

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmakologie a toxikologie

Studijní program: Farmacie

Posudek oponenta diplomové práce

Autor/ka práce: **Jakub Poráč**

Vedoucí práce: doc. PharmDr. Martina Čečková, Ph.D.

Rok obhajoby: 2020

Garant práce:

Oponent/ka: RNDr. Jakub Hofman, Ph.D.

Název práce:

**Hodnocení vlivu inhibitorů CDK a FLT3 na aktivitu ABC efluxních transportérů
in vitro, vztah k mnohočetné lékové rezistenci**

Rozsah práce: počet stran: 62, počet obrázků: 15, počet tabulek: 2, počet citací: 94

Hodnocení práce:

- a) Odborná úroveň a zpracování teoretické části: velmi dobrá
- b) Náročnost použitých metod: výborná
- c) Zpracování metodické části (přehlednost, srozumitelnost): velmi dobré
- d) Kvalita získaných experimentálních dat: výborná
- e) Zpracování výsledků (přehlednost, srozumitelnost): výborné
- f) Hodnocení výsledků včetně statistické analýzy: velmi dobré
- g) Myšlenková úroveň a rozsah diskuse výsledků: výborná
- h) Srozumitelnost, výstižnost a adekvátnost závěrů: výborná
- i) Splnění cílů práce: výborné
- j) Množství a aktuálnost literárních odkazů: výborné
- k) Jazyková úroveň (stylistická a gramatická úroveň): velmi dobrá
- l) Formální úroveň práce (členění textu, grafické zpracování): výborná

Doporučuji diplomovou práci k uznání jako práci rigorózní

Případné poznámky k hodnocení: V předložené diplomové práci se autor nejprve věnuje vlivu tří FLT3 inhibitorů na aktivitu ABCB1 a ABCG2 transportérů. V navazující části se snaží ověřit využitelnost zjištěných interakcí pro překonání lékové rezistence. Práce je logicky členěna, jazyková úroveň je poměrně vysoká, ačkoliv se místy vyskytují překlepy, gramatické chyby, mírně nepřesné či hůře čitelné a pochopitelné pasáže. Na druhou stranu to odráží skutečnost, že student práci sepsal samostatně, čehož si cením. Obsah teoretické části je v souladu s obsahem části experimentální. Metodický a experimentální rozsah práce je mírně nadstandardní, výsledky jsou pečlivě popsány a odpovídajícím způsobem diskutovány. Celková úroveň práce je vysoká. Po obsahové ani grafické stránce k práci nemám žádné vyloženě zásadní výhrady, mám pouze několik připomínek a dotazů.

Dotazy a připomínky:

Připomínky:

