

OPONENTSKÝ POSUDEK

doktorské disertační práce

„Vliv střevního mikrobiomu na metabolismus léčiv v experimentálních modelech.“

Autorka práce: Mgr. Nina Zemanová

Obor: Lékařská chemie a klinická biochemie, Univerzita Palackého v Olomouci, Lékařská fakulta

Školitel: doc. RNDr. Eva Anzenbacherová, CSc.

Oponent: prof. MUDr. Stanislav Mičuda, PhD., Ústav farmakologie, Lékařská fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova

Jedná se o kvalitní disertační práci, která splňuje všechny odborné i formální požadavky.

Posuzovaná disertační práce je prezentovaná klasickou formou včetně vložení kapitol s detailním popisem metod a dosažených výsledků. To je plně v souladu s pravidly pro sestavování vědeckých spisů tohoto charakteru. Řazení práce je velmi přehledné a obsahuje souhrn, obsah, graficky velice povedený úvod, cíle, metody, výsledkovou část, diskusi, závěr, přehled publikační aktivity autorky a seznam použité literatury (autorka cituje 114 převážně recentních publikací). Práce je psaná čtivě a srozumitelně, bez gramatických chyb. Prezentované informace jsou logicky provázané do smysluplného celku.

Po odborné stránce je práce zaměřená na **4 cíle**: 1) popsat vliv střevního mikrobiomu a akutního a chronického stresu na genovou expresi transkripčních faktorů a základních isoform cytochromu P450 zapojených do metabolismu léčiv, 2) vypracovat HPLC metodu na stanovení metronidazolu a jeho hlavního metabolitu, 3) prostudovat vliv mikrobiomu na plazmatické koncentrace metronidazolu a jeho primárního metabolitu 2-hydroxymetronidazolu, 4) zjistit, zda-li změny střevního mikrobiomu mění vliv metronidazolu na mRNA expresi a aktivitu vybraných isoform CYP450.

Ke studiu těchto cílů **byly vybrány odpovídající metody**. Ocenit lze jak zvolený model bezmikrobních myší vyžadující jak odpovídající špičkové zázemí vivária, tak i pečlivě provedenou studii stanovení exprese a aktivit jednotlivých isoform CYP450. **To umožnilo získání několika důležitých nových poznatků**, například popsání rozdílného charakteru změn exprese isoform CYP450 u chronického stresu mezi standardními a bezmikrobními zvířaty, nebo výrazné indukce Cyp2b10 po podání metronidazolu. **Diskuse i závěry** jsou poučné a vhodně interpretují dosažené výsledky v kontextu recentních poznatků.

Publikační aktivita autorky splňuje kritéria pro obhajobu disertační práce.

Předkladatelka je první autorkou třech původních prací v časopisech s nadprůměrným impakt faktorem (další práce je odeslaná k posouzení) a rovněž spoluautorkou dalších 2 původních prací v časopisech s impakt faktorem. Tyto práce našly již 6 citačních ohlasů s *h*-indexem 2 dle Scopus. V rámci postgraduálního studia je to nepochybně výborný publikační výkon.

Připomínky oponenta:

- V úvodu by byla nápomocná tabulka nebo graf sumarizující dosavadní znalosti o vlivu střevního mikrobiomu na hodnocené isoformy CYP450 a jejich regulující nukleární receptory.

Dotazy oponenta:

- Ač to lze z textu částečně dovodit, asi by bylo vhodné dovysvětlit, proč byl vybrán pro experimenty zrovna metronidazol?
- Jsou nějaká data o vlivu stresových mediátorů typu adrenalinu, noradrenalinu a kortizolu na expresi a funkci hodnocených enzymů? Je u nich popsána nějaká dávková/koncentrační závislost? Jsou nějaké rozdíly mezi lidskými a myšími modely?
- Metronidazol vykazoval významný indukční efekt na expresi Cyp2b10, což by naznačovalo jeho stimulující vliv na CAR receptor. Diskrepance ve vlivu na mRNA expresi tohoto receptoru u SPF a GF kmenů naznačuje spíše přímý agonismus. Existují v tomto smyslu nějaká data v literatuře?
- Mohla by autorka specifikovat podíl na provedených metodách?

