

Oponentský posudek na dizertační práci:

## **Study of intestinal transporters and their role in drug absorption**

Autor: Mgr. Martin Huličiak

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 doc. PharmDr. Lukáše Červeného, Ph.D.

Kombinační léčba HIV a hepatitid B a C antivirotiky patří k významným úspěchům farmakoterapie. Vysoceúčinná kombinační antiretroviróvá terapie infekce HIV efektivně potlačuje virovou nálož a podstatně snižuje morbiditu a mortalitu na AIDS. Její současné problematické stránky lze spatřovat v nežádoucích účincích, nedostatečné compliance pacientů, nedostatečné dostupnosti v ekonomicky málo vyspělých zemích a v neposlední řadě v komplikacích spojených s lékovými interakcemi zahrnujícími také léčiva indikovaná na přidružená onemocnění. Perorální farmakoterapií kombinacemi specifických antivirotik s různým mechanismem účinku je možné za optimálních podmínek docílit eradikaci HCV viru až u 95% nemocných. Portfolio antivirotik proti HCV prochází navíc rychlým vývojem, který přináší široké možnosti pro výzkum přinášející informace o potenciálu těchto látek účastnit se farmakokinetických interakcí na úrovni transportu a metabolismu.

Vědecká práce uchazeče se zaměřila především ale nikoli výhradně na velmi aktuální problematiku vlivu efluxních transportérů, zejména transportéru ABCB1 (P-glykoprotein), na střevní absorpci antivirotik proti infekcím HIV, HCV a HBV. Kombinační terapie je trendem u mnoha jiných onemocnění, ale v případě antivirotik je pravděpodobnost lékových interakcí obzvláště vysoká, což doložily i výsledky dizertační práce. Experimentální a klinický výzkum v této oblasti má mimořádný význam pro optimalizaci farmakoterapie, protože je schopen detailně popsat mechanismy interakcí

Školitelské pracoviště má dlouholetou tradici výzkumu membránových transportérů a je v této oblasti mezinárodně uznávané. Uchazeč tak mohl využít široké portfolio kvalitních metod na studium intestinálního transportu *in vitro* a *ex vivo* včetně kultur Caco-2 buněk, potkaních a lidských ultratenkých jejunálních řezů, sledování genové a proteinové exprese transportérů, hodnocení viability preparátů a transportní aktivity pomocí vhodných substrátů a inhibitorů a kvantifikaci léčivých látek a metabolitů metodou LC-MS.

**Hodnocení formální stránky dizertační práce:** Práce má formu komentovaného souboru 4 původních prací s impaktním faktorem publikovaných v renomovaných periodících. Práce je sepsána v anglickém jazyce, má všechny standardní náležitosti a je přehledně uspořádána. Z celkového rozsahu 87 stran je 40 věnováno úvodní teoretické části, která velmi dobře a ve správném sledu podává informace se vztahem k cílům vědecké práce. Jsou pojednány vlastnosti střevní bariéry a mechanismy absorpce léčivých látek, vlastnosti studovaných ABC transportérů, a metabolická aktivita střevní bariéry. Velmi kladně hodnotím navazující kapitoly 1.5 a 1.6, věnované faktorům se vztahem k vlastnostem léčivé látky a organismu, které ovlivňují úplnost absorpce a rozsah presystemové eliminace a tím velikost absolutní biologické dostupnosti po perorálním podání. Dostatečně jsou také představeny a vzájemně srovnány experimentální metody vhodné ke zjišťování vlivu absorpční a metabolické funkce tenkého střeva na farmakokinetiku. Závěr teoretické části je věnován charakterizaci virů HIV a HCV, léčbě infekcí a popisuje základní vlastnosti studovaných antivirotik.

Kladně hodnotím komentáře k předloženým pracím, které přehledně shrnují dosažené výsledky výzkumu, interpretují je ve vztahu k pracovním hypotézám a cílům práce a uvádějí

uchazečův podíl na vzniku publikace. Kapitola Discussion dizertační práce ale také diskuze ve všech publikacích dokládají hluboké porozumění studované problematice a nepostrádají potřebnou kritičnost při extrapolaci získaných poznatků do podmínek farmakoterapie. V kapitole jsou objektivně zhodnoceny výsledky vlastního výzkumu a přednosti a nedostatky použitých metod a vytyčeny směry navazujícího výzkumu. Za pozornost stojí také 207 položek v seznamu citovaných publikací.

