

## OPONENTSKÝ POSUDEK

na disertační práci Mgr. Antonína Libry

"Studium transportních mechanismů léčiv v placentě a játrech"

(Ústav farmakologie a toxikologie, Farmaceutická fakulta University Karlovy v Hradci Králové, 2006)

Disertační práce Mgr. Antonína Libry je předložena jako komentovaný soubor prací publikovaných v hodnotných zahraničních časopisech. Tématem je studium transportních mechanismů léčiv v placentě a játrech, kde autor prezentuje své výsledky získané za použití moderních molekulárně-biologických metod a *in vitro* i *in vivo* experimentů. S ohledem na důležitost jednotlivých transportních proteinů pro farmakokinetiku xenobiotik u člověka, se autor ve svém výzkumu postupně věnoval prakticky všem hlavním přenašečům léčiv.

Práce je členěna na přehledný úvod věnovaný obecnému seznámení s problematikou transportních proteinů zapojených do farmakokinetických procesů u člověka (24 stran), cíle se specifikováním podílu autora na jednotlivých pracích a výstupech (2 strany), použitou literaturu (cca 100 citací recentních prací), 5 příložených článků kde autor je hlavním autorem nebo spoluautorem a souhrn s komentářem dosažených výsledků.

### 1. ZHODNOCENÍ DISERTAČNÍ PRÁCE

Zvolené **téma a cíle** představují zajímavý a velice aktuální problém moderní farmakologie a fyziologie. Transmembránové transportní proteiny lokalizované na povrchu buněk tkání s eliminační nebo bariérovou funkcí představují základní mechanismus, který ovlivňuje pohyb endo- a xeno-biotik v organismu a jejich exkreci. Funkce jednotlivých transportérů výrazným způsobem zasahuje do farmakokinetiky a potažmo i farmakodynamiky většiny léčiv. Problematika je navíc velmi recentní a obsahově narůstá až v posledních několika letech. V tomto období byla identifikovaná, především za použití moderních molekulárně-biologických metod, řada transportních proteinů. V kontextu s těmito skutečnostmi a s dlouhodobým výzkumným záměrem školitele, resp. školícího pracoviště, bylo zvoleno téma předkládané disertační práce, kterým je hodnocení exprese, aktivity a interakcí transportních proteinů v placentě a v játrech.

**Cíle práce** jsou vytýčeny jasně; byly následující:

1. Zavedení metod izolace RNA, reverzní transkripce a kvantitativní real-time PCR pro kvantifikaci exprese transportních genů v lidských a potkaních tkáních a buněčných kulturách.
2. Studium exprese a lokalizace P-gp v placentě potkana v průběhu březosti (v návaznosti na potvrzenou funkci P-gp v terminální placentě potkana *in vivo*).
3. Porovnání exprese genů *ABCB1* a *ABCG2* v lidské BeWo buněčné linii a terminální lidské placentě.
4. Porovnání exprese 12 genů nadrodin SLCO, SLC22, SLC10 a SLC15 v lidských HepG2 a Chang Liver buněčných liniích jako *in vitro* modelech pro studium transportních procesů v játrech.
5. Stanovení kinetických charakteristik transportu potenciální diagnostické látky pro magnetickou rezonanci B22956 v buněčných liniích HepG2 a Chang Liver a srovnání s kinetikou endogenní látky taurocholátu.

**Použité metodiky** byly velmi komplexní, sofistikované a naprosto adekvátní ke zvoleným cílům. Autor především pracoval v oblasti molekulárně-biologických metod, kde vypracoval řadu metod od izolace materiálů až po kvantifikaci konkrétní mRNA, včetně přípravy plasmidů a jejich sekvenování. Ocenit lze komplexní přístup k hodnocení exprese genů pro transportní proteiny – autor při své práci, až na výjimky (MRPs – multidrug resistance-associated proteins), hodnotil expresi všech transportních proteinů důležitých ve farmakokinetice léčiv.

