

Oponentský posudek na disertační práci

Ing. Moniky Kulhavé

předložené pod názvem:

„Studium protinádorového účinku nových nízkomolekulárních inhibitorů PI3K“

Popis práce:

Předložená disertační práce (DP) je standardní prací vycházející z výsledků 2 publikací, z nich u obou je Ing. Monika Kulhavá sdíleným prvním autorem spolu s Mgr. Martinem Andršem, který odpovídal za syntézu nových látek. To svědčí o tom, že experimentální výsledky prošly náročnou oponenturou a vykazují kvalitní úroveň ve světovém kontextu. Mimo to je první autorkou 1 přehledového článku a spoluautorkou 2 dalších článků. Všechny tyto články vyšly v impaktovaných časopisech. Kumulativní IF všech prací dohromady činí 14,98.

Vlastní komentář má rozsah 86 stran (včetně literatury a seznamu příloh) přehledně strukturovaných do 8 kapitol. Těmi jsou krátký obecný úvod do problematiky PI3K, zejména jejich 4. třídy. Kapitola řeší, jakým způsobem jsou tyto molekuly zapojeny do reparace poškození, zástavy buněčného cyklu, případně apoptózy. Zmíněny jsou i existující inhibitory DNA-PK. Vše v rozsahu 28 stran. Následně jsou v bodech stanoveny cíle. Autorka pokračuje materiálem a metodikou v rozsahu 9, výsledky v rozsahu 8 a diskuzí v rozsahu 6 stran. Vše shrnuje 1stránkový závěr a doplňuje seznam literatury čítající 113 citací a příloh doplňující oba publikované články. Práce je psaná srozumitelně s minimem překlepů či gramatických chyb.

Závěrem lze konstatovat, že předložená disertační práce je originální a zaměřená na aktuální téma týkající se senzitivace nádorových buněk k chemoterapii. Zvolené metody jsou adekvátní stanoveným cílům a práce poukazuje na nový účinný inhibitor perspektivní pro další testování. Práce dokumentuje vědecký přínos v dané oblasti, a **proto ji doporučuji přijmout jako podklad k obhajobě.**

K předložené práci bych chtěl ale vyjádřit některé **připomínky**:

1. Zkratky je dobré definovat při prvním zavedení, ne vždy je toto dodrženo (zkratky NHEJ, Cdk, ...). Na druhou stranu, pokud je již zavedena zkratka, je vhodné ji používat (např. G0). Rovněž je dobré, aby zkratky v textu korelovaly s rejstříkem zkratk (např. BER, str. 29).
2. Latinské názvy je vhodné udávat latinkou (str. 34 „*penicillium funiculosum*“)
3. Rovněž bych doporučoval skloňovat jména autorů, pokud to věta vyžaduje (např. str. 18: „*zjištění Kong et al.*“)
4. Text úvodu je dělen do několika kapitol. To samozřejmě pomáhá uchopit komplexní problematiku, jakou buněčná signalizace bezpochyby je, na druhou stranu

fragmentace v tomto případě vedla k občasnému opakování informací se stejným obsahem.

5. Rovněž by textu prospělo citování novějších zdrojů. Jen 6 ze všech citovaných prací je mladších posledních 5 let.
6. Při uvádění informací je lepší postupovat od obecné ke konkrétní. Na str. 27 je např. uvedeno, že „*Jedním z cílů p53 přispívajících k zástavě cyklu v G2 fázi je protein 14-3-3 sigma, který se váže na komplex cyklin B/Cdk1. Proteiny rodiny 14-3-3 hrají roli v signální transdukci a kontrole buněčného cyklu*“.
7. Jedním z předpokladů, se kterými práce pracuje, je, že pokud nedochází k fosforylaci Chk 1 a 2, neovlivňují nové látky ATM a ATR signální dráhy. Myslím, že tento předpoklad není zcela přesný. Inhibice DNA-PK může např. působit hyperaktivaci ATM (doi: 10.1091/mbc.E16-01-0032). Interakcí mezi inhibicí DNA-PK a ATM a ATR signálními dráhami je možné dohledat více.
8. Autorka na str. 15 uvádí, že se teleangiektázie u AT vyskytují v očích. Nejedná se však o jediné místo, kde se u této choroby mohou rozšířené krevní cévy vyskytovat.
9. Na str. 16 autorka zmiňuje, že „*protein p53 vyhledá poškozená místa na DNA*“. Protein p53 mi spíše připadá jako transkripční faktor, než senzor poškození.
10. Na stejné stránce autorka nesprávně uvádí, že „*degradovaná Cdc25A nemůže fosforylovat Cdk*“. Jedná se o fosfatázu, jak bylo uvedeno v předchozí části textu.
11. Na str. 18 autorka píše, že „*protein Ku má prstencovou strukturu*“. Heterodimer, jak bylo v textu uvedeno, má prstencovou strukturu. O jednotlivých podjednotkách takto uvažovat nelze.
12. Rovněž se domnívám, že došlo k chybné interpretaci na str. 23/24, kde je uvedeno, že „*v neporušeném buněčném cyklu je*“ Chk1 „*v aktivním stavu, ovšem v reakci na poškození DNA nebo zástavu replikace je dále aktivována*“. Autorka měla pravděpodobně na mysli „*v neaktivním stavu*“.
13. Vzhledem k přítomnosti p53 i ve zdravých (nepoškozených) buňkách se domnívám, že došlo i k chybě ve větě na str. 27, kde je uvedeno: „*buňka v reakci na p53 projde zástavou buněčného cyklu...*“. Vhodnější by bylo použít „*v reakci na aktivaci,*“ nebo „*fosforylaci,*“.
14. Na str. 28 autorka uvádí: „*buňky s nefunkčním p53 postrádají reparační mechanismy nukleotidovou excizní opravu (NER) a opravu vystřížením báze (BER)*“. Tyto mechanismy jsou v p53-deficientních buňkách přítomny, jen vykazují dysfunkci (např. Li et al. Int J Biochem Mol Biol. 2011; 2(2): 138-145).
15. Na str. 30 je uvedeno, že „*doposud bylo identifikováno 11 lidských kaspas*“. Domnívám se, že jedna chybí.

