

Posudek na disertační práci **Mgr. Jany Mandíkové** s názvem „**Interakce antimikrobiálních látek s lékovými ledvinnými transportními systémy *in vitro***“, vypracované pod vedením doc. PharmDr. Františka Trejtnara, CSc. na Katedře farmakologie a toxikologie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze.

Jak název práce napovídá, vlastním tématem práce je studium interakcí vybraných antimikrobiálních látek s vybranými membránovými transportními systémy/proteiny silně exprimovanými v buňkách tubulů ledvin. Experimenty jsou designovány jako *in vitro* studie na permanentních buněčných liniích, což autorce umožnilo se detailněji zaměřit na jednotlivé interakce vybraných léčiv se studovanými transportéry. Téma je to velmi atraktivní, s významným aktuálním přesahem do klinické praxe. Získané výsledky umožňují zamýšlet se nad novými designy farmakologické léčby, zvyšující efektivnost podávaného léku a na druhou stranu snižující zátěž organismu.

Práce má standardní strukturu tvořenou abstraktem shrnujícím získané poznatky, úvodem/teoretickou částí, šířeji seznamující s danou problematikou a vyústující ve vlastní cíle práce. Následuje experimentální část s výčtem použitého materiálu a metod. Dále pak vlastní výsledky, diskuse, závěr a seznam použité literatury. Práce je doplněna dvěma odbornými články (autorský a spoluautorský) ve vysoce kvalitních recenzovaných odborných časopisech, kde jsou výsledky předložené práce zveřejněny. Je zde také uveden seznam dalších šestnácti odborných článků v recenzovaných časopisech, většinou velmi kvalitních, kterých je Mgr. Mandíková spoluautorkou, a které se částečně překrývají s tématem její disertační práce. Již toto samo o sobě ukazuje na vědecké schopnosti autorky a oprávněnost k získání titulu Ph.D. Za vyzdvižení i jistě stojí, jak jsem snad správně pochopil, že protokoly použité v práci k testování pracovních hypotéz, si autorka musela na školitelském pracovišti zavést sama, což samo o sobě často vyžaduje dostatek odhodlání překonávat překážky a dostatečnou laboratorní zručnost a zkušenosti.

Výsledky práce budou jistě součástí prezentace u obhajoby a tak nemá myslím moc smysl je zde detailně opakovat. Stručně, práce je zaměřena na studium interakce entecaviru (ETV), acyklických nukleosidových fosfonátů (PMEG, PMEODAPy a (S)-HPMPA) a Amfotericinu B (AmB) s transportéry rodiny SLC OAT1, OCT2, CNT2 a CNT3. Dále pak s transportéry rodiny ABC transportérů ABCB1 a ABCG2.

Nejvýznamnější objevy reprezentuje zjištění, že ETV je inhibitorem a substrátem transportérů OAT1, CNT2 a CNT3 a částečně i ABCB1 a ABCG2. Dále, že OAT1 interaguje s ANPs, které mohou být jak jeho substráty, tak inhibitory. A že některé ANPs inhibují i transportéry ABCB1 a ABCG2. Studie s AmB ukázala jeho schopnost inhibice transportéru OCT2, ale ne transportéru OAT1. bylo však prokázáno, že kyselina deoxycholová (DOC), která je součástí komplexního preparátu s AmB inhibuje jak OAT1, tak OCT2.

Jak jsem již naznačil v úvodu, získané výsledky považuji za velmi cenné a rozšiřující náš pohled na možnosti zlepšení využití, účinků a farmakokinetiky testovaných látek, stejně jako jejich derivátů. Současně jsou vynikajícím odrazovým můstkem pro navazující studie zaměřené na tuto problematiku.

