

OPONENTSKÝ POSUDEK DISERTAČNÍ PRÁCE

Autor: **Mgr. Diana Dimunová**

Název: **Úloha UDP-glykosyltransferas vo vývoji liekovej rezistencie u parazitických hlístovcov**

Základní parametry práce: **jazyk práce – slovenština, 56 str. (část bez přiložených publikací 62 str.), 103 citací, 7! publikací (3 spoluautorské a 3 prvoautorské - z toho 2 v recenzním řízení, + 1 spoluautorská publikace nevztahující se k tématu disertační práce).**

Předložená disertační práce navazuje na dlouhodobý výzkum skupiny kolem prof. RNDr. Lenky Skálové, Ph.D. i školitelky doc. Ing. Petry Matouškové, Ph.D. (Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra biochemických věd) zaměřený na výzkum mechanismů vzniku rezistence na xenobiotika.

Vědecký záběr výzkumného týmu na katedře biochemických věd aktuálně zahrnuje zejména problematiku efektu, toxicity a procesu biotransformace účinných látek – anthelmintik, mechanismy vzniku a rozvoje anthelmintické rezistence u parazitických hlístic a osud anthelmintik v životním prostředí.

V této oblasti disertační práce přináší zajímavé dosud nepublikované informace o UDP-glykosyltransferasách (především v systému *Haemonchus contortus* - přežvýkavec), právě ve vztahu k anthelmintikům (především benzimidazolovým), přičemž získané poznatky mohou mít potenciální využití ve veterinární medicíně.

O aktuálnosti a relevanci tohoto realizovaného výzkumu u aktivní, pravidelně publikující výzkumné skupiny nepochybují!

Úvod (celkem 1 str.):

Autorka velmi stručně zasazuje ústřední téma práce do kontextu helmintologie, terapie a rezistence k anthelmintikům s akcentováním předpokladu, že UDP-glykosyltransferasy v procesu vzniku anthelmintické rezistence mohou sehrávat zásadní roli.

Literární přehled (celkem 21 str.):

Literární přehled je rozdělen do dvou rozsáhlých kapitol Gastrointestinálně hlístovce (nematody) přežvýkavců a Biotransformácia anthelmintik.

Kapitola Gastrointestinálně hlístovce (nematody) přežvýkavců (str. 8-20):

V rámci literárního přehledu v této části autorka stručně zmiňuje nejzávažnější parazitické hlístice přežvýkavců a seznamuje čtenáře s jejich základní biologií, včetně experimentálního organismu zahrnutého do disertační práce – *Haemonchus contortus*, kde se podrobněji věnuje i diagnostice a terapii haemonchózy. Další podkapitoly této části jsou orientovány na anthelmintickou rezistenci - mechanismy vzniku a diagnostiku anthelmintické rezistence. Bohužel pouze krátká stať se věnuje prevenci vzniku anthelmintické rezistence (5 ř. na str. 20).

Nedostatky:

Str. 8-9: Některá vyjádření bez uvedení dalších detailů vyznívají až příliš banálně: „Gastrointestinálne (GI) nematody spôsobujú jedno z najzávažnejších ochorení prežúvavcov.“, „Riziko prenosu parazitov medzi hospodárskymi zvieratami a voľne žijúcimi zvieratami v oboch smeroch je redukované sledovaním životných biorytmov, regulovaním voľne žijúcich zvierat poľovníkmi a okrem toho je ovplyvnené komplexnými interakciami medzi biotopom, klimatickými podmienkami, najmä teplotou a vlhkosťou [1, 2].“

„Environmentálne faktory = typ vegetácie, ročné obdobie, počasie a podnebie.“

Obrázek 1: chybí měřítko.

Obrázek 3: chybí popis obrázku, legenda.

