

## **Oponentský posudek dizertační práce Mgr. Josefa Řezníčka: „Interakce antiretrovirotik s lékovými transportéry; vliv na farmakokinetiku“**

Dizertační práce je předkládána k obhajobě před ukončením doktorského studia v oboru Farmakologie a toxikologie na Katedře farmakologie a toxikologie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové. Byla vypracována pod odborným vedením školitele pana Prof. PharmDr. Františka Štauda, Ph.D. a konzultantky paní doc. PharmDr. Martiny Čečkové, Ph.D.

Práce se zaměřuje na aktuální problematiku významu nosičového transportu pro farmakokinetiku antiretrovirových léčiv. Jedná se o velmi vhodně zvolené a zajímavé téma. Nosičový transport významně ovlivňuje farmakokinetické procesy, u některých léčiv jde o vliv dominantní. Zároveň se jedná o častý mechanismus farmakokinetické interakce mezi léčivy navzájem nebo mezi léčivem a jinou látkou. Pro mnoho skupin léčiv je nosičový transport určující děj při průniku přes epitelie, endotel s bariérovou funkcí a pro transport plazmatickou buněčnou membránou. Kombinační intenzivní farmakoterapie HIV je spojená s vysokým rizikem nežádoucích účinků a charakterizuje ji rychle rostoucí portfolio používaných léčiv. Proto má experimentální a klinický výzkum farmakokinetiky včetně interakcí mezi léčivy mimořádný význam pro její optimalizaci.

Výzkum transportérů pro léčiva na vysoké úrovni má na školícím pracovišti dlouholetou tradici a pracoviště dosáhlo v této oblasti mezinárodního uznání. Na kvalitě publikačních výstupů a dizertační práce se projevila hluboká znalost problematiky a dostupnost širšího spektra vhodných metod včetně *in vitro* esejí na buněčných liniích, exprimujících studované transportéry, *in situ* metody duálně perfundované potkaní placenty a *in vivo* farmakokinetických experimentů s potkany Wistar. Některé z metod byly v rámci práce nově zavedeny.

Práce má standardní formu komentovaného souboru publikací, je přehledně uspořádána a pečlivě sepsána. Autor se vyvaroval časté chyby, kterou je prezentace základních informací k tématu příliš extenzivní formou. Správně akcentoval informace se vztahem k jasně formulovaným cílům vlastní práce a studovaným léčivům. Vytýkám příliš stručné komentáře v kapitole 7– jedná se v podstatě o překlady abstrakt publikací. Uvítal bych, kdyby komentář obsahoval také stručnou pasáž s hlavními myšlenkami z diskuze v publikacích, kde autor svoje výsledky rozebere v širších souvislostech a popř. vysvětlí rozporuplná (někdy zdánlivě) zjištění, jako např. v práci 7.2 (II) nesoulad mezi nálezem inhibice transportu abakaviru etravirinem *in vitro* v experimentu s MDCK buňkami, exprimujícími lidské P-gp a BCRP, která nebyla pozorována na modelu duálně perfundované potkaní placenty.

### **Vyjádření ke splnění cílů práce a dotazy oponenta**

**Cíl práce 1:** Pomocí *in vitro* transportních experimentů na MDCKII buňkách exprimujících lidské transportéry popsat, zda je emtricitabin substrátem či inhibitorem P-gp, BCRP, MRP2, OCT1, OCT2 a/nebo MATE1 lékového transportéru.

Cíl práce byl splněn. Originálním zjištěním je, že emtricitabin není substrátem OCT1, OCT2, P-gp, BCRP ani MRP2, ale MATE1.

**Otázka 1:** MATE1 funguje jako efluxní pumpa zodpovědná za sekreci substrátů-kationtů výměnou za H<sup>+</sup> z lumen tubulu. Jde o pH-dependentní antiport. Úprava pH moče se využívá při ovlivňování rychlosti pasivní reabsorpce léčiv v tubulech a tím i jejich exkrece do moči. Existují údaje o tom, zda změnami pH moči může dojít k významnému ovlivnění rychlosti renální eliminace léčiv – substrátů MATE-1?

**Cíl práce 2:** Pomocí metod *in vitro* (akumulační a transportní experimenty s MDCKII buňkami exprimujícími ABC transportéry) a *in situ* (transportní studie přes duálně perfundovanou potkaní placentu) popsat vliv etravirinu na transplacentární přestup tenofoviru disoproxil fumarátu a abakaviru.

Cíl práce byl splněn. Originálním výsledkem je průkaz farmakokinetické interakce mezi etravirinem a tenofoviru disoproxil fumarátem *in vitro* i pomocí modelu duálně perfundované placenty potkana.

**Otázka 2:** Informace o farmakokinetice etravirinu jsou překvapivě neúplné. Etravirin je metabolizován cytochromy P450 a UDP-glukuronosyl transferasou a metabolity z 1. fáze jsou v malém množství (< 2%) vylučovány močí ve formě konjugátů s kyselinou glukuronovou. Na straně 24 uvádíte, že je v nezměněné formě vyloučeno stolicí 94% dávky. Jaká je absolutní biologická dostupnost? Není ve stolici převážně nevstřebaný etravirin? Jaký význam má pasivní transport v případě etravirinu?