Disertační práce přináší řadu **výsledků**, které jsou hodnověrné a cenné. Za originální a zvláště přínosné považují:

- 1) Detailní popis exprese a funkce genů *ABCB1* a *ABCG2* v placentě.
- 2) Detailní analýza exprese uptake transportérů u dvou liniích sloužících jako celulární model jater, HepG2 a Chang Liver.
- 3) Stanovení kinetiky (včetně kinetických parametrů  $K_m$  a  $V_{max}$ ) a popis transportérů zapojených do uptake nové zobrazovací látky pro MRI – B22956, do jater.

**Diskuse** je součástí přiložených publikovaných prací a odráží výborné znalosti problematiky. Interpretace vlastních výsledků je věcná a střizlivá. Platnost zjištěných skutečností je precizně položena do kontextu s recentními informacemi v této oblasti.

Po **formální** stránce je práce přehledně členěna. Obsahuje všechny požadované části s minimem didaktických chyb. Tuto stránku práce lze hodnotit jako výbornou.

Celkově nutno konstatovat, že předkládaná disertační práce dokladuje **úspěšné splnění všech vytýčených cílů**.

## 2. PŘIPOMÍNKY A DOTAZY OPONENTA

### 2.1. Připomínky a dotazy k odborné a obsahové stránce

K práci mám pouze několik upřesňujících dotazů, které nijak nesnižují jinak velmi vysokou úroveň disertační práce:

- V poslední práci (kontrastní látka B22956) je hodnocena exprese „pouze“ v rovině mRNA. Jaké jsou vaše zkušenosti se souvislostí mezi detekovanou mRNA a množstvím jejího proteinu, který je finálně k dispozici pro funkci?
- Při daném uspořádání uptake experimentů s použitými buněčnými modely pravděpodobně nebylo možné vyhnout se vlivu exportních transportérů (např. MRP2, pro který, jak uvádí autor, je B22956 substrátem). Jak výrazný vliv by se v daném uspořádání pokusu dal přisoudit exportním „apikálním“ transportérům?
- V poslední práci je použito starších označení jednotlivých transportních proteinů, jinak je celá práce napsaná s novou terminologií. Jakou terminologii je vhodné používat?
- Ačkoli to částečně vyplývá z kontextu, nejsou zavedeny zkratky TG a RG pro vzorce na str.24. Současně došlo pravděpodobně k chybě v rovnici na str. 24, která by ve zkratkách zvolených autorem, měla asi být napsána správně následujícím způsobem:

$$\text{Násobek změny (poměr)} = \frac{2^{\Delta C_t \text{ vzorek}} (TG-RG)}{2^{\Delta C_t \text{ kontrola}} (TG-RG)} = 2^{-(\Delta C_t \text{ vzorek} - \Delta C_t \text{ kontrola})} = 2^{\Delta \Delta C_t}$$

## 2.2. Připomínky k formální stránce

- bez připomínek

## 3. ZÁVĚREČNÉ HODNOCENÍ

Předložená disertační práce Mgr. Antonína Libry „Studium transportních mechanismů léčiv v placentě a játrech“ splňuje podle mého názoru všechny požadavky na kvalitní doktorskou práci. Její bohatý a sofistikovaný věcný obsah, založený na publikovaných výsledcích, svědčí o intenzivní a promyšlené práci předkladatele s brilantním zvládnutím složitých metodik. To dokladuje i 5 publikací v mezinárodních časopisech, kde u jedné z nich je předkladatel disertační práce prvním autorem. Autor prokázal široké znalosti v dané problematice a schopnost samostatné tvůrčí vědecké práce.

**Na základě tohoto hodnocení předložené disertační práce d o p o r u j i, aby po její úspěšné obhajobě, byl Mgr. Antonínu Librovi udělen příslušný vědecký titul.**

Hradec Králové dne 29.5.2006



MUDr. Stanislav Mičuda, PhD.  
Ústav farmakologie UK-LF v Hradci Králové  
PO Box 38  
Šimkova 870  
50038 Hradec Králové