

Oponentský posudek na diplomovou práci

Jméno posuzovatele: Mgr. Valéria Grobárová, Ph.D.

Autor: Bc. Klára Hrabánková

Název práce: Use of polymer prodrugs containing cucurbitacin D for the treatment of experimental tumours

Cíle práce: Cílem práce bylo zhodnocení cytostatické aktivity polymerních proléčiv (HPMA kopolymerů) nesoucích cucurbitacin D, definovat terapeutický efekt konjugátů spolu s jinými polymerními chemoterapeutiky a sledování efektu konjugátů na zastoupení populace myeloidních supresorových buněk (MDSC) v podmínkách *in vitro* a taktéž *in vivo* při léčbě myšího nádorového modelu.

Struktura (členění práce):

Členění práce je standardní. Rozsah práce: 64 stran vlastního textu.

Práce obsahuje jednu přílohu, jedná se o publikaci, kde je Klára Hrabánková spoluautorkou.

M. R. Tavares *et al.*, 'HPMA-Based Copolymers Carrying STAT3 Inhibitor Cucurbitacin-D as Stimulus-Sensitive Nanomedicines for Oncotherapy', *Pharmaceutics*, vol. 13, no. 2, Jan. 2021, doi: 10.3390/pharmaceutics13020179.

Literární přehled:

Literární přehled odpovídá tématu práce a je rozdělen do pěti hlavních podkapitol: 2.1 Tumorigenesis and anti-tumour immune response, 2.2 Tumour immune evasion strategies, 2.3 Immune therapeutic strategies, 2.4 Polymer prodrugs in cancer therapy, 2.5 General characteristics of cucurbitacins.

Literární přehled je napsán přehledně a srozumitelně, ale podle mého názoru je spíše celkově obecný. Kapitoly popisující MDSC buněčnou populaci a roli STAT3 v protinádorové imunitě by mohly být podrobněji popsány.

Autorka v práci použila dostatečný počet literárních zdrojů (141 citací). 39 literárních zdrojů je od roku 2016.

V abstraktu chybí shrnutí práce, celkový závěr vyplývající ze získaných výsledků.

Materiál a metody:

Metody odpovídají experimentální části a jsou většinou srozumitelně popsány.

Připomínky:

- 1) Chybí souhrnný seznam spotřebního materiálu a použitých přístrojů.
- 2) V některých případech autorka uvádí jenom objem média, ve kterém byly buňky kultivovány a objem přidaných látek, ale není uvedena finální koncentrace použitých látek (podkapitoly 4.5, 4.6 a 4.7).

- 3) V popisu metody v podkapitole 4.5 uvádíte, že kultivace buněk jenom s médiem byla použita jako kontrola. Jednalo se jenom o médium, nebo byla použita i relevantní kontrola s DMSO, jakožto rozpouštědlem použitých konjugátů?
- 4) V podkapitole 4.9 týkající se izolace buněk z krve chybí uvedení použitého antikoagulantu.
- 5) V tab. 2, kde je uveden seznam použitých protilátek pro průtokovou cytometrii, jsou uvedeny protilátky na detekci CD45 a CD45.2, ale ty nejsou zmíněny v popisu metod ani výsledků.

Experimentální část:

Experimentální část je rozsáhlá, autorka odvedla mnoho práce. Výsledky jsou většinou přehledně popsány.

Připomínky:

