

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmakologie a toxikologie

Studijní program: Farmacie

Posudek oponenta diplomové práce

Autor/ka práce: **Dagmar Louvarová**

Vedoucí/školitel/ka práce: Prof. Ing. Vladimír Wsól, Ph.D.

Rok obhajoby: 2018

Konzultant/ka práce:

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

Název práce:

**Studium rezistence v nádorové terapii - vliv inhibitorů protein kinas na aktivitu
vybraných lidských reduktas I.**

Rozsah práce: počet stran: 78, počet obrázků: 30, počet tabulek: 17, počet citací: 96

Práce je: experimentální

- a) Cíl práce je: zcela splněn
- b) Jazyková a grafická úroveň: velmi dobrá
- c) Zpracování teoretické části: výborné
- d) Popis metod: výborný
- e) Prezentace výsledků: velmi dobrá
- f) Diskuse, závěry: výborné
- g) Teoretický či praktický přínos práce: výborný

Doporučuji diplomovou práci k uznání jako práci rigorózní

Případné poznámky k hodnocení: V předložené diplomové práci se autorka věnuje interakcím inhibitorů cyklin-dependentních kinas s lidskými rekombinantními enzymy redukcujícími karbonylovou skupinu. Práce je psána v českém jazyce, je logicky členěna. Jazyková úroveň je poměrně vysoká, pouze místy se vyskytují nesprávné formulace a překlepy. Experimentální rozsah práce je nadstandardní, výsledky jsou pečlivě popsány a odpovídajícím způsobem diskutovány. Celková úroveň práce je vysoká. Po obsahové ani grafické stránce k práci nemám žádné zásadní výhrady, mám pouze několik připomínek a dotazů.

Dotazy a připomínky:

Připomínky:

- 1) V práci se občas vyskytují chyby v nomenklatuře. V češtině na rozdíl od jazyka anglického píšeme enzymy jako jedno slovo. Chyba byla např. ve slovech "inhibitory protein kinas" či "aldo-keto reduktasy". V práci se též vyskytl pojem karbonylreduktasy ve smyslu celé skupiny enzymů redukcujících karbonylovou skupinu (př. str. 16). Tento název je v této asociaci zcela nevhodný a měl by být rezervován pouze pro CBR enzymy z nadrodiny SDR.
- 2) Ke každému obrázku by měl být odkaz v textu, odkazy však zcela chybí.
- 3) Na straně 10-11 uvádíte jako příčiny rezistence změny farmakokinetiky a metabolické a funkční změny buňky, přičemž ve druhé variantě chybně opět uvádíte farmakokinetické aspekty. Funkční změny souvisí se změnou farmakodynamiky léčiv, což je až na konci zmíněná např. zvýšená intenzita oprav DNA, nejčastější v praxi je však mutace cíle léčiva.

Chybné je pak tvrzení, že "jednoznačně nejčastějším způsobem vzniku rezistence jsou strukturální či funkční změny buňky, resp. zvýšení koncentrace enzymů ovlivňujících metabolismus cytostatika". Indukce ovlivňuje farmakokinetiku léčiva, nikoliv farmakodynamiku a rozhodně není nejčastější příčinou rezistence v onkologické praxi.

4) Na straně 21 píšete, že AKR1B10 má přibližně 100x vyšší aktivitu vůči daunorubicinu než AKR1B1. Publikace Bains et al., 2010 (Naturally occurring variants of human aldo-keto reductases with reduced in vitro metabolism of daunorubicin and doxorubicin) i Vaše vlastní výsledky však poukazují na to, že tento rozdíl je pouze desetinásobný. Na straně 23 je dále uvedeno, že CBR3 má mnohem vyšší aktivitu vůči daunorubicinu než CBR1, situace je však přesně opačná, čemuž opět nasvědčuje publikace Bains et al., 2010 i Vaše vlastní výsledky.

5) Na straně 21 popisujete expresi jednotlivých zástupců podrodiny AKR1C. Hlavní místa výskytu těchto enzymů však dle dostupné literatury nejsou vždy ta, která uvádíte. V odkazu citujete nepůvodní zdroj.