### **K teoretické části mám následující dotazy a připomínky:**

**Připomínka 1.** V kapitole 1.3. ABC Transporters na straně 16 uvádíte, že za nejvýznamnější ABC transportéry pro léčivé látky jsou považovány proteiny ABCB1 a ABCG2. Na obrázku 3b jsem ale nenašel ABCG2 (podle symboliky obrázku G2) v žádné tkáni ani ve skupině transportérů s ubikviterní expresí.

**Otázka 1.** V kapitole 1.7.5 *In vivo* Techniques uvádíte, že studie biologické dostupnosti a studie mapující množství léčivých látek a metabolitů v krvi, tkáních a exkretech (mass balance studies) neumožňují určit, zda nízká biologická dostupnost je důsledkem nízké schopnosti permeace nebo intenzivní presystémové eliminace. V literatuře je ale doložena snaha výzkumných týmů řešit tento problém. Jaké uspořádání by musela mít *in vivo* studie biologické dostupnosti, umožňující odlišit vliv neúplné střevní absorpce od ztrát vlivem presystémové eliminace (cesty podání, místa vzorkování krve, podaná léčiva/metabolity, inhibitory)?

### **Hodnocení výsledků výzkumu, splnění cílů práce a dotazy k publikacím:**

**Práce 4.1:** Martinec O, Huliciak M, Staud F, Cecka F, Vokral I, Cerveny L. Anti-HIV and Anti-Hepatitis C Virus Drugs Inhibit P-Glycoprotein Efflux Activity in Caco-2 Cells and Precision-Cut Rat and Human Intestinal Slices. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019;63(11):e00910-19.

V práci byly lékové interakce na úrovni transportu hodnoceny s pomocí *in vitro* modelu obousměrného transportu přes monovrstvu Caco-2 buněk a s pomocí *ex vivo* akumulární studie využívající izolované ultratenké řezy (PCIS) z potkaního ilea a lidského jejunu. Inhibiční potenciál antivirotik (celkem 13 léčiv) byl hodnocen pomocí rhodaminu 123, modelového substrátu pro ABCB1 transportér. Výsledky ukazují, že transportní aktivita ABCB1 ve střevě není významně inhibována abakavirem, zidovudinem, TDF, etravirinem a rilpivirinem, zatímco byl zaznamenán inhibiční účinek lopinaviru, ritonaviru, saquinaviru, atazanaviru, maravirocu, ledipasviru a daclatasviru. Výsledky inhibičních studií v kulturách Caco-2 buněk a v potkaních PCIS byly dobře srovnatelné, zatímco výsledky akumulárních studií s PCIS z jejunu dárců byly interindividuálně variabilní, v případě inhibitorů HIV proteázy se shodovaly a u antivirotik z jiných skupin byly pozorovány rozdíly.

**Otázka 2:** Jaké podmínky *ex-vivo* experimentu je nutné dodržet a jaké faktory a další děje, ovlivňující střevní absorpci, je nutné uvážit, aby bylo možné závěry o riziku lékových interakcí z akumulárních studií s PCIS přenést do podmínek farmakoterapie?

**Práce 4.2.** Huličiak M, Vokřál I, Holas O, Martinec O, Štaud F, Červený L. Evaluation of the Potency of Anti-HIV and Anti-HCV Drugs to Inhibit P-Glycoprotein Mediated Efflux of Digoxin in Caco-2 Cell Line and Human Precision-Cut Intestinal Slices. *Pharmaceuticals* (Basel). 2022 Feb 18;15(2):242.

Studie hodnotila interakce antivirotik na úrovni ABCB1 zprostředkovaného efluxu ve střevě. Asunaprevir, atazanavir, daklatasvir, darunavir, elbasvir, etravirin, grazoprevir, ledipasvir, lopinavir, rilpivirin, ritonavir, saquinavir a velpatasvir inhibovaly transport digoxinu v buňkách Caco-2 a hPCIS. Abakavir, dolutegravir, maravirok, sofosbuvir, tenofovir-disoproxyl-fumarát

a zidovudin ABCB1 neinhibovaly. Porovnání experimentálních modelů Caco-2 a hPCIS ukázalo, že Caco-2 je citlivější, ale výsledky získané pomocí hPCIS lépe souhlasí se závěry in vivo studií. Při použití digoxinu jako substrátu sondy ABCB1 bylo identifikováno více inhibitorů než v práci 4.1 při použití rhodaminu123. I vzhledem k více vazebným místům na ABCB1 je zřejmé, že interakční potenciál je potřeba testovat zvlášť pro každý případný substrát, který je často předepisovaným léčivem a jehož souběžné použití s antivirotyky je pravděpodobné.