K stručnému hodnocení vlastní práce, jak je předložena. Abstrakt mi připadá zbytečně dlouhý a detailní na úkor rychlému představení výsledků předložené práce. Teoretická část vcelku výstižně a obsáhle představuje danou problematiku, představuje pracovní hypotézy, z kterých jsou pak logicky vystavěny cíle práce, kromě cíle č.4, jež je spíše cílem doktorského studia jako takového. Vysokou kvalitu teoretické práce poněkud snižují drobné nepřesnosti, jako např. špatná definice „clearance“ (str.8.), nebo že ABCB1 a ABCG2 jsou nejvýznamnější ABC transportéry v organismu, mnohé jiné z této skupiny transportérů jsou s ohledem na poškození organismu a jeho funkci při jejich poškození mnohem významnější. Také je škoda, že vypadla kapitola o podtřídě MRP, jíž se autorka prakticky sice nezabývá,

ale často její členy, jako silně exprimované a v ledvinách významně funkční zmiňuje. Část experimentální pak na jednu stranu je až nadbytečně detailně pojatá, na druhou stranu následovníci jistě ocení pečlivý a přesný výčet kroků jednotlivých postupů. I to je však nejspíš odrazem „nováčkovství autorky v těchto technikách, o čemž svědčí i některé použité termíny a nepřesnosti: Lidský xy expresní plasmid (str.38) – anglikanismus, lidé žádné plamidy nemají; buňky byly sazeny (str.39) - vysety; kontrola zatížení proteinů na gelu (str.42) – vnitřní standard, kontrola nanášky vzorku (navíc tyto data nejsou nikde ukázána); 10% aprotininu, 10% benzamidinu,...- tak velké množství těchto látek určitě použito nebylo. Jako laikovi v dané oblasti by mi pro orientaci také velmi pomohlo, kdyby uváděné tzv. standardní substráty, či inhibitory pro jednotlivé transportéry byly prezentovány i formou tabulky. Také považuji za celkově šťastnější v případě více synonym pro daný gen/protein se v textu držet jen jednoho (zde případ např. ABC transportérů). Rád bych také upozornil, že používat v experimentech tohoto typu konfluentně naroslé buňky je velmi nevhodné z hlediska standardnosti experimentu. Následná výsledková část je pak podána velmi jasnou a srozumitelnou formou, což hodnotím velmi kladně, stejně jako design experimentů, jednotlivé pracovní hypotézy a postupy k jejich ověření/vyvrácení s ohledem na vytyčené cíle. Trochu zmatečně však působí jakési volné používání termínů triplikát a 3 nezávislá opakování, což z pohledu tradičního významu těchto termínů v uspořádání experimentu značí úplně jinou informaci. Dále v některých grafech je prezentována vysoká statistická významnost rozdílu mezi testovanými skupinami, ale v textu je to uvedeno jako nevýznamné nebo mírný vliv (např. kapitola 6.3.3. Cytotoxicita ETV, viabilita u hOAT1 x GS-9191). Dále, grafy na obr. 23 a 24 jsou prakticky nečitelné a o vypočítaných významných rozdílech uvedených v textu se čtenář může jen dohadovat. Zde také tvrzení, že GS-9191 působil stejně efektivně na inhibici studovaných transportérů jako jejich specifické inhibitory je dle mne poněkud zavádějící díky jeho o 2-3 řády větší účinné koncentraci.

Následuje část diskuse, kde autorka jasnou a čtivou formou, komentuje své výsledky se současnými poznatky z jiných prací a své vlastní tak logicky začleňuje do celkového stavu poznání v této oblasti výzkumu. Následuje stručné závěrečné shrnutí a seznam použité literatury, čítající úctyhodných více jak 200 citací.

V souhrnu předloženou práci považuji za velmi zdařilou, jasně dokreslující autorčiny schopnosti formulovat vědecké hypotézy, najít si cestu k jejich testování, designovat a zejména úspěšně realizovat potřebné experimenty, které přináší odpovídající výsledky. Dle přiložených publikací je autorka také schopna své původní výsledky odpovídající formou prezentovat v podobě odborných článků v mezinárodních a vysoce hodnocených periodikách. Všechny tyto skutečnosti mne vedou k jasnému doporučení předložené práce k obhajobě a jako podkladu k získání titulu Ph.D..

Závěrem mám následující otázky do diskuse:

1. V práci je uvedeno, že použité buněčné linie byly vybrány na základě snadné kultivovatelnosti. Byl také dělán expresní profil studovaných a jim příbuzných transportérů u použitých buněk? Nebyl by to vhodný parametr výběru vhodné buněčné linie?
2. Byl nějaký důvod, proč v experimentech s exogenní expresí studovaných transportérů, nebyly všechny studované transportéry testovány na obou použitých liniích, případně všechny na jedné?