Str. 12: Uvedení základních diagnostických metod v obecné rovině bez dalšího vysvětlení práci podle mého názoru nijak neobohacuje: „FEC (Fecal egg counts)- test počítania vajčiek vo výkaloch hostiteľa. LC (larval culture)- kultivácie výkalov k rozlišovaniu jednotlivých lariev nematod. Post-mortem vyšetrenie - dokázanie dospelého vývojového štádia parazita. Molekulárne metódy diagnostiky = identifikácia jednotlivých druhov pomocou genetických markerov v jadrovej ribozomálnej DNA prostredníctvom PCR a jeho modifikáciami predstavuje efektívny spôsob diagnostiky s nutnosťou prístrojového vybavenia. multiplex-tamden PCR [14] – rozlíšenie viacerých druhov nematod pomocou sady primerov špecifické pre jednotlivé druhy označené sondami. LAMP [15] – modifikácia konvenčnej PCR, izotermická kvantifikácia DNA. ddPCR (droplet digital PCR) [16] – metóda využívajúca mikrofluidny čip s možnosťou identifikácie a absolútnej kvantifikácie DNA viacerých druhov nematod.“

Str. 15: I zde: „Pastviny = rozdelením pastvín na menšie plochy sa dobytok na niekoľko dní až týždňov sústreďuje na menšej ploche pastvín a potom presunie na inú časť s cieľom minimalizovať príjem infekčných lariev nematod a zabrániť nadmernej kontaminácii pastvín.“

Str. 18: Toto vyjádření z mého pohledu není přesné: „Farmakokineticky nešpecificky sprostředkované mechanismy zahrňujú zmeny hladiny enzýmov zapojených do metabolizmu alebo transportu liečiva a následne tak modulujú koncentráciu liečiva, ktoré dosiahne cieľové miesto na receptore. Mechanizmy zmeny koncentrácie účinného liečiva sa niekedy označujú ako nešpecifické, pretože môžu ovplyvniť liečivá z rôznych tried chemických látok a spôsobov účinku [37, 43].“

Otázky:

Str.8: Celá kapitola začíná vetou: „Gastrointestinálne (GI) nematody spôsobujú jedno z najzávažnejších ochorení prežúvavcov.“ **Jaké prosím?**

Tabulka 1: „Najvýznamnejšie druhy gastrointestinálnych nematod prežúvavcov.“ **Mohla by autorka negatívni význam týchto druhů zhodnotit v souvislosti s nákazami malých přežvýkavců v celosvětovém/evropském měříku.**

Str. 13: Kapitola 2.2. Léčba haemonchózy přináší smysluplný přehled, např. tabulka 2. **Proti jakým konkrétním druhům GIN se využívá Derquantel?**

Str. 15: **Jsou známy rezistence GIN k monepantel?**

Str. 16: **Jaké vakcíny (jakého typu) jsou aktuálně používané proti GIN (jakých druhů)?**

Str. 18: Toto vyjádření z mého pohledu není přesné: „Farmakokineticky nešpecificky sprostředkované mechanismy zahrňujú zmeny hladiny enzýmov zapojených do metabolizmu alebo transportu liečiva a následne tak modulujú koncentráciu liečiva, ktoré dosiahne cieľové miesto na receptore. Mechanizmy zmeny koncentrácie účinného liečiva sa niekedy označujú ako nešpecifické, pretože môžu ovplyvniť liečivá z rôznych tried chemických látok a spôsobov účinku [37, 43].“ **Nespecifické mechanismy zodpovedné za vznik anhelmintické rezistence souvisí tedy s hladinou enzymů, a ta souvisí s čím? Vyjádření ...“mechanismus změny koncentrace léčiva...“ nerozumím.**

Str. 20: „molekulárne testy = vzhľadom k tomu, že rezistencia má genetický základ, využitie molekulárnych technológií na identifikáciu rezistentných alel je najspoľahlivejšia metóda rozlíšenia jednotlivých citlivých a rezistentných populácií nematod. Avšak, špecifickosť reagencií používaných pre tieto účely spoločne s prístrojovými nákladmi obmedzujú ich použitie v rutínnej diagnostike [50]. označujú ako nešpecifické, pretože môžu ovplyvniť liečivá z rôznych tried chemických látok a spôsobov účinku [37, 43].“ **Jaké jsou**

aktuální poznatky o molekulárním základu vzniku rezistence a jaký postup k jejímu odhalování byste doporučovala?

Kapitola Biotransformácia anthelmintik (str. 21-28):

V rámci literárního přehledu souvisejícího s touto kapitolou se autorka věnuje podstatě biotransformace anthelmintik založené na detoxifikačních/biotransformačních enzymech, rozdělena a charakterizována typicky ve dvou fázích – Fáze I. a II. Na posledních čtyřech stranách literárního přehledu se autorka věnuje problematice UDP-glykosyltransferas (UGT). Tuto kapitolu považuji v rámci celé práce za nejlépe zpracovanou, jsou uvedeny konkrétní informace a text této kapitoly má logickou strukturu.