16. Na str. 36 je zmíněna rychlá metabolická clearance s jednotkou 1 h. Clearance má odlišnou jednotku.
17. Na stejné straně je odstavec pojednávající o B-buňkách, chronické lymfocytární leukémii a inzulinové rezistenci. Doporučoval bych zde lépe definovat, o jaké B-buňky se kde jedná, neboť se může jednat jak o B-buňky pankreatu, tak B-lymfocyty.
18. Na str. 40 je uveden termín „*cytolýtické*“ působení. Cytolýza je chápána jako rozpad nebo rozpuštění buňky. V kontextu textu se mi jako vhodnější termín jeví slovo „*cytotoxické*“.
19. Na str. 42 jsou definovány cíle. Dva z nich jsou definovány takto: „Posouzení schopnosti chinazolinových derivátů potencovat účinky doxorubicinu u vybrané linie nádorových buněk a určení nejúčinnějšího derivátu pro detailní testování“ a „Pomocí vhodné metody zjištění, zda dochází při kombinované terapii nejúčinnějšího derivátu s doxorubicinem k zahájení procesu programované buněčné smrti“. Připadá mi, že se tyto zmíněné cíle se hodně překrývají, v kontextu toho, že měl první jmenovaný cíl jako výstup viabilitu buněk.
20. Zatímco je stran *in vivo* experimentů na str. 51 uvedeno konkrétní povolení etické komise, to samé u lidských linie NHDF izolované z pacientů na str. 44 chybí.
21. Celkem bylo testováno 17 nových purinových derivátů, nicméně na obr. 5 je uvedena struktura pouze 16 z nich.
22. V případě spektrofotometrického měření jsou všude uváděny vlnové délky detekce. Na str. 49 u měření aktivity kaspas chybí.
23. Na konci str. 50 je popis skupin, na kterých bylo měření provedeno. Tento popis nezahrnuje samotné použití látky 14d a NU7026.
24. Ve většině případů je podrobně uveden obsah jednotlivých roztoků. Výjimkou je BCA assay na str. 51.
25. Kapitola statistické analýzy na str. 52 pokrývá pouze t-test. Další statistickou metodou použitou v textu však byla nelineární regrese pomocí GraphPadu. Myslím, že zde měla být též uvedena i s dodavatelem.
26. Metodice NCI-60 (str. 53) chybí citace.
27. Na stejné straně (str. 53) jsou uvedeny jako silné inhibitory látka 10k, 10e a 10f. V popisu chybí uvedení i látky 14d, neboť i ona vedla k více než 50% poklesu viability u některých buněčných linií. Navíc se s ní později pracovalo.
28. Na obr. 7 (str. 54) jsou výsledky látky 12 vmezeřena mezi látku 10i a 10k. Stran řazení bych je doporučoval posunout mezi látky série 10 a 14.
29. Na str. 55 autorka uvádí, že „*jestliže dojde k*“ inhibici topoizomerasy II, „*DNA se začne rozpadat*“. Domnívám, se že se jedná o silné mechanistické zjednodušení v kontextu textu uvedeného v úvodu a popisu apoptosy.

