

Posudek oponenta

na disertační práci
Mgr. Kristýny Krasulové

"Studium interakcí léčiv s enzymy metabolismu cizorodých látek"

Předložená disertační práce se zabývá studiem vlivu stereoisomerie na možné lékové interakce, zprostředkované ovlivněním různých forem lidských jaterních cytochromů P450. Zvolené téma je nepochybně velmi aktuální. Pro studium této problematiky byla použita adekvátní metodika: měření inhibičního efektu vybraných léčiv, resp. jejich enantiomerů, na enzymovou aktivitu lidských jaterních mikrosomů vůči substrátům, charakteristickým pro jednotlivé formy cytochromů P450, které potenciálně hrají roli v metabolismu léčiv.

Práce je sepsána v českém jazyce, je vcelku přehledná a čtivá. Text práce je - dnes již poněkud atypicky - „standardně členěn“ na krátký úvod, cíl práce, přehled literatury (označený jako „teoretická část“) o délce 34 stran, experimentální část popisující použitý materiál a metody (15 str.), výsledky (21 str.) a diskusi (7 str.), dále shrnující diskusi označenou jako „závěr“ (3 str.), souhrn/summary a „technické části“ jako je seznam literatury (189 citací) a seznam publikovaných prací disertantky (4 práce přímo související s tématem disertace, z toho dvě prvoautorské, a další dvě práce z oblasti xenobiochemie, 7 posterů a orálních vystoupení na odborných fórech). Celkový rozsah práce je 113 stran, 22 obrázků a 15 tabulek.

Z věcného hlediska je možno konstatovat, že přehled literatury podává stručné shrnutí dostupných informací o hlavních formách lidských cytochromů P450, podílejících se na metabolismu xenobiotik, dále se zabývá přehledem možností lékových interakcí, doplněným poněkud podrobnějšími pasážemi o stereoisomerii léčiv a stereospecifickém metabolismu léčiv. Zde bych snad podotkl, že bych byl považoval za účelnější, aby se text více zaměřil právě na tuto oblast, která je jádrem disertace, a je podstatně méně známá, než předchozí pasáže. Autorka se omezuje spíše na uvedení „příkladů“ a nevytkla si zde za cíl shrnout současné znalosti. Z formálního hlediska se mi - s ohledem na celkový rozsah textu i na rozsah této části disertace - nezdá příliš šťastné členění a číslování „na šest úrovní“, zejména když mnohé takto označované „kapitoly“ jsou opravdu pouhé odstavce o rozsahu několika řádků (např. 3.3.3.1.1.1 nebo 3.3.3.2.1.2); pravděpodobně by zde stačilo vyznačení obsahu odstavce např. zvýrazněním příslušného termínu tučným řezem písma.

Výsledková část vcelku přehledně prezentuje získaná data, jejichž diskusi a vyvozované závěry považuji za relevantní a adekvátní. Z pohledu obhajoby práce jsem při čtení disertace

poněkud postrádal informaci o tom, která z prezentovaných dat již byla publikována a kde, resp. jak souvisejí práce autorky uvedené na konci disertace s jednotlivými prezentovanými experimenty. Domnívám se, že by bylo vhodné, aby disertantka tyto informace, stejně jako informace o tom, jaký byl její vlastní podíl na uvedených publikacích, resp. prezentovaných výsledcích, uvedla v průběhu obhajoby.

Uvedené připomínky nijak nesnižují celkově vysokou úroveň předložené disertační práce, kterou proto **doporučuji k obhajobě** a v případě úspěšné obhajoby jako základ k získání akademického titulu Ph.D podle §47 zákona o vysokých školách (Zák. 111/1998 Sb. v platném znění)

K práci a její obhajobě mám následující dotazy:

1. V práci je použito indikačních pro jednotlivé formy cytochromů P450, které umožňují sledovat jejich aktivitu i ve směsných mikrosomech. Obvykle stačí vědět, že takové substráty jsou metabolizovány výlučně nebo skoro výlučně danou formou. S ohledem na předkládané výsledky resp. jejich interpretaci by však také bylo dobré vědět, zda tyto substráty nemohou *ovlivňovat aktivitu jiných forem* (např. inhibicí). Jsou taková data známa z literatury?
2. S odkazem na obr. 10, tab. 8. a obr. 11 se na str. 61 práce uvádí, že (2S, 4R)-(-)-KET vykazoval statisticky signifikantně silnější inhibici pro midazolam než druhý testovaný stereoisomer. Data na zmiňovaném obrázku 10 (a koneckonců ani číselné hodnoty v tabulce 8) mne o tom nijak nepřesvědčují. (Předpokládám, že jde o prostřední panel ve sloupci A obr. 10.) Bylo by možno v rámci obhajoby prezentovat tento výsledek v „plné velikosti“, včetně fitované křivky, z níž byly odečteny hodnoty pro tabulku 8? V jakém vztahu jsou obr. 10 a tab. 8 a na druhou stranu obr. 11, 12 a tab. 9? Jedná se o data z týchž experimentů (jen jinak zpracovaná), nebo jde o nezávislé experimenty?
3. Z mého pohledu by se jevil zajímavé ověřit a vysvětlit metodou molekulárního modelování také alespoň některý z výsledků, kde nebyly pozorovány větší rozdíly mezi enantiomery, které přitom všechny inhibují. Byl učiněn nějaký takový pokus?

V Praze, 17. 10. 2017

Prof. RNDr. Jiří Hudeček, CSc.