**Cíl práce 3:** Pomocí metod *in vitro* (akumulační a transportní experimenty s MDCKII buňkami exprimujícími ABC transportéry a intestinálními Caco-2 buňkami) a *in vivo* farmakokinetických studií na potkanech popsat vliv rilpivirinu na farmakokinetiku (absorpci) abakaviru.

Cíl práce byl splněn. Publikace III obohatila informace o inhibičních vlastnostech rilpivirinu vůči hlavním transportérům pro léčiva a také upozornila na možnost interakce rilpivirinu s abakavirem ve fázi absorpce po perorálním podání, zprostředkované transportéry MDR-1 a BCRP.

**Otázka 3:** Rilpivirin je prakticky nerozpustný ve vodě. Jaký vliv měla tato vlastnost na výzkum inhibičního vlivu látky na transport modelových substrátů v *in vitro* experimentech? Vysvětlete návrh dávek obou léčiv v *in vivo* studii interakce mezi rilpivirinem a abakavirem. Měřili jste radioaktivitu také ve žluči?

**Cíl práce 4:** Pomocí metod *in vitro* (akumulační a transportní experimenty s MDCKII buňkami exprimujícími ABC i SLC transportéry a HEK 239 buňkami) a *in vivo* farmakokinetických studií na potkanech popsat vliv efavirenzu na farmakokinetiku (exkreci) lamivudinu

Cíl práce byl splněn. Publikace IV obsahuje originální a významné poznatky o inhibiční aktivitě efavirenzu vůči OCT1, OCT2, MATE1 a MRP2 transportérům. Důležitým zjištěním je velmi výrazné snížení rychlosti renální eliminace lamivudinu a akumulace léčiva v ledvinné tkáni při současném podání efavirenzu potkanům Wistar.

**Otázka 4.** Vzhledem k dlouhému poločasu beta fáze poklesu koncentrace lamivudinu v plazmě a velmi malé recovery dávky lamivudinu během krátké doby vzorkování v moči při současném podání inhibitoru a naopak krátkému poločasu eliminace efavirenzu - není možné, že inhibiční vliv je přechodný, exkrece lamivudinu se později po podání zvýší a jeho koncentrace v ledvinné tkáni poklesne?

**Cíl práce 5:** Popsat, zda je lamivudin substrátem vybraných ABC a SLC transportérů a studovat s použitím *ex vivo* a *in situ* metod jejich případnou roli v přestupu lamivudinu přes placentu.

Cíl práce byl splněn. Jde o transportní studii velmi vysoké kvality, kombinující celulární a orgánovou úroveň (perfúze placenty potkana) a zahrnující i mikrovilli z lidské placentární membrány (potenciálně snazší extrapolace závěrů do humánní medicíny). Pomocí *in vitro* akumulačních a transportních experimentů na MDCK buňkách a vzorků lidské placenty bylo zjištěno že lamivudin není substrátem P-gp, BCRP nebo MRP2. Transport lamivudinu byl významně urychlen v buňkách exprimujících MATE1 a také experimenty se vzorky lidské placenty ukázaly na možné zapojení MATE1 do transplacentárního transportu látky. Úroveň

exprese MATE1 a kinetické údaje ale zatím nedokládají přesvědčivým způsobem, že protein má významnější podíl na transportu látky přes lidskou placentu.

**Cíl práce 6.** Pomocí *in vitro* transportních experimentů na MDCKII buňkách exprimujících lidské ABC transportéry a *in situ* metody duálně perfundované potkaní placenty zjistit, zda je efavirenz substrátem P-gp, BCRP nebo MRP2.

Pro metodické problémy, vyplývající z fyzikálně-chemických vlastností léčiva, byl cíl práce splněn částečně. Na buněčné úrovni se podařilo prokázat, že efavirenz není substrátem P-gp, BCRP ani MRP2. Při perfúzních experimentech s potkaní placentou docházelo k adsorpci léčiva na povrch PVC hadiček a experiment nešlo vyhodnotit.

#### **Publikační aktivita uchazeče**

Mgr. Řezníček je prvním autorem čtyř původních prací *in extenso* v časopisech s impaktním faktorem, týkajících se tématu práce, a spoluautorem dalších dvou. Jedná se renomované časopisy se středním a vyšším IF (rozmezí 1,9 až 4,5) a náročným recenzním řízením.

#### **Závěr a doporučení.**

Předložená dizertační práce je velmi kvalitní. Obsahuje mnoho originálních poznatků o nosičovém transportu antiretrovirových léčiv a jeho vlivu na farmakokinetické vlastnosti a interakční potenciál studovaných látek. Mgr. Řezníček prokázal schopnost dobře teoreticky a prakticky zvládnout náročné výzkumné projekty a mnoho experimentální technik. Publikační aktivita uchazeče převýšila požadavky na studenty PGS na UK.

**Proto doporučuji komisi pro obhajobu, aby přijala dizertační práci jako podklad pro udělení akademického titulu Ph.D.**

V Hradci Králové, 14. 8. 2018

---

Doc. Ing. Jaroslav Chládek, Ph.D.  
Ústav farmakologie  
Univerzita Karlova v Praze  
Lékařská fakulta v Hradci Králové