30. V obr. 8 (levá část) chybí jednotka koncentrace. Rovněž hodnoty mají desetinné tečky. Obrázek byl ale zřejmě přejet z publikovaného anglického originálu.
31. Poslední věta výsledkové části kapitoly 4.1.3 se mi jeví vhodnější do diskuze. Zde by bylo možné tuto myšlenku i lépe rozvinout.
32. Na str. 57 je ukázán senzitivizační účinek chinazolinových derivátů. Látka 14c se mi jeví podobně účinná jako látka 14d. Výběr látky 14d v kontextu látky 14c nicméně není vysvětlen.
33. Popisu výsledků analýzy buněčného cyklu (str. 59) bych doporučoval doplnit o popis S fáze.
34. V popisu obr. 12 (str. 62) je, domnívám se, nesprávně uváděna „aktivace“ proteinů. Myslím, že v kontextu autorka měla na mysli expresi celkového proteinu.
35. V obrázku na str. 63 jsou nesprávně ztučněna čísla v posledním řádku. V popisu obrázku by z formálního hlediska měl být význam tučných čísel vysvětlen. Rovněž okolo lomítka doporučuji vymazat mezery.
36. Na str. 64 je nesprávně uveden počet buněčných linií a rozpětí viability vlivem látky 11c. Rovněž určitý omezený cytotoxický účinek vykazovaly látky 15f a 15g a nebyly komentovány. Naopak byly zařazeny do skupiny 33 látek, které neměly antiproliferační efekt.
37. Na str. 64 autorka uvádí, že „*vzhledem k pozoruhodným antiproliferačním vlastnostem inhibitorů 11c a 11d byly tyto sloučeniny vyloučeny z dalšího testování*“. Tento obrat mi nepřipadá zcela adekvátní. Spíše bych doporučoval větu formulovat ve smyslu negativního působení na nenádorovou linii.
38. V obr. 14 byly chybně zarůžověny některé výsledky s hodnotami nad 75 %. A naopak v obr. 15 chybí některé hodnoty ≤ 75 % označit. V obr. 15 bych rovněž doporučoval řazení látek dle série a abecedního pořadí.
39. V obr. 16 nebyly uvedeny výsledky statistické analýzy, ačkoliv to samé bylo provedeno u obr. 9, jenž pokrýval obdobné téma.
40. V obr. 17 bych spíše doporučil řadit jednotlivé výsledky podle buněčných linií než látek. Jednak by se zmírnilo duplikování pozitivních a negativních kontrol, za druhé by bylo možné účinek látek na danou linii lépe mezi sebou porovnat. Rovněž v obrázku chybí statistika.
41. Na str. 70 ve 3. odstavci došlo k prohození ATM a ATR. Rovněž bych trošku doplnil tvrzení, že „*prozatím je zde nedostatek vysoce selektivních inhibitorů DNA-PK*“ o „*klinicky použitelných*“.
42. Na str. 71 bych doporučoval vymazat slovo „život“ v „*biologickým poločasem života v séru*“?

Dotazy k obhajované DP:

1. Do jaké míry je možné mluvit o nově syntetizovaných látkách, jako o inhibitech DNA-PK? Na jedné straně práce usilovala o vyloučení vlivu nových inhibitorů na ATM a ATR, na druhou stranu vliv na DNA-PK přímo měřen nebyl.
2. Na str. 34 autorka uvádí, že wortmannin „byl definován jako silný nekompetitivní ireverzibilní inhibitor PI3K v roce 1933“. Je tento rok v pořádku?
3. Na str. 48 autorka uvádí struktury testovaných purinových derivátů, nicméně některé z nich strukturu purinu nenesly. Do jaké míry je možné látky ze série 15 a 18 stále za puriny považovat.
4. Co vás vedlo k zvolení pouze samic pro *in vivo* experimenty? Jaké klinické parametry byly u myši kromě hmotnosti sledovány? V textu je pouze odkaz na klinické skóre bez jeho dalšího vysvětlení. Rovněž v popisu výsledků (str. 63) o tomto parametru více uvedeno.
5. Při popisu statistiky na str. 52 autorka uvádí, že „za statisticky významný byl považován rozdíl na hladině významnosti $P \leq 0,05$ “. Co je hladina významnosti ve statice a co P?
6. Proč bylo za významný pokles viability považován pokles o 25 % a více? Proč se nepostupovalo pomocí statistické analýzy?
7. Proč byla pro stanovení IC50 doxorubicinu zvolena koncentrační řada: 0,01, 0,1, 0,2, 0,5, 1, 10, 50, 100 μM ?
8. Proč se pro měření aktivity kaspáz a indukce apoptózy použila jako referenční látka NU7441, zatímco při analýze buněčného cyklu a blotech figurovala NU7026?
9. Jakým způsobem je na str. 60 myšleno, že „výsledky profilu buněčného cyklu pocházejí z jediného reprezentativního měření“? Bylo měření provedeno alespoň 3krát? V materiálu a metodice tato informace není uvedena.
10. V popisu výsledků na str. 66 autorka hodnotí účinek látky 15g, jako látku zesilující efekt doxorubicinu. Na druhou stranu podání samotného inhibitoru mělo srovnatelný účinek, na což mě navádí průměr a velikost směrodatných odchylek. Pokud není mezi skupinami signifikantní rozdíl, do jaké míry je tedy možné tento výsledek jako synergismus chápat?
11. Čím si autorka vysvětluje (dle výsledků na str. 62) odlišný účinek látky 14d na hladinu p53 ve srovnání s referenčním inhibitorem?

V Hradci Králové dne 13. 5. 2023

pplk. doc. MUDr. Jaroslav Pejchal, Ph.D. et Ph.D.

Katedra toxikologie a vojenské farmacie, FVZ UO