**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
Katedra buněčné biologie a genetiky**

Oponentský posudek na disertační práci

Mgr. Kristýny Krasulové

Studium interakcí léčiv s enzymy metabolismu cizorodých látek

Dizertační práce Mgr. Kristýny Krasulové se zaměřila na aktuální problematiku ve farmakologii a to zjistit, zda existuje stereo-specifická inhibice biotransformačních enzymů rodiny cytochromu P450 s vybranými komerčně dostupnými léčivy, která se vyskytují často jako směs optických izomerů. Vzhledem k tomu, že lidské tělo je založeno na absolutní potřebě L-aminokyselin či D-sacharidů, je nanejvýš významné toto znát, neboť rozdílnosti inhibice by mohlo být využito ke zkvalitnění léčby zavedením jen jednoho izomeru do léčebného přípravku. Protože většina zejména orálně podávaných léčiv prochází jak střevem, tak játry, kde jsou koncentrace cytochromů P450 nejvyšší, je znalost interakcí těchto optických izomerů nutná pro vyloučení možných mezi-lékových interakcí, ke kterým při farmakoterapii může docházet.

Zvolená metodika i postupy, které byly použity ke studiu zamýšlených interakcí daných optických izomerů s nejdůležitějšími členy rodiny cytochromu P450 jsou adekvátní a splnily vytyčené cíle. Disertační práce je kvalitně zpracována a je podpořena i adekvátními publikacemi v zahraničních časopisech s impakt faktorem.

Nicméně i v této práci je několik drobných nedostatků, kterým se šlo vyhnout:

Např. u většiny obrázků není odlišený název a popis, což snižuje přehlednost toho, co je regulérní text a co popis obrázku.

V některých tabulkách jako např. 8/9 jsou uvedeny hodnoty SD s rozdílným počtem platných desetinných míst od počtu desetinných míst průměru.

Na str. 57 – v tabulce 7 se vyskytuje koeficient „alfa“ i „ α “, což je matoucí.

Dále, reference na použité rovnice by měla být přesnější (reference 158 je nekompletní). Není zcela zřejmé, kde se dané rovnice v knize nacházejí. Plus „zjevná“ (aparentní) Michaelisova konstanta/limitní rychlost inhibované reakce by měly být značeny zcela odlišně, jinak některé z uvedených rovnic nedávají smysl.

Na str. 28 – Xenobiotika jako fenobarbital, fenytoin jsou nesprávně označena za ligandy CAR.

Na str. 63 – Uvedení popisu obrázku, že se jedná o IC₅₀ křivky ketokonazolu je chybný. Není zřejmá závislost IC₅₀ na koncentraci. Navíc, osa x prostředního grafu je chybně popsána.

Na str. 63 vs 64 – Isomery ITRakonazolu jsou ve většině textu označeny jako ITZ ale v tabulkách ITR.

Na str. 73 a 74 – Felodipin nese jednou označení R-/S-, podruhé (+)/(-). Měla by v celém textu panovat konzistence.



**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
Katedra buněčné biologie a genetiky**

Na str.87 – První odstavec, poslední věta: Uvádění rozmezí plazmatických koncentrací TAMsulosinu v nmol (což není jednotka koncentrace) není vhodné.

Na str.26 uvedena informace o roli estrogenního receptoru alfa v regulaci CYP2A6 a zároveň zmínka o nedefinované roli např. HNF4alfa, glukokortikoidního receptoru. Tyto role nejen v regulaci tohoto cytochromu jsou relativně dobře prozkoumané.

Celkový dojem z předkládané práce je kladný, práce je čtivě napsaná a mám k dané práci následující dotazy:

- 1) Na str.66 – Je tvrzení, že hodnoty IC_{50} pro TAMsulosin měřeno jako hydroxylace midazolamu přesáhly hodnotu $100\mu M$ (obr. 13). Dle uváděného obrázku to však není pravda. **Prosím o vysvětlení, z čeho tato interpretace dat vychází?**
- 2) U TAMsulosinu je uvedeno (str.87), že dosahuje nízkých koncentrací v plazmě a tak dopad inhibice CYP3A4 není klinicky jasný. Nicméně značné množství CYP3A4 se nachází i v enterocytech. **Jaké jsou koncentrace TAMsulosinu ve střevě?**
- 3) **V čem se liší alely CYP2C9/19, které byly testovány (str.82), na úrovni primární struktury?**
- 4) Na str. 63 – v tabulce 8 jsou uvedeny signifikance, ale není vysvětleno, vůči čemu bylo co testováno. Navíc, pro CYP2C19 je vidět rozdíl mezi ITR A/B a ITR C/D, ale není signifikance. **Prosím o celkové vysvětlení podstaty statistického testování.**
- 5) Na str.64 – Je zmínka, že pokles aktivity některých CYPů byl při $100\mu M$ koncentraci diastereoizomerů ITRakonazolu pouze 60%. Nicméně v tabulce 8 (str.63) je uvedená hodnota IC_{50} větší jak $50\mu M$. Pokud byly testovány koncentrace až $100\mu M$, **proč není uvedeno v tabulce, že hodnoty IC_{50} jsou větší jak $100\mu M$?** Navíc, je zde i uvedena zmínka o rozdílu mezi testovanými izomery ITRakonazolu na CYP2B6, CYP2C9 a CYP2D6 aktivitách. **Odkud toto tvrzení pochází?**

Předloženou práci doporučuji k obhajobě a po zodpovězení dotazů navrhuji, aby kandidátce byl udělen akademický titul doktor ve zkratce Ph.D. dle § 47 Zákona o vysokých školách č.111/98 Sb.

V Olomouci dne 16.10.2017

doc. Ing. Radim Vrzal, Ph.D.