**Otázka 3.** Velmi zajímavou léčivou látkou z pohledu vámi studovaných interakcí je dabigatran etexilát. Co ukázaly publikované studie s Caco-2, PCIS, případně in vivo FK studie o jeho případných interakcích s ARV a DAA?

**Práce 4.3. Huliciak M, Lhotska I, Kocova-Vlckova H, Halodova V, Dusek T, Cecka F, Staud F, Vokral I, Cerveny L.** Effect of P-glycoprotein and Cotreatment with Sofosbuvir on the Intestinal Permeation of Tenofovir Disoproxil Fumarate and Tenofovir Alafenamide Fumarate. *Pharm Res.* 2023;40(9):2109-2120.

Velmi zajímavá studie zkoumala mechanismy farmakokinetických interakcí na úrovni intestinálního transportu a metabolismu mezi sofosbuvirem na jedné straně a tenofovir-disoproxil-fumarátem (TDF) a tenofovir-alafenamid-fumarátem (TAF) na straně druhé. Byly provedeny transportní studie v kultuře Caco-2 buněk a akumulací studie s tkáňovými řezy z ilea potkanů (rPCIS) a pacientů (hPCIS). TDF a TAF byly extenzivně hydrolyzovány jak v Caco-2 buňkách, tak v tkáňových řezech, TAF vykazoval větší stabilitu. Bylo prokázáno, že ABCB1 zprostředkuje eflux obou antiretrovirik a významně snižuje jejich prostup vrstvou Caco-2 buněk a uptake do rPCIS a hPCIS. SOF neinhiboval eflux TDF a TAF zprostředkovaný ABCB1, ale zvýšil množství absorbovaného TDF inhibicí jeho metabolismu, přičemž celkové množství TFV ekvivalentů TDF zůstalo nezměněné. Zvýšení plazmatických koncentrací TFV u pacientů léčených SOF a TDF tak způsobuje interakce mezi oběma látkami nezahrnující ABCB1, případně spadá na vrub jiných léčivých látek v kombinované terapii.

**Otázka 4.** Byly publikovány studie umožňující mezidruhové srovnání potkan/člověk jiných efluxních transportérů?

**Práce 4.4. Martinec O, Biel C. de Graaf IA, Huliciak M, Staud F, Vokřál I, Červený L, Olinga P.** Human precision-cut intestinal slices as a new model for testing induction potency of drugs targeting P-glycoprotein (ABCB1)

Práce hodnotí PCIS z lidského jejunu jako model pro indukci transportéru ABCB1 (P-glykoprotein). Výsledky potvrdily viabilitu, stabilní genovou a proteinovou expresi transportérů v souladu se zachovanou transportní aktivitou. Modelový induktor a ligand *PXR* rifampicin zvýšil genovou a proteinovou expresi a aktivitu ABCB1 (akumulační studie s rhodaminem) a genovou expresi *CYP3A4*. Výsledky ukázaly, že PCIS jsou vhodným modelem pro studium indukce ABCB1 v experimentu trvajícím 48 hodin.

### Publikační aktivita uchazeče

Mgr. Huličiak je prvním autorem dvou původních vědeckých prací a spoluautorem dalších dvou původních vědeckých prací, které řeší problematiku vytyčenou jako cíle dizertační práce. Všechny práce prošly náročným oponentním řízením v renomovaných vědeckých časopisech, jehož kladný výsledek je potvrzením originality témat a významu výsledků, stejně jako kvality použitých metod. Podle databáze Web of Science spadají publikace do 1. kvartilu (2 spoluautorské publikace, z toho jedna v prvním decilu) a 2. kvartilu (2 prvoautorské publikace).

Mgr. Huličiak sepsal draft verze obou prvoautorských publikací, což je u studenta PGS nutné vyzdvihnout. Výsledky práce dále zveřejnil formou 4 přednášek na domácích konferencích a 3 posterů (1 na zahraniční konferenci).

### **Závěr a doporučení**

Předložená dizertační práce je po formální i obsahové stránce velmi kvalitní. Mgr. Huličiak prokázal schopnost výborně zvládnout náročné výzkumné projekty po teoretické i praktické stránce. Má nezpochybnitelný zásadní podíl na vzniku publikací. Dizertační práce a publikace s vysokým impaktním faktorem přinášejí originální poznatky, dokazují hluboké porozumění dané problematice a dokládají odborné vyjadřovací schopnosti.

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

V Hradci Králové, 20. 5. 2024

-----  
doc. Ing. Jaroslav Chládek, Ph.D.  
Ústav farmakologie  
Univerzita Karlova v Praze  
Lékařská fakulta Hradec Králové