- 1) Obrázek 5 má velmi špatnou grafickou kvalitu a rovněž některé další obrázky by zasloužily lepší rozlišení.
- 2) Na straně 13 píšete, že transportéry ovlivňují základní farmakokinetické parametry včetně metabolismu. Metabolismus (enzymaticky podmíněná změna struktury léčiva) sám o sobě přímo aktivitou transportérů ovlivněn není. Na stejné straně uvádíte, že hydrolyzu ATP zajišťuje enzym ATPáza. To není technicky správné tvrzení, ABCB1 je transportér s ATPázovou doménou.
- 3) Na str. 16 vyčleňujete kompetici jako samostatný druh interakce. To není správné, neboť se jedná o jeden z typů inhibice.
- 4) Transportéru ABCG2 se sice experimentálně nevěnujete, ale s tím, že je několikrát zmíněn ve vztahu k MDR, bych pro něj očekával alespoň krátkou samostatnou kapitolu jako pro ABCB1 a ABCG2.
- 5) Na str. 21 píšete, že mutací genu nebo inaktivací inhibičních proteinů může dojít k deregulaci kontrolních mechanismů. Výsledkem je podle Vás amplifikace anebo zvýšená exprese tyrosinkináz. Výsledkem mutace není amplifikace, ale změna (zvýšení) aktivity, popř. kontinuální aktivace onkogenní kinázy.
- 6) Pro lepší orientaci v textu bych navrhl neoddělovat popis principu od vlastního popisu provedení metody.
- 7) V popisu metod se vyskytují nepřesnosti. Např. na straně 32 je místo jednotky uM jednotka ul (ve zmínce o postupném ředění inhibitorů), dále je na několika místech uvedeno, že bylo pipetováno tolik a tolik ul, ale cílovou koncentraci nelze odvodit (př. 5.6.1.1. popis přidání annexinu a PI). Ve stejné sekci nerozumím popisu excitačních/emisních spekter (místo FITC má být annexin V a nechápu, proč jsou zmíněny vlnové délky pro DNR a MIT - ty přece metoda nedetekuje).
- 8) Tabulka 2. je redundantní.
- 9) Pokus o stanovení IC50 u gilteritinibu a FLX je vědecky nesprávný. U obou látek a obou transportérů ani nejvyšší koncentrace zdaleka nedosahuje 50% inhibičního efektu modelového inhibitoru, pokus o odhad IC50 je v tomto případě přirovnatelný k věštění z magické koule. Doporučil bych se držet varianty, která je použita pro interakci FLX-ABCG2 (IC50 vyjádřena jako více než 50 uM).
- 10) Popis inhibice ABCG2 midostaurinem (str. 39) je nelogický - ani IC50, ani počet signifikantně inhibičních koncentrací neodpovídá tomu, aby interakce byla silnější než u ABCB1, je to naopak. Rovněž popis interakce s gilteritinibem není bez chyby - klesající trend je u parentních buněk a ne u linie HL60-ABCG2.
- 11) V diskuzi je uvedeno, že plazmatické hodnoty midostaurinu se pohybují v rozmezí hodnot 0,2 až 0,7 $\mu\text{mol/L}$ (Hsiao et al., 2019), což odpovídá 0,2 až 0,7 μM koncentraci. To je dvakrát to samé.
- 12) V diskuzi uvádíte: "I za předpokladu, že skutečná inhibice je dosahována za nižších koncentrací přibližujících se plazmatickým, je třeba v budoucnu tuto skutečnost podpořit dalšími probíhajícími studiemi (např. Clinicaltrials.gov, identifikátor NCT02752035)". Uvedená studie se však na interakce s transportéry nezaměřuje, pokud se nemýlím.

Dotazy:

- 1) V práci uvádíte, že původ HL60 buněk je APL, ne AML, na kterou se zaměřujete. Jaký jiný model byste pro svou studii mohl zvolit? Uvádíte též, že buňky mají simulovat situaci u pacientů trpících AML se zvýšenou expresí ABC lékových transportérů. Existuje studie, která by korelovala expresi těchto transportérů v buněčném transdukovaném modelu HL60 s expresí u reálných pacientů?
- 2) V popisu metody 5.6.2.1 uvádíte použití ethanolu bez uvedení koncentrace či objemu. Také píšete o dočasném místění buněk do mrazicího boxu. Jaká je celková koncentrace ethanolu u buněk? Je nějak ošetřen dodatečný vliv teplotního šoku (předpokládám, že buňky nezmrznou) a ethanolu na viabilitu buněk?

3) V diskuzi píšete, že pro účinek nových modulátorů je zásadní, aby byla určitá podobnost mezi ATP vazebným místem TKI a ABC rodiny transportérů. K této informaci chybí citace. Očekáváte, že každá interakce TKI s ABC transportérem je ATP-kompetitivní? Jakými metodami lze molekulární mechanismus inhibice popsat?

4) V diskuzi též spekulujete, že by mohl být gilteritinib substrátem nějakého influxního transportéru? Existuje nějaká studie popisující interakci tohoto TKI s influxními transportéry? Jsou některé z ostatních TKI substráty influxních transportérů a pokud ano, má tato interakce nějakou klinickou relevanci, např. směrem k lékovým interakcím?

Celkové hodnocení, práce je: výborná, k obhajobě: doporučuji

V Hradci králové dne 21.5.2020

.....
podpis oponentky / oponenta