



UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

500 05 Hradec Králové, Heyrovského 1203, Česká republika, <http://www.faf.cuni.cz>

tel. +420495067111, fax +420495518002

---

Oponentský posudek doktorské disertační práce

„ Interakce inhibitorů cyklin-dependentních kináz s ABC lékovými transportéry *in vitro* a *in situ*“

Mgr. Jakuba Hofmana

Program: Farmacie

Obor: Farmakologie a toxikologie

Oponent: Prof. Ing. Vladimír Wsól, Ph.D.

Katedra biochemických věd, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova

Posuzovaná disertační práce Mgr. Jakuba Hofmana je koncipována jako ucelená vědecká studie, která je předepsaným způsobem členěna a obsahuje všechny závazné oddíly.

Práce je psána v českém jazyce, obsahuje 108 stran textu, včetně seznamu 211 použitých literárních odkazů. Autor práci až na několik formálních chyb pečlivě sepsal a pečlivě rozčlenil. Velmi pozitivně lze hodnotit, že se autorovi spolu s kolektivem podařilo výsledky výzkumu uveřejnit v prestižních mezinárodních časopisech (*J Pharmacol Exp Ther* a *Pharmacol Res*) a 2 články jsou k posouzení zaslány (2x *Pharmacol Res*). Ve dvou případech je disertant na prvním místě.

Disertační práce Mgr. Jakuba Hofmana je zaměřena na studium farmakokinetických interakcí inhibitorů cyklin-dependentních kinas (CDK) s lékovými efluxními transportéry BCRP a P-gp. Cyklin-dependentní kinasy hrají klíčovou úlohu v regulaci buněčného cyklu a jsou zodpovědné za přechod buňky do S a M fáze. Bylo prokázáno, že vzrůst aktivity anebo dočasná abnormální aktivace, případně porucha inhibice, CDK vede s velkou pravděpodobností ke vzniku nádorů. Cyklin-dependentní kinasy přímo interagují s onkogeny i nádorovými supresory (pRb, p53). Naopak, overexprese přirozených inhibitorů CDK, např. proteinu p21Cip1/Waf1, brání proliferaci nádorových buněk. Právě posledně jmenovaná skutečnost vedla k hledání a následně i vývoji syntetických inhibitorů CDK proteinů, které je třeba studovat i z pohledu farmakokinetického.

V disertační práci jsou *in vitro* a *ex vivo* studovány účinky 5ti vybraných inhibitorů CDK strukturně odvozených od rostlinných hormonů cytokinů (purinové CDKi; olomoucín, olomoucín II, roskovitin, bohemin, purvalanol A) a 2 látek, jejichž struktura není založena na substituovaném adeninovém skeletu (nepurinové CDKi; flavopiridol, SNS-032). Pro studium inhibice i substrátové afinity k efluxnímu transportéru BCRP byla použita psi ledvinná epiteliální MDCKII linie transdukovaná

lidským ABCG2 genem spolu s parentní linií. Pro studium inhibice a substrátové specifity k P-gp byla využita obdobná linie transdukováná lidským ABCB1. Pomocí akumulčních a transportních metod bylo na těchto liniích prokázáno, že purinové CDKi purvalanol A, olomoucín II, behemín a roskovitín inhibují BCRP, z čehož první 2 inhibitory vykazovaly srovnatelnou inhibici k BCRP jako modelový inhibitor fumitremogin C. Rovněž bylo prokázáno, že purvalanol A inhibuje P-gp s obdobnou účinností jako specifický inhibitor LY335979.

Stejně buněčné modely byly využity ke zjištění, že olomoucín II je substrátem jak P-gp, tak BCRP, zatímco substrátová afinita purvalanolu A ani k jednomu z transportérů prokázána nebyla.

Výsledky získané z těchto *in vitro* studií byly konfrontovány s experimenty na orgánové úrovni pomocí metody duální perfúze potkaní placenty, která je na pracovišti dobře zavedena. Takto získané výsledky dobře korelovaly s těmi získanými pomocí *in vitro* studií a to jak z pohledu inhibice transportérů, tak i substrátové specifity k nim.

V závěrečné části disertace jsou popsány i experimenty ověřující aditivní nebo synergický efekt vybraných inhibitorů CDK s účinkem současně podaných cytotoxických substrátů.

K předložené disertační práci mám následující připomínky a dotazy:

- 1) České názvosloví, na rozdíl od anglického, uznává pouze jednoslovný název enzymu, tedy např. dihydrofolátreduktasa, tyrosinkinasa, a další...
- 2) Trochu rušivě působí popisy obrázků jednou v češtině, jindy v angličtině
- 3) V českém textu máme desetinné čárky ne tečky (např. str. 39 odstavec k roskovitínu), naopak v anglickém textu jsou jen tečky (obr.14 – poslední graf)
- 4) Na str.42 v posledním odstavci se zmiňuje metabolismus roskovitínu za účasti P450, který tvoří karboxylát? Jaké jsou možnosti cytochromů P450?
- 5) Na str.60 nesedí pořadí inhibičního účinku studovaných CDKi – data na předchozí straně ukazují na větší inhibiční účinek pro olomoucín II než pro roskovitín
- 6) Z textu lze vyčíst určité překvapení nad zjištěním, že olomoucín II podléhá sulfataci na ledvinné studované buněčné linii. V literatuře je doložena ledvinná exprese nejméně u isoformů SULT1A1, 1A2, 1B1, 1C1, 1C2 a 1E1. Samozřejmě vždy bude záležet na konkrétní linii.
- 7) Máte nějaké vysvětlení proč jsou některé studované inhibitory CDK také dobrými substráty některých transportérů a další strukturně velmi podobné nikoliv?
- 8) Je znám mechanismus inhibice studovaných transportérů pomocí testovaných CDKi?
- 9) Při studiu enzymů se rovněž využívají tak jako ve studiu transportérů tzv. „specifické substráty“ nebo „specifické inhibitory“. Dnes se už ví, že nejsou zdaleka tak specifické, jak se předpokládalo. Nemůže při studiu transportérů nastat situace, že tzv. „specifickým inhibitorem“ budu blokovat, tedy ovlivňovat, transport i u zatím neprozkoumaného transportéru a tím výsledek třeba trochu nebo více zkreslovat?

Závěrem je možno konstatovat, že Mgr. Jakub Hofman prokázal jak velmi dobrou orientaci ve studované problematice, tak schopnost vědecké práce završenou publikováním získaných výsledků v impaktovaných mezinárodních časopisech. Při řešení studované problematiky byly získány originální výsledky, které jsou důležitým přínosem k výzkumu farmakokinetických interakcí inhibitorů CDK s lékovými transportéry BCRP a P-gp.

Předkládanou práci hodnotím jako velmi hodnotnou vědeckou studii, která splňuje požadavky kladené na disertační práci. Vzhledem k těmto skutečnostem doporučuji, aby disertační práce byla přijata k obhajobě a aby na základě úspěšné obhajoby byl Mgr. Jakubu Hofmanovi udělen akademický titul Ph.D.

V Hradci Králové 22. 10. 2012

Prof. Ing. Vladimír Wsól, Ph.D.