

**Oponentský posudek doktorské disertační práce: MUDr. Petr Potměšil  
„Expresí cytokinů, zvláště chemokinů, po aplikaci acyklických  
nukleosidfosfonátů“**

Předložená disertační práce MUDr. Petra Potměšila je v rozsahu 99 stran, obsahuje 9 kapitol a 10. kapitola je uvedena formou přílohy publikací týkajících se disertační práce. Hlavní cílem této disertační práce bylo přispět k prohloubení poznatků o vlivu acyklických nukleosidfosfonátů (ANP), které jsou používány jako antivirotika s mechanismem účinku potlačování replikací DNA viru a retroviru a objasnit, jakým způsobem ANP ovlivňují expresi cytokinů/chemokinů. Některé z nich jsou velmi důležité z hlediska používání v klinické medicíně jako např. tenofovir (k léčbě infekce virem HIV-1), adefovir (v terapii hepatidy B), cidofovir (k léčbě cytomegalovirové retinitidy u pacientů s AIDS). Teoretická část obsahuje shrnutí nejnovějšího literárního přehledu o daném studijním tématu. Pak následují hlavní cíle této disertační práce, různé metody, výsledky a nakonec je uvedena část diskusní a závěrečná, následovaná 253 citacemi. Chtěl bych zdůraznit, že vlastní výsledky disertace byly publikovány jako 4 původní práce v odborných vědeckých časopisech, u dvou z nich je uveden MUDr. Petr Potměšil jako první autor. MUDr. Petr Potměšil byl také spoluautorem 5 publikací in extenso v impaktovaných časopisech, takže celková jeho publikační činnost představuje 9 publikací.

Téma disertace je nanejvýš aktuální, uvážíme-li, že při chronickém virovém onemocnění, jako je virová hepatitida nebo HIV infekce, je silná inhibice replikace viru rozhodujícím faktorem pro omezení rozsahu systemického poškození. Navíc bylo zjištěno, že některé ANP, jako tenofovir, mají rovněž imunomodulační vlastnosti, které by mohly znamenat dodatečný protivirový účinek. Tenofovir zvyšuje expresi NO a některých cytokinů a chemokinů. Cílem této disertační práce bylo tudíž studovat expresi některých cytokinů a chemokinů po aplikaci ANP za účelem objasnění vlastního způsobu, kterým ANP tuto expresi ovlivňují. Na základě experimentu v průběhu výzkumu byl zkoumán vliv ANP na expresi mRNA pro dva hlavní chemokinové receptory pro vstup HIV-1 do buňky.

K řešení zadaných úkolů použil autor adekvátní metodické postupy odpovídající současným požadavkům. Byly uvedeny chemické struktury testovaných ANP syntetizovaných profesorem Antonínem Holým a kol.

K výsledkům disertační práce.

Autor v uvedených experimentálních podmínkách zjistil, že mnohé ze studovaných sloučenin zvyšují produkci NO, cytokinů TNF- $\alpha$ , IL-10 a chemokinů RANTES, MIP-1 $\alpha$ . Některé hydroxylované deriváty ANP byly testovány pro imunofarmakologický potenciál. Zjistilo se, že i tyto sloučeniny mají také schopnost zvyšovat sekreci NO, TNF- $\alpha$ , IL-10, chemokinů RANTES a MIP-1 $\alpha$ . Tenofovir a nehydroxylované deriváty ANP indukovaly genovou expresi  $\beta$ -chemokinů MCP-1 a MCP-3, ale nikoliv expresi genu MCP-2 a MCP-5. Byl analyzován také možný zásah ANP na genovou expresi IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , SDF-1 $\alpha$  a chemokinových receptorů CCR5 a CXCR4. Expresí těchto molekul

nebyla ale sloučeninami ANP ovlivněna. Aktivace sekrece cytokinů (TNF- $\alpha$ , IL-10) a chemokinů (RANTES) byla inhibována antagonisty adenosinových receptorů. Autor naznačil, že by sloučeniny ANP mohly být nespecifickými ligandy adenosinových receptorů. Zjistilo se, že stimulace produkce NO a cytokinů/chemokinů je zprostředkována transkripčním faktorem NF- $\kappa$ B a že tento efekt je závislý na dávce. Nově syntetizované deriváty ANP jsou mnohonásobně více účinné v sekreci cytokinů/chemokinů než tenofovir.

Práce Dr. Petra Potměšila je precizní a velmi dobře zdokumentována. Já souhlasím s autorem, že sloučeniny ANP by mohly být považovány za antivirotika nové generace, které vykazují nejen vlastní antivirový efekt, ale také imunomodulační. Před klinickou aplikací těchto nových sloučenin bude však požadováno ještě další zkoumání. Kvalita této vědecké práce byla zdůrazněna autorovými publikacemi, které ačkoliv byly uveřejněny nedávno, byly již citovány některými vědeckými pracovníky v současných časopisech.

Oponoval jsem již jednou tuto disertační práci a to v rámci interní obhajoby na Ústavu experimentální medicíny AV ČR. K předložené práci mám tyto následující připomínky a dotazy:

- Přírodně se vyskytující nukleotid adenosin 5'-trifosfát (ATP) a jeho metabolit adenosin nám dávají tušit, že vytvářejí vnitřní část velmi rozsáhlé imunologické sítě přes purinovou signalizaci svých příbuzných receptorů, jejichž exprese se v rozsáhlém měřítku uskutečňuje v těle. Ohromujícím důkazem je to, že ATP a adenosin jsou důležitými endogenními signálními molekulami v procesu imunity a zánětu.  
Předpokládá se, že jejich imunologická úloha je jak interdependentní, tak mnohotvárná, to znamená, že jejich přirozené účinky se mohou posunout z imunostimulačních na imunoregulační účinky nebo naopak a to v závislosti na extracelulární koncentraci rovněž jako na expresi purinergních receptorů a ectoenzymů. Purinergní signalizace přispívá k jemnému vyladění zánětlivých a imunitních odpovědí takovým způsobem, že nebezpečí vůči hostiteli je výkonně eliminováno s minimálním poškozením zdravé tkáně. Autor předpokládá, že sloučeniny ANP by mohly být ligandy pro adenosinové receptory, což působí logicky. Mohl by autor v kvantitativním slova smyslu komentovat relativní sílu studovaných sloučenin ANP a endogenních sloučenin příbuzných adenosinu v in vitro a in vivo systémech?
- Adenosin a antagonisté (methylxanthiny) vykazují in vivo mnohonásobné efekty, chtěné a nechtěné. Smím se zeptat autora na další potenciální farmakotoxikologické účinky sloučenin ANP in vivo, jiné než antivirové?
- Mohl by autor něco říci k efektu studovaných sloučenin ANP na inhibici a/nebo stimulaci apoptózy z prací, které byly publikovány?


Formální připomínky k práci žádné nemám.

Závěr:

Práce řeší závažné téma, které má nejen teoretickou, ale i praktickou důležitost. Zaměření práce, výběr metod i interpretace výsledků jsou na velmi dobré odborné úrovni.

Závěrem konstatuji, že **MUDr. Petr Potměšil** prokázal, že si osvojil základy samostatné vědecké práce a předložený spis splňuje požadavky kladené na doktorskou disertační práci, a proto komisi jednoznačně  
d o p o r u č u j i,  
aby byla práce předložena k obhajobě a na základě úspěšné obhajoby byl uchazeči udělen titul Ph.D.

V Praze dne 25. 10. 2007.



Prof. Dr. H. Farghali, DrSc.