

Posudek na doktorskou práci Mgr. Alice Nové

Interakce léčiv s nukleárními receptory při regulaci biotransformačních enzymů a lékových transportérů

Předkládaná doktorská práce se zabývá studiem jaderných receptorů, které regulují genovou expresi enzymů metabolizujících léčiva a lékových transportérů. Výzkum faktorů, které ovlivňují expresi a aktivity biotransformačních enzymů a lékových transportérů je velmi důležitý jak z hlediska vědeckého tak i medicínského. Změna distribuce a metabolických poměrů léčiv, např.: díky nevhodné kombinaci léčiv nebo potravinových doplňků, může vyústit v selhání terapie nebo vést k závažným nežádoucím účinkům. Z tohoto hlediska bylo téma doktorské práce zvoleno vhodně a v souladu s nároky kladenými na doktorské studium.

Z formálního hlediska je práce členěna obvyklým způsobem na teoretickou část, metodickou část, cíle, výsledky s diskuzí, závěr, seznamy publikací doktorandky, použité literatury a příložené práce doktorandky. Teoretická část, na zhruba dvaceti stránkách s bohatým grafickým a tabulkovým doprovodem, uvádí čtivou formou do studované problematiky. Podrobně jsou rozvedeny typy jaderných receptorů, faktory ovlivňující jejich funkci, např.: polymorfismy nebo sestřih a základní rysy struktury. Dále jsou uvedeny vlastnosti hlavních jaderných receptorů PXR, CAR a GR, ligandy jaderných receptorů a jejich vliv na biotransformační a transportní enzymy, včetně důrazu na možnost vzniku lékových interakcí.

Cíle práce jsou jasně stanovené, vyplývají z informací v teoretické části a představují originální a vědecky velmi zajímavý přístup k analýze faktorů způsobujících lékové interakce.

Z metodického hlediska práce využila moderní přístupy biochemie a molekulární toxikologie. Navržené postupy a hodnocení experimentů jsou v souladu s moderními trendy výzkumu v této oblasti u nás i ve světě. Ke studiu byly využity specifické *in vitro* buněčné modely (v tomto případě linie HepG2, MZ-Hep1 LS174T a COS-1), primární kultury lidských hepatocytů a široké spektrum reportérových konstruktů obsahujících jaderné receptory, geny metabolických enzymů a jejich varianty obsahující vazebné domény a koaktivátory. Buněčné modely, transfekované reportérovými konstrukty, byly analyzovány pomocí Dual-luciferase reporter assay a two-hybrid screen systému, změny v expresi mRNA sledovaných genů byly hodnoceny pomocí PCR v reálném čase a životnost buněk byla sledována MTS testem.

Výsledková část s diskuzí je rozdělena na tři bloky s komentáři k článkům publikovaným v recenzovaných časopisech. Z příložených originálních článků je patrné, že autorka udělala ohromný kus práce. Výrazný podíl autorky na dosažených výsledcích je dokumentován prvním pořadím mezi autory ve dvou článcích.

Závěry jsou jasně formulovány a zcela odpovídají dosaženým výsledkům. Mezi hlavní a originální výsledky patří:

- 1/ R-warfarin je ligandem PXR a jeho prostřednictvím indukuje expresi CYP3A4 a CYP2C9 na úrovni mRNA v lidských primárních hepatocytech. Tato indukce je mnohem výraznější než v případě S-enantiomeru. Autorka tak jako první popsala rozdílnou schopnost široce používaného léčiva warfarinu aktivovat PXR a jeho prostřednictvím i metabolické enzymy.
- 2/ Transaktivace SLC22A1/OCT1 glukokortikoidy, s přispěním HNF4 α , v primárních lidských hepatocytech v kontrastu s absencí účinku v buněčných liniích jaterního karcinomu.

3/ Nález alternativních aktivátorů CAR (chinazolinové deriváty), z nichž jeden má vyšší účinky než dosud hojně používaná modelová látka CITCO.

Tři publikace v impaktovaných časopisech, z čehož jedna s vysokým impakt faktorem, na nichž je Mgr. Nová první autorkou nebo spoluautorkou jsou jasným důkazem, že doktorská práce je mimořádně kvalitní a zasluhuje nejvyšší uznání. Tyto práce budou, díky své závažnosti a aktuálnosti vysoce citovány.

Práce působí harmonicky a je velmi pečlivě vypracována po stránce formální i vědecké. Zároveň práce poskytuje dostatek podnětů k diskusi a zamyšlení nad možnými interpretacemi výsledků a budoucím vývojem v oboru.

Komentáře a otázky k vlastní práci.

V tabulce 2 teoretické části mi chybí některé transportéry důležité pro distribuci cytostatik, např.: ABCC5, ABCC10 a 11 a zástupci rodin nukleosidových transportérů SLC28A1-3 a 29A1-3.

Zařazení kapitoly „Cíle práce“ až za „Experimentální část“ na mne působí trochu nelogicky – spíše bych cíle zařadil před metody.

Tyto drobnosti však nijak nesnižují vysokou vědeckou hodnotu celé práce.

Všechny práce přiložené k doktorské práci byly recenzovány renomovanými odborníky a tudíž následující dotazy slouží spíše k podpoření diskuze a k širšímu náhledu na uvedenou problematiku.

1/ Zajímalo by mne co je známo o úloze microRNA a methylace promotorových nebo dalších regulačních úseků v expresi jaderných receptorů a o případné relevanci těchto epigenetických mechanismů pro jejich funkci.

2/ Může vysoká vazebnost na plazmatické bílkoviny ovlivnit interakci warfarinu s nukleárními receptory? Jaké další faktory mohou ovlivnit vliv jeho enantiomerů na genovou expresi biotransformačních enzymů?

3/ Jaký je metabolický účinek aktivace CAR na endogenní metabolismus glycidů a lipidů?

Doktorská práce dle mého názoru splnila svůj účel, protože autorka prokázala schopnost samostatné vědecké práce. Výsledky byly publikovány ve velmi kvalitních odborných časopisech.

Z těchto důvodů doporučuji předloženou práci k obhajobě.

V Praze 27.8.2013

RNDr. Pavel Souček, CSc.