Závěr:

Předložená disertační práce splňuje všechny formální i odborné požadavky kladené na kvalifikační spis této kategorie. Autorka se podílela na vzniku 6 původních vědeckých prací publikovaných v časopisech s vysokým impakt faktorem včetně třech prvoautorských publikací, což překračuje požadavky na obhajobu disertační práce na Lékařské fakultě UP v Olomouci. Mgr. Nina Zemanová tedy prokázala schopnost realizovat kvalitní vědeckou práci v celém rozsahu, tj. od vypracování rešerše, přes plánování a provádění složitých metod až po zpracování dat a jejich odpovídající vědeckou prezentaci.

Doporučuji proto kladné přijetí disertační práce a její podstoupení k dalšímu řízení, jehož zakončením bude udělení vědeckého titulu Ph.D.

V Hradci Králové dne 6. 1. 2022

Prof. MUDr. Stanislav Mičuda, PhD.
Ústav farmakologie
LFUK v Hradci Králové

Posudek oponenta

na doktorskou disertační práci Mgr. Niny Zemanové
s názvem

"Vplyv črevného mikrobiómu na metabolizmus liečiv v experimentálnych modeloch"

Předložená disertace se zabývá aktuální problematikou. Střevní mikrobiom je v posledních zhruba dvou dekadách předmětem intenzivního studia; vzdor tomu je jeho role v metabolismu xenobiotik stále relativně málo známá. S ohledem na proměnlivost mikrobiální střevní flory a její ovlivnění různými aspekty nutričními, etnickými a pod., je přitom potenciální modulace přeměny chemických látek, zejména léčiv, důležitou stránkou jejich působení na organismus. Je tak možné konstatovat, že téma práce je bezesporu vědecky zajímavé a prakticky významné.

Cílem práce bylo sledovat vliv střevního mikrobiomu na farmakokinetiku v myším experimentálním modelu s odlišným stavem mikrobiomu, sledovány byly enzymové aktivity jaterních mikrosomálních P450, jakož i regulace jejich exprese. Hodnocen byl vliv stresových faktorů a léčiva metronidazolu. Úkolem, který přitom musela disertantka vyřešit, bylo vypracování vhodné analytické metody pro stanovení metronidazolu a jeho hydroxylovaného metabolitu v malých objemech; tato metoda pak byla využita pro sledování plazmatických koncentrací léčiva i metabolitu a jejich ovlivnění mikrobiomem. Zvolené metody jsou adekvátní cílům práce.

Práce má 101 stran a je sepsána "klasickým stylem", tj. jako plnohodnotný text se standardními částmi (Úvod - stručné shrnutí aktuálního stavu problematiky, v rozsahu 43 stran, dále Cíle práce, Experimentální část s podrobným popisem použitých metod, Výsledky v rozsahu 21 stran, Diskuse, Závěry). Disertační práce obsahuje celkem 30 obrázků (zčásti označených a číslovaných jako "grafy") a sedm tabulek, dále celkem 114 odkazů na literaturu (převážně na originální cizojazyčné práce). Protože předložený text je sepsán ve slovenském jazyce, netroufám si jakkoliv posuzovat jeho jazykovou správnost (ačkoliv mám ke slovenskému jazyku jistou "rodinnou afinitu"), nevím také jak je po formální stránce tato možnost upravena pro doktorský studijní program akreditovaný v českém jazyce. Ale ani jedna z těchto otázek není pro posouzení práce podstatná (podobně jako hodnocení autoreferátu, který jsem bohužel neměl v době zpracovávání posudku k dispozici). Z hlediska hodnocení formální stránky disertace bych řekl, že je mi "klasická" forma sympatičtější než "komentovaný souhrn publikací", je rozhodně čtivější a pro čtenáře příjemnější. Na druhou stranu je třeba zdůraznit, že předložená disertační práce tématicky souvisí s celkem šesti publikacemi, na nichž se disertantka autorsky podílela (z toho ve čtyřech případech jako první autorka) - tím nepochybně splnila požadavky na kladené v tomto směru na doktorskou disertaci. Pro oponenta (a dost možná i pro další čtenáře) by přitom nebylo bez hodnoty ani přiložení kopií těchto prací, i když ve zvoleném formátu práce není požadováno.