Nedostatky:

Str. 21-22: Uvádím na příkladu určité nedokonalosti, především obecnosti bez vysvětlení v některých pasážích textu. „*Oxidačné reakcie uskutočňuje hlavne nadrodina enzýmov cytochrom P450 (CYP). Avšak na tvorbe oxidačných metabolitov sa podieľajú aj flavín-monooxigenasy (FMO), alkohol- a aldehyddehydrogenasy, monoaminooxigenasy a ďalšie antioxidantné enzýmy. Veľké množstvo týchto enzýmov bolo nájdených v genómech rôznych druhov helmintov [53, 54], pričom ich expresia je ovplyvnená vývojovým štádiom helminta [66] a môže byť indukovaná prítomnosťou anthelmintík [61].*“ Ocenil bych např. konkrétní příklady biotransformace konkrétních anthelmintik, včetně názorných schémat.

Str. 23: Nektentuální uvedení *Fasciola hepatica*: „*Metabolizmus anthelmintík je pozorovaný aj u iných kmeňoch helmintov. Trematoda F. hepatica vlastní menšie množstvo CYP génov ako nematoda H. contortus [72], avšak tiež u nej prebieha oxidácia triklabendazolu vo zvýšenej miere v rezistentných kmeňoch [73].*“

„*Okrem toho, aldo-ketoreduktasy a dehydrogenasy/redukasy s krátkym alebo stredne dlhým reťazcom katalyzujú redukciiu xenobiotík. Ich deaktivovaný účinok zabraňuje toxickému pôsobeniu aldehydov a ketónov a zároveň napomáha k mareniu účinku niektorých anthelmintík [54]. Konkrétne u H. contortus bola skúmaná redukcia flubendazolu [78] a u F. hepatica zase redukcia triklabendazolu [79] v spojitosti s anthelmintickou rezistenciou.*“

Str. 24: Nektentuální, pro mne nesrozumitelné, zkratkovité: „*Konjugačné reakcie sú v porovnaní s 1. fázou biotransformácie študované u helmintov menej, aj keď v genóme rôznych helmintov boli transferasy identifikované [53, 54]. Glutathion-S-transferasa (GST) je preto ďalším enzýmom zapojeným do rezistencie metabolizmu anthelmintík.*“

„*Taktiež zastáva úlohu v imunitných reakciách medzi hostiteľom a helmintom, čo sa využíva pri tvorbe vakcín [53].*“

„*Pre 2. fázu biotransformácie liečiv u helmintov ma význam aj konjugácia s glykosidmi. H. contortus takto metabolizuje anthelmintika albendazol, flubendazol na N- a O-glykosidy vo zvýšenej miere v rezistentných kmeňoch [54, 68], pričom rovnaké metabolity boli pozorované aj u C. elegans [69]. Produkcia glykosidových metabolitov benzimidazolov v C. elegans bola taktiež znížená v prítomnosti inhibítora chryzínu. Navyše, ako krok k identifikácii enzýmov potenciálne zodpovedných za biotransformáciu benzimidazolov bola charakterizovaná transkripčná odpoveď UGT génov na prítomnosť liečiva, čo poukázalo na indukciu niektorých z nich [82].*“

Otázky:

Str. 25: „*Podľa prítomnosti zmeny konfigurácie na anomernom uhlíku v molekule hexózy počas reakcie môžeme GT klasifikovať ako inverzné (inverting) alebo retenčné (retaining).*“ Hoci tieto katalytické mechanismy reakcie sú možné, viac študovaný a charakterizovaný je inverzný mechanismus.“ **Jaký je v těchto mechanismech rozdíl?**

Str. 26: **Je známá variabilita UDP-glykosyltransferas na úrovni primární nukleotidové sekvence mezi jednotlivými GIN? Jaká?**

Str. 28: „*Ďalšie insekticídy, cypermetrín, phoxim a chlorfenapyr, zase indukovali expresiu štyroch UGT v parazitických osách Meteorus pulchricornis [97]. Jedným z následných testov pomáhajúcim pri overení*

funkcie vybraných UGT v metabolizme liečiv je utlmenie génov prejavujúcou sa úplnou inhibíciou syntézy danej UGT a zvyčajne vedie k zvýšenej úmrtnosti rezistentných kmeňov po podaní liečiv s rôznymi chemickými štruktúrami.“ Bylo by reálné využití nějakého inhibitoru exprese UGT podávaného současně s léčivem, viz i výsledky publikace 5.6.?