6) Ve Vašem uspořádání provádíte srovnání jednotlivých reduktáz při jedné koncentraci substrátu (500 μ M daunorubicin). Bez porovnání parametrů K_m , V_{max} , k_{cat} a k_{cat}/K_m není plně možné charakterizovat chování enzymu, a proto bych Vaše závěry týkající se aktivity jednotlivých enzymů bral s rezervou. Pro spolehlivé srovnání bych doporučil testování ve více koncentracích, následné proložení křivek dle příslušné kinetiky (Michaelis-Menten, popř. lineární nebo alosterická sigmoidální dle chování enzymu) a výpočet výše zmíněných parametrů.

7) Výsledky pokusu prezentované v obr. 16 a 17, byť každé opakování bylo prováděno jinou osobou, bych sloučil do jednoho grafu ve formě průměru \pm SD.

8) Na několika místech polemizujete, zda ta či ta změna byla signifikantní nebo ne. Toto si nemůžete dovolit, pokud se neřídíte statistickou analýzou. Analýza by měla být aplikována na všechna data uvedená v tabulkách.

9) Popis legend je příliš stručný, minimálně by v něm vždy měla být zmínka o tom, z kolika opakování hodnoty pochází a co jsou zač (průměr, medián, SD, SEM).

Dotazy:

1) Na straně 14 uvádíte, že na biotransformaci daunorubicinu má největší podíl AKR1B10. Jak Vaše vlastní data, tak i výsledky publikace Bains et al., 2010 ukazují, že AKR1B10 zdaleka není neaktivnějším enzymem a výrazně jej předčí enzymy CBR1, AKR7A2, AKR1C3 a AKR1A1. Má snad AKR1B10 o tolik výrazně vyšší expresi v játrech než tyto enzymy, aby tento handicap zvládl překonat?

2) V práci na vícero místech zaznívá tvrzení, že hydroxy metabolit daunorubicinol je více kardiotoxický ve srovnání s parentní látkou. Je to opravdu tak, že se metabolickou konverzí změní kardiotoxická aktivita nebo v tom hrají roli jiné faktory? Jaké jsou další teorie týkající se vzniku kardiotoxicity při léčbě antracykliny?

3) Na straně 27 prezentujete tvrzení, že fáze I klinických studií u látky AZD5438 ukázala její poměrně krátký poločas rozpadu (1 - 3 hodiny)? Mohla byste prosím popsat, co si představujete pod tímto parametrem?

4) Na str. 20 uvádíte, že v klinické praxi jsou využívány inhibitory AKR1B1 sorbinil, tolrestat, epalrestat, ranirestat, fidarestat. S výjimkou epalrestatu ostatní látky buď neprošly klinickým zkoušením nebo byly po zavedení staženy z trhu (tolrestat). I přesto je však evidentně zřejmé, že inhibice AKR1B1 je slibným terapeutickým cílem. Mohla byste podrobněji nastínit roli AKR1B1 v diabetu a přidružených kardiovaskulárních neuropatiích a vysvětlit klinický benefit inhibice tohoto enzymu?

5) V sekci 3.2.1.1 je uvedeno, že reduktasy při metabolických konverzích využívají jako kofaktor NADP⁺. Dále píšete, že právě NADP⁺ je jednou ze součástí regeneračního systému, a proto je nutné zajistit jeho dostatečné množství během celé reakce. Je tomu opravdu tak? K čemu slouží NADPH regenerační systém? Proč se používá tato komplikovanější varianta ve srovnání s využitím samotného kofaktoru? Skýtá aplikace regeneračního systému nějaké nevýhody?

6) Inhibici testujete u všech enzymů paušálně při hodnotě substrátu 500 μM , aniž byste věděla hodnotu K_m pro dané enzymy. Co hrozí při použití koncentrací substrátu nad hodnotou K_m ?

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

V Hradci králové dne 4.6.2018

.....
podpis oponentky / oponenta