Celkově práci hodnotím kladně a podle mého soudu dostatečně dokumentuje způsobilost disertantky k samostatné vědecké práci a prezentaci výsledků. Toto konstatování předdesílám následující pasáži - drobnějším připomínkám a dotazům k textu - aby bylo zřejmé, že nijak nesnižují kvalitu práce.

1. Určení selektivity nově vypracované HPLC metody stanovení (odd. 5.2.2.) je podle mého soudu možno vztahovat pouze na zkoumanou soustavu (stanovení metronidazolu vedle jeho 2-OH metabolitu v krevní plazmě), nejde však o obecně platný parametr analytické selektivity. Domnívám

se, že k získání této charakteristiky by bylo potřebné provést stanovení za přítomnosti bohatšího spektra potenciálně rušících analytů (např. dalších nitroimidazolových antibiotik).

2. Přiznám se, že moc nechápu poslední odst. 2.2.1. Štruktúra CYP (na str. 21), kde se píše "*Na proximálnom povrchu proteínu sa vyskytujú inzerce ďalších aminokyselinových zvyškov, ktoré formujú J' helix, ktorý predlžuje časť polypeptidového reťazca nazývanú "meander" oblasť a tá predchádza β -otočke obsahujúcej cysteín.*" V jakém je vztahu k předcházejícímu odstavci a k Obr. 3? Vůči čemu je povrch "*proximální*" - vůči membráně, cytoplasmě? V jakém smyslu se zde mluví o "*inzercích*" - stejně jako v předchozím odstavci ve smyslu "vnoření do membrány"? nebo s ohledem na porovnávání primárních struktur různých forem P450? - pokud takto, jakých? V následující větě je uvedeno "*molekula cysteínu ... poskytuje esenciálny thiolový ligand pre hemové železo.*" Jedná se o stejný cystein? V jakém smyslu je esenciální? Jde skutečně o "*molekulu cysteínu*"?

3. I když se, jak jsem uvedl, necítím oprávněn hodnotit jazyk práce, přece mne některé formulace "*tahají za uši/oči*" a jsou nejspíš jazykově nesprávné, namátkou např. počáteční věta prvního odstavce na str. 28 (neshoda "*Znalosť ... sú nevyhnutné ...*") nebo na str. 29 v předposledním odstavci opakování "*vplyv ochorenia má spravidla negatívny vplyv ...*"), popř. formulace "*posun v relatívnom zastúpení týchto bakteriálnych kmeňov vedie k zvýšenej kapacite získavania energie zo stravy ...*" na str. 41, kde je poněkud zatemněn i smysl. Myslí se "posunem" změna? "zvýšenou kapacitou" zefektivnění či skutečně kapacita? Kdo lépe "získává energii" - bakterie nebo jejich hostitel?

Pro diskusi v rámci obhajoby mám následující dotazy:

1. Čím si vysvětlujete rozdíl v odezvě (expresi transkripčních faktorů) na chronický a akutní stres, jak jej zobrazuje Graf 1 a Graf 2? Jde skutečně o udržování homeostáze mikrobiomem (str. 79, 3. odstavec)? Nemůže být ve hře rozdílná povaha stresu (uzavření/ochrana teritoria dominantním samcem) - v této souvislosti by bylo dobré stručně popsat provedení stresového experimentu pro chronický stres, v Metodách na str. 47 je pouze odkaz na literaturu.

2. Naopak pro odezvu v expresi mRNA P450 se (alespoň pro některé formy - CYP1A1/1A) jeví být situace zčásti opačná, exprese se stresem snižuje, a to více pro chronický stres (Graf 3, 4 vs. 5,6), možná to platí i pro aktivitu (Graf 7). Porovnání čtenáři stěžují rozdíly v "panelu sledovaných forem" CYP), jsou k dispozici plně kompatibilní data pro mRNA?

Závěrem shrnuji, že předložená disertační práce plně dokumentuje, že Mgr. Nina Zemanová je schopna samostatně tvůrčím způsobem vědecky pracovat, a splňuje tak požadavky čl. 44 Studijního a zkušebního řádu UP Olomouc. Práci proto doporučuji k obhajobě.

V Praze, 6. 1. 2021

prof. RNDr. Jiří Hudeček, CSc.