- 1) Závažným nedostatkem při interpretaci výsledků je prezentace sledované populace buněk jako jenom MDSC populace, jelikož není uvedeno její odlišení od populace klasických neutrofilů a monocytů.
- 2) Některé odstavce v popisu výsledků patří do diskuse. Např.: „Free drug enters the cell mainly via diffusion. The internalization of HPMA copolymers into the cell occurs via endocytosis, which is a significantly slower process. As a result, a higher drug amount is required within a given time to produce a comparable cytotoxic effect as a free low molecular weight drug. Therefore, polymer conjugates carrying anti-cancer drugs are in vitro less toxic than the free parent drugs.“ (str. 46); „Lower IC₅₀ values in these cell lines were in good agreement with the hypothesis that CuD could act as a STAT3 inhibitor, although additional mechanisms of toxicity are probably involved in this process.[117], [119], [120]“ (str. 47); „These results suggest that CuD indeed acts as the STAT3 signalling pathway inhibitor, although additional mechanisms of toxicity are probably taking part in the anti-cancer activity of CuD-conjugated polymer nanomedicines.“ (str. 51); “Probably due to the significant turnover of the cells within the tumour microenvironment and rapid changes in MDCSs frequencies, detected MDCSs counts are low and relatively heterogeneous. Moreover, the tumour isolation process and the preparation of samples are rather difficult. For future experiments, we have decided to focus on the flow cytometric analysis of the peripheral blood, which allows repeated sample collection over the course of tumour progression accompanied by easier sample isolation, manipulation and analysis.“ (str. 54); „We hypothesize that the key issue in such a low therapeutic efficacy of micellar polymer CuD conjugate lies in the release of CuD from the nanocarrier. The release of free parent drug entrapped in the micelle core surrounded by the micellar unimers may be very slow and CuD is not liberated from the conjugate in levels high enough to be therapeutically sufficient. Based on our experiments, the micellar polymer CuD conjugate does not seem to bring any advantage for in vivo treatment. This, together with the rather poor water solubility of micellar polymer CuD conjugate lead us to the decision to continue further only with the in vivo testing of linear CuD-based conjugate.“ (str. 59)

Diskuse:

Diskuse má něco přes 6 stran. Celkově autorka v menší míře porovnává a diskutuje získané výsledky s jinými studiemi, které byly v této oblasti provedeny.

Autorka v diskusi cituje 21 nových publikací z celkového počtu 141.

Závěry (Souhrn):

Závěry jsou přehledné a výstižné, korespondují se zadanými cíli práce.

Formální úroveň práce (obrazová dokumentace, grafika, text, jazyková úroveň):

Formální úroveň práce je na velmi dobré úrovni, jedná se o přehledně napsanou práci v anglickém jazyce.

Připomínky:

- 1) V některých případech se v textu vyskytují neobratně formulované věty, např. v abstraktu: „*Such binding facilitates solubility in aqueous solutions, reduces systemic toxicity; and passively targets the drug directly into the tumour through the enhanced permeability and retention (EPR) effect.*“; „*Mechanismus účinku dosud není objasněn, ale několik studií popisuje inhibici fosforylace a dimerizace signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) transkripčního faktoru ...*“.
- 2) V legendě k obr. 1 je nesprávně uveden odkaz na literární zdroj, u obr. 5 a 11A chybí popis, o jaké tkanivo se jedná.
- 3) Na str. 49 není správně uveden odkaz na podkapitulu v literárním přehledu („*As described in Chapter 3.2.4.2, MDSCs play an important role in the development and progression of many cancer types.*“).
- 4) Při zobrazení gatovací strategie, při dot plotech, je nutné uvádět procentuální zastoupení jednotlivých populací.
- 5) Při experimentech na myších není zvykem uvádět v sloupcových grafech jednotlivé hodnoty zvlášť ve formě bodů, snižuje to přehlednost grafu (obr. 11 a 16).
- 6) Obr. 11A a 16A se zdají být stejné.
- 7) V některých případech (obr. 9, 11E, 16F) signifikantní změny zobrazeny v grafech neodpovídají popisu v legendě k obrázkům.
- 8) Seznam použité literatury je v některých případech nejednotný a chybí označení přehledových článků. Citace 4 a 6 jsou stejné. Na str. 11 je zmíněná práce od autorů Hanahan a Weinberg, ale ta není v celkovém seznamu použité literatury. Na str. 16 chybí citace: „*In the tumour microenvironment, Tregs typically produce inhibitory cytokines, such as TGF- β or IL-10, to inhibit the activation of effector T cells. Cytotoxic substances, such as perforin and granzyme, directly kill tumour-specific CD8+ T lymphocytes. Another immunosuppressive mechanism is mediated by CD25, high-affinity IL-2 receptor- α , which rapidly consumes IL-2 and thereby limits the amount of IL-2 needed for the effector T cell to proliferate. Moreover, Tregs express integral membrane enzymes, such as CD39 and CD73, which metabolize extracellular ATP to adenosine, which consequently binds adenosine A2a receptor and inhibits effector T cell activation.*“; taktéž na str. 33: “*The effects of CuD described in tumour cells include for example cell cycle arrest and triggering of programmed cell death by affecting STAT3 or nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B) signalling pathways.*“

