLOVA**  
**Farmaceutická fakulta**  
**v Hradci Králové**

**OPONENTSKÝ POSUDEK DISERTAČNÍ PRÁCE**

**Autor práce:** Mgr. Ondřej Martinec  
**Název práce:** Interakce antiretrovirálních léčiv s membránovými transportéry  
**Školitel:** doc. PharmDr. Lukáš Červený, Ph.D.  
**Studijní program:** Farmakologie a toxikologie

Předkládaná disertační práce Mgr. Ondřeje Martince je zaměřena na studium interakcí antivirotik používaných k léčbě HIV a hepatitidy C s membránovými transportéry exprimovanými ve střevní stěně. Při léčbě HIV a/nebo HCV se používá kombinace antivirotik, což zvyšuje pravděpodobnost výskytu nežádoucích účinků a lékových interakcí. Studium interakcí antivirotik s membránovými transportéry má tedy zásadní význam z hlediska zajištění bezpečné farmakoterapie.

Disertační práce je koncipována jako komentovaný soubor publikací. První část tvoří krátký úvod do problematiky, v němž je stručně popsána funkce ABC transportérů a jejich fyziologická exprese, střevní bariéra a různé modely, které se používají ve farmakologickém výzkumu. Blíže jsou charakterizovány buněčná kultura Caco-2 a ultratenké intestinální řezy, které byly použity jako modelové systémy v této práci. Nejrozsáhlejší úsek úvodní části je věnován popisu HIV a HCV infekce, možnostem jejich léčby a charakteristikám 13 antivirotik, která byla v této práci studována. V úvodní části práce jsou specifikovány cíle práce a výchozí hypotéza. Oceňuji zařazení kapitoly 6, ve které je specifikován podíl doktoranda na jednotlivých publikacích. Následuje krátký komentář ke každé publikaci, v němž jsou stručně shrnuty dosažené výsledky. Následuje závěr práce, v němž jsou stručně shrnuty a diskutovány hlavní dosažené výsledky experimentální práce.

Druhou část disertační práce tvoří pět příložených článků. Čtyři z nich byly publikovány ve velmi kvalitních impaktovaných časopisech, např. *Antimicrob. Agents Chemother.* (2019, IF 4,7), který je v prvním decilu dle AIS i IF. Dvě z publikovaných prací jsou práce typu review a dvě práce experimentální. Disertant je v těchto publikacích 1x první autor a 3x čtvrtý. Pátá práce je v současnosti v oponentním řízení v kvalitním vědeckém časopisu. Výsledky v uvedených publikacích dokumentují rozsáhlou experimentální zkušenost autora. Ve své práci používá pro sledování interakcí antivirotik s membránovými transportéry ultratenké intestinální řezy od lidských dárců a potkanů a buněčnou linii Caco-2, využívá transportní a akumulací testy s modelovým substrátem rhodaminem 123 či metody a přístupy molekulární biologie, jako například RT-qPCR. Z mého pohledu velmi oceňuji použití ultratenkých intestinálních řezů pro sledování transportu léčiv. Jedná se o jeden z mála in vitro systémů,

který umožňuje studium enterocytů v kontextu dalších typů střevních buněk. Kvalitních výsledků bylo dosaženo i díky spolupráci se zahraničním pracovištěm (Univerzita v Groningenu, Nizozemsko), která má mnohaletou zkušenost s přípravou a kultivací tkáňových řezů.

Po formální stránce budí disertační práce jako celek velmi dobrý dojem, je přehledně a čtivě sepsaná a pěkně zpracovaná. Nicméně jako v každé práci většího rozsahu lze i zde nalézt některé formální nedostatky. V textu se vyskytují drobné překlepy a chyby, avšak v množství nepřesahujícím úroveň obvyklou pro tento typ práce. K práci mám následující formální **připomínky**:

- Teoretická část není zcela vyvážená, co se týče rozsahu jednotlivých podkapitol. Informace o střevních transportérech by měly být podrobnější, protože zde zcela chybí údaje o transportérech z nadrodiny SLC, přestože jsou ve střevě exprimovány a vliv antivirotik na tyto transportéry byl studován v rámci práce uvedené v příloze 3.
- V Seznamu zkratk ani v textu není definována zkratka INSTI (str. 29).
- Příloha 2 – ve Fig. 1 a Fig. S8 je pro dárce 1 a 4 použitý stejný symbol a typ čáry, což znemožňuje jejich identifikaci.

Přes všechny připomínky mohu konstatovat, že zmiňované drobné nedostatky nesnižují vědeckou hodnotu předkládané práce.

K práci mám několik **dotazů**:

- 1) Mezi *ex vivo* modely střevní bariéry uvádíte metodu převráceného střeva a Ussingovu komoru. V práci nejsou popsány, mohl byste je tedy stručně popsat a uvést hlavní výhody a nevýhody/limitace jejich použití?
- 2) Na str. 33 uvádíte, že antiretrovirotika ze skupiny nenukleosidových inhibitorů reverzní transkriptasy (NNRTI) narušují katalytické místo tohoto enzymu. Je něco známo o mechanismu tohoto „narušení“?
- 3) Celá řada antiretrovirotik působí jako inhibitory P-glykoproteinu. Jaký je typ této inhibice?
- 4) V příloze 2 (manuskript v recenzním řízení) používáte pro normalizaci množství mRNA ve vzorcích jeden referenční gen, konkrétně *B2M*. Podle MIQE guidelines však není normalizace dat na jeden referenční gen přijatelná, pokud není dokázána jeho stabilní exprese za použitých experimentálních podmínek. Výběr referenčního genu(ů) totiž může zásadním způsobem ovlivnit interpretaci získaných dat. Zkoušeli jste stabilitu i dalších referenčních genů? Pokud jste zkoušeli více referenčních genů, ověřili jste optimální jejich optimální počet pomocí nějakého programu (např. geNorm)? Byla exprese *B2M* stabilní u kontrolních i rifampicinem ovlivněných PCIS?

## **Závěr**

Předkládanou práci hodnotím jako kvalitní vědeckou studii, která splňuje veškeré požadavky kladené na disertační práci. Uchazeč prokázal schopnost a připravenost k samostatné vědecké práci. **Doporučuji tedy předloženou disertační práci k obhajobě, na**

**jejímž podkladě by byl uchazeči udělen akademicko-vědecký titul Ph.D. ve smyslu příslušných právních norem.**

V Hradci Králové, 12.11.2020

doc. PharmDr. Iva Boušová, Ph.D.

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Akademika Heyrovského 1203/8, 500 05 Hradec Králové



**UNIVERZITA KARLOVA**  
Farmaceutická fakulta  
v Hradci Králové