Cíle (celkem 1 str.):

Stručně a jasně definovány.

Výsledky a diskuze (celkem 10 str.):

Tuto část práce považuji za zdařilou. Autorka vždy uvádí publikaci, ke které je daná část výsledků dedikována a stručně shrnuje hlavní výstupy dané publikace.

Otázky:

Str. 30-31: 5.1. Metabolizmus vybraných benzimidazolov v dospelých červoch *H. contortus*.

„Porovnanie metabolických dráh ABZ, RCB (ABZSO) a FLU medzi kmeňom ISE a IRE overilo, že dospelé červy rezistentného kmeňa IRE mali väčšiu schopnosť deaktivovať anthelmintika ako citlivého kmeňa ISE a navyše niektoré metabolity boli identifikované výlučne v kmeni IRE. Najzásadnejšie rozdiely boli pozorované medzi samicami oboch kmeňov.“ Proč nejsou MS metody zahrnuty v literárním přehledu jako diagnostický nástroj rezistence?

Str. 32-33: 5.2. Rodina UDP-glykosyltransferas v *H. contortus*

„Indukcia UGT génov v rezistentných kmeňoch môže mať nejednoznačný pôvod, ale podporuje predpoklad zapojenia týchto UGT do biotransformácie benzimidazolových anthelmintík.“ Proč nejednoznačný?

Str. 36-37: 5.4. Vplyv environmentálnej cirkulácie anhelmintika albendazolu na *H. contortus*

„Aj keď rozdiely boli významné, neboli veľké a je preto potreba brať do úvahy, že kontakt s ABZ a jeho metabolitmi v pastve bol len na obmedzený čas, zatiaľ čo pasúce sa zvieratá sa môžu opakovane živiť rastlinami s ABZ metabolitmi po dlhú dobu.“ Byly publikovány jiné studie, kde byly zaznamenány významné rozdíly mezi kontrolní skupinou a skupinou z pastviny s rezidui anthelmintik?

Závěr (celkem 2 str.):

Shrnutí výsledků práce je stručné a srozumitelné.

Podíl autorky na publikacích zahrnutých do disertační práce (celkem 2 str.):

Děkuji za tento přehled. Jsem si jist, že množství metodických přístupů zvládnutých autorkou je enormní.

Předložená práce je primárně zaměřena na studium molekulární podstaty anthelmintické rezistence u parazitických gastrointestinálních nematod, především u experimentálního organismu *Haemonchus contortus*. V práci jsou definovány některé z aspektů přispívajících k rozvoji rezistence, např. schopnost parazitů inaktivovat anthelmintika prostřednictvím jejich metabolismu, který je zajištěn biotransformačními enzymy, včetně primárně zkoumaných UDP-glykosyltransferas.

Jako zásadní negativum práce vnímám literární přehled, zejména části kapitol 2 a 3. Některá místa těchto kapitol trpí značnou ztrátou logiky toku textu a poklesem jeho kontextuality, viz výše uvedené příklady.

Práce je založena na výsledcích shrnutých v 6 publikacích (3 spoluautorské a 3 prvoautorské - z toho 2 v recenzním řízení), které byly otištěny v kvalitních časopisech, např. prvoautorská práce DIMUNOVÁ, D., MATOUŠKOVÁ, P., NAVRÁTILOVÁ, M., NGUYEN, L. T., AMBROŽ, M., VOKŘÁL, I., SZOTÁKOVÁ, B., SKÁLOVÁ, L. (2022). Environmental circulation of the anthelmintic drug albendazole affects expression

and activity of resistance-related genes in the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. *Science of the Total Environment*. 822: 153527. IF2022 = 7,842!

Vytyčených cílů bylo dosaženo. Mgr. Diana Dimunová během studia evidentně prokázala nejen značnou erudici v molekulární biologii, ale i orientaci v tématech jako biotransformace xenobiotik a anthelmitická resistance. Současně je podle mého názoru zřejmé, že studentka nemá problém formulovat hypotézy a získávat relevantní odpovědi na základě provedené experimentální práce.

Domnívám se tedy, že i přes uvedené výtky práce splňuje podmínky kladené na disertační práci, a proto ji doporučuji k obhajobě.

Brno 12.6.2021

RNDr. Martin Kašný, Ph.D.