

Oponentský posudek na diplomovou práci Bc. Ladislava Siváka "Polymeric conjugates for delivery of cytostatic drugs and ABC transporters inhibitors in multidrug resistant tumors" v rámci magisterského studia na Přírodovědecké fakultě UK

Diplomová práce Bc. Ladislava Siváka se zabývá aktuálním tématem, nádorovou rezistencí a možnostmi jejího ovlivnění v nádorech vykazujících mnohočetnou rezistenci. Vývin nádorové rezistence v průběhu léčby chemoterapií představuje zásadní problém, téma je tedy velmi aktuální a klinicky relevantní. Autor se ve své diplomové práci zaměřil na vytvoření a testování polymerních nosičů, na něž je navázaná vlastní aktivní látka (doxorubicin) a zároveň lze současně navázat i modifikované inhibitory ABC transportérů, které blokují schopnost „pumpování“ cizorodých látek ven z nádorových buněk.

#### **Formální kvalita předložené práce**

Práce je po formální stránce velmi dobře zpracována.

#### **Jazyk**

Práce je psána v angličtině, což hodnotím velmi pozitivně. Práce je napsána srozumitelně, i když se v textu občas objevují nepřesnosti, překlepy a formulační chyby. Například použití výrazu „alternated“ na str. 23 místo zamýšleného „altered“, či na straně 36 pak zřejmá chyba, kdy jsou uvedena dvě slovesa „are be“. Autor také často volně zaměňuje výraz ratio za ration. V práci se vyskytlo pár faktických nepřesností, např. formulace „It is well known, that cancer often express“ na str. 40, kdy bylo zamýšleno zřejmě „cancer cells often express“. Každopádně se tyto drobné chyby dají pochopit a kvalitu práce v celkovém souhrnu neruší.

#### **Hodnocení jednotlivých částí diplomové práce**

##### *1) Literární úvod*

V první části diplomové práce jsou vcelku zdařile shrnuty poznatky o molekulárních mechanismech rezistence a jednotlivých proteinech, které se na tomto fenotypu podílejí. Dle mého názoru by bylo přínosné zařadit do úvodu tabulku se shrnutím jednotlivých ABC transportérů a jejich substrátů. Nicméně literární úvod, který je popsán na 32 stranách, považuji za zcela dostatečný a oceňuji hojně použití obrázků, které přehledně ilustrují danou problematiku.

##### *2) Cíle práce*

Cíle práce jsou jasně shrnuty do tří bodů, které si kladou za cíl zmapovat expresi vybraných ABC transportérů v daném experimentálním modelu, sledování biologické aktivity vybraných inhibitorů ABC transportérů (reversin 121, reversin 205, ritonavir) a třetím bodem je pak vytvoření polymerních nosičů s navázanou cytostatickou a inhibiční složkou a testování jejich toxicity a biologické aktivity.

##### *3) Metody*

Metody zahrnují stanovení hladin proteinů pomocí western blotu, měření buněčné proliferace pomocí  $^3\text{H}$  thymidinu, stanovení ABC transportérové aktivity pomocí calceinu a také detekce apoptózy pomocí annexinového barvení a FACS analýzy. Přestože škála použitých metod není ohromující, je vyvážená velkou kvantitou proliferačních měření, kdy výsledky získaných měření zabírají plných 40 stran.

#### 4) Výsledky a Diskuse

Ve výsledcích nalezneme 17 obrázků a 5 tabulek, které obsahují dostatečné množství experimentálních dat pro vyvození odpovídajících závěrů. Vlastní kvalita prezentovaných výsledků je velmi dobrá a svědčí o zvládnutí použitých metod. Diskuse pak spojuje vyhodnocení naměřených dat se známými a publikovanými skutečnostmi a vyvozuje z nich opodstatněné závěry, což svědčí o schopnosti autora nastudovat literární prameny a dát je do souvislosti s jevy pozorovanými v jeho experimentálním systému. Nicméně vzhledem k množství získaných dat by diskuse mohla být širší než necelé tři strany. Obecné shrnutí získaných výsledků a jejich zhodnocení je však vcelku detailně popsáno v závěru práce. Velmi pozitivně hodnotím fakt, že autorem získaná data již byla použita jako základ publikace v časopise *Biomacromolecules* s IF 5.788.


#### Další připomínky a otázky:

- 1) Použitý model myších P388 a P388/MDR buněk je zcela jistě funkčním a validním modelem, nicméně se jedná o buňky myši. Jaký měli autoři důvod používat pouze myší linii a nepoužít ještě nějakou další, například lidskou linii a od ní odvozený rezistentní klon?
- 2) Použité polymery vykazují relativně nízkou toxicitu a alespoň některé deriváty ABC transportérů vykazují výrazný senzitivizující efekt. Nicméně situace *in vitro* a *in vivo* je dosti odlišná a vzhledem k mechanismu koncentrace polymerně vázaných léčiv v nádoru pomocí tzv. EPR efektu mohou být data získaná *in vivo* dosti odlišná od dat získaných *in vitro*. Plánují autoři nějaké preklinické testování vybraných konjugátů na myších modelech a za použití např. solidních nádorů?
- 3) Obrázky reprezentující testování vlivu látek na buněčnou proliferaci jsou pro mě uspořádány poněkud nelogicky od nejvyšší koncentrace po nejnižší koncentraci. Je pro toto členění nějaký důvod?
- 4) Expres konkrétních ABC transportérů stanovená pomocí western blotu je dle mého názoru relevantní jen pro Pgp, kde autor skutečně detekuje proužek o dané molekulové hmotnosti. Nicméně při detekci MRP1 a BCRP/ABCG2 je autor neúspěšný a denzitometrické vyhodnocení ve formě grafů je, dle mého názoru, nesprávné. Pokud zde mohu přispět radou, tak u proteinu ABCG2 se nám osvědčilo pouštět SDS-PAGE bez tepelné denaturace vzorků.
- 5) Při výběru derivátů ritonaviru autoři vybrali derivát MeOhe-RIT jako derivát s nejvyšší účinností inhibice ABC transportérů, avšak i druhý derivát OHe-RIT vykazoval lepší vlastnosti než původní ritonavir dle testu určujícího schopnost „vypumpování“ calceinu ven z buňky (Figure 5.4.). Nicméně při testování hodnot  $IC_{50}$  (Table 5.5), které měří vliv na buněčnou proliferaci, tam je rozdíl v efektivitě oproti původnímu ritonaviru výrazně menší, jak si to autor vysvětluje?

#### Celkové hodnocení diplomové práce

Práci hodnotím jako velmi zdařilou a doporučuji ji k obhajobě, autor prokázal, že se orientuje ve vědecké literatuře, je schopen o dané problematice přemýšlet, provést vlastní experimenty a na jejich základě vyvodit závěry a také svá zjištění publikovat. Přeji autorovi úspěšnou obhajobu a mnoho dalších úspěchů.

V Praze dne 07.9.2014



Mgr. Jaroslav Truksa Ph.D.