Otázky:

- 1) Výše byla zmíněna závažná připomínka v interpretaci výsledků, co se týče populace MDSC buněk. Jelikož se jedná o populaci, kterou je těžké správně určit, uveďte správný postup při definici dané populace a možnosti ověření, že se jedná o dané imunosupresivní buňky.
- 2) Na str. 20 uvádíte, že PMN-MDSC mají větší zastoupení, ale jsou méně supresivní v porovnání s Mo-MDSC. Uveďte, v čem se dané populace liší, jaký je rozdíl v jejich imunosupresivních mechanismech?

- 3) Ve výsledcích v podkapitole 5.1 uvádíte, že IC_{50} konjugátů je 4-6x vyšší než pro volný CuD. Při kontrole to vychází na 3x a 1,7x vyšší rozdíl pro nádorovou linii 4T1. Podobně v podkapitole 5.2 uvádíte šestinásobný rozdíl v IC_{50} , ale při kontrole to vychází na 7,7x a 4,6x vyšší rozdíl. Jakým způsobem to bylo stanovováno? Vysvětlete, prosím, dané nesrovnalosti.
- 4) Vysvětlete gatovací strategii u obr. 8A, zejména u populace $CD11b^+Gr1^-$. Skutečně se jedná o $CD11b^+$ populaci?
- 5) Ve výsledcích v kapitole 5.5 uvádíte přibližně 20% zastoupení PMN-MDSC buněk v krvi u myši bez nádoru. Je dané procento relevantní, resp. jaká je interpretace daného zastoupení, pokud zohledníme fakt, že jsou v něm zahrnuty i populace klasických neutrofilů a monocytů? Ukažte, prosím, gatovací strategii pro krev, slezinu a nádor s uvedením procentuálního zastoupení buněk. Jaké jsou absolutní počty MDSC buněk v slezině, krvi a jednotlivých nádorů?
- 6) V závěru práce je uvedena věta: „*Sole linear CuD-based conjugate therapy is not efficient in prolonging the survival of 4T1 tumour-bearing mice and does not bring a significant benefit in prolonging the survival of mice treated with micellar Dox-bearing conjugate.*“ Vysvětlete, v čem spočívá rozdíl, jelikož v publikaci, kde jste spoluautorkou, je uveden protinádorový efekt daného proléčiva. Taktéž vysvětlete rozdíl v experimentech ve výsledcích na obr. 13C) a 16D), kde je rozdíl v působení CuD-LP na přežívání myši.

Splnění cílů práce a celkové hodnocení:

Autorka v diplomové práci zkoumala vliv polymerních proléčiv s cucurbitacinem D na léčbu experimentálních nádorů. Práce byla zaměřena na testování jejich cytostatické aktivity a sledování jejich terapeutického účinku v kombinované terapii s jinými polymerními chemoterapeutiky. Jedním z cílů bylo taktéž zkoumání role STAT3 a sledování populace myeloidních supresorových buněk (MDSC) jakožto velice důležitých a významných cílů v protinádorové léčbě.

Celkově by se jednalo o velmi dobrou diplomovou práci v případě, že v průběhu obhajoby autorka vysvětlí nesrovnalosti v interpretaci výsledků týkající se populace MDSC buněk.

Práci doporučuji k obhajobě s celkovým hodnocením velmi dobře.

Datum: 25.5.2021

Mgr. Valéria Grobárová, Ph.D.