
Dne 18. října 2017

Oponentský posudek disertační práce Mgr. Martina Andrše

Oponovaná disertační práce:

Autor disertace:

Mgr. Martin Andrš, Katedra toxikologie, Fakulta vojenského zdravotnictví UO
Hradec Králové

Oponent:

Prof. RNDr. Jiřina Vávrová, CSc. K Polabinám 277, 50011 Hradec Králové

Oponovaná disertační práce Mgr. Martina Andrše má celkem 180 stran. Skládá se z literárního úvodu (55 stran textu), metodické části (38 stran), výsledků práce (30 stran), diskuse a závěru (13 stran). Graficky je velmi dobře dokumentována, obsahuje 34 barevných obrázků a 11 tabulek. Literatura obsahuje 237 citací. O aktuálnosti daného tématu svědčí skutečnost, že třetina citací je z posledních pěti let. K práci jsou připojeny čtyři publikace v časopisech s IF 3,5-5,5, kde je Mgr. Andrš hlavní autor. Práce je sepsána srozumitelnou formou, dobrou angličtinou s minimem překlepů.

Cílem uvedené práce byla syntéza nových inhibitorů ATM, ATR a DNA-PK kináz s chemo- a radiosenzibilizujícím efektem a ověření jejich biologické účinnosti na vybraných nádorových liniích.

V dobře zpracovaném literárním úvodu autor popisuje současné možnosti protinádorové terapie, kde je využíváno ionizující záření a cytostatické látky. Tyto zásahy však likvidují nejen nádorové buňky, ale mají toxický efekt i na zdravé tkáně. V posledním desetiletí jsou hledány látky, které by buď samy nebo v součinnosti se zářením či cytostatickou léčbou zvyšovaly, na základě poznání molekulárních mechanismů, efekt terapie. Podíváme-li se na efekt ionizujícího záření na nádorové buňky, klíčové poškození, které může vést ke smrti těchto buněk je poškození DNA, především jednoduché a dvojité zlomy DNA. Konečným výsledkem může být neschopnost DNA působit jako předloha pro další replikaci molekuly a následně smrt buňky. Chromatinové proteiny, jimiž je DNA obklopena, ji mohou do jisté míry chránit před poškozením. Rovněž existuje celá řada reparačních mechanismů pro obnovu

struktury poškozené DNA. Zatímco jednořetězcové zlomy DNA jsou rychle reparovány především za účasti poly-(ADP-ribose)-polymerázy (PARP), dvouřetězcové zlomy DNA patří k potenciálně letálnímu poškození buňky. V lidských buňkách jsou v odpovědi na DNA poškození rychle aktivovány proteiny z rodiny tzv. proteinkináz příbuzných fosfatidylinositol-3-kináze: ataxia-teleangiectasia mutated (ATM), ataxia-teleangiectasia a Rad3-related (ATR) a katalytická podjednotka DNA-závislé proteinkinázy (DNA-PKcs). ATM a DNA-PKcs odpovídají především na dvouřetězcové zlomy DNA, zatímco kináza ATR je aktivována především jednovláknovými zlomy a procesy spojenými se zablokovanou replikační vidličkou. Protože mnoho typů poškození DNA vede jak k přímému poškození DNA, tak k bloku replikační vidličky, ATM i ATR participují dohromady v mnoha odpovědích buňky na buněčný stres. Zablokování reparační schopnosti těchto kináz pomocí malých inhibitorů se jeví jako významná cesta senzibilizace nádorových buněk k účinku záření či cytostatických látek. První molekulou, u které byly prokázány radiosenzibilizující účinky, byl kofein. Problém s jeho využitím jako radiosenzibilizátoru bylo, že se musely podávat relativně velmi vysoké dávky. Proto jsou hledány další látky, kde použité koncentrace inhibitoru ATM/ATR kináz budou podstatně menší. Další důležitou vlastností těchto inhibitorů je jejich rozpustnost.

Výsledkem disertační práce Mgr. Andrše je syntéza inhibitorů těchto tří reparačních kináz. Celkově autor nasyntetizoval 89 sloučenin, z nichž u 52 byla ověřena účinnost v kombinaci s doxorubicinem.

Ze sloučenin na bázi kofeinu s připojeným nepolárním substituentem se jako nejúčinnější jevila sloučenina K971 a K978 obsahující v pozici 4-fenyl další nepolární substituci (isopropyl, methylthio). Zatímco kofein v koncentraci 20 μM je neúčinný, obě zmíněné sloučeniny vykazovaly inhibiční efekt. Účinnost látek byla testována na jedenácti liniích, což je úctyhodný počet linií, a inhibiční efekt látek se na jednotlivých liniích značně lišil. Je tedy zřejmé, že látky budou vysoce účinné na určitém typu linií, které mají oproti normálním buňkám určitý defekt např. jsou negativní z hlediska přítomnosti proteinu p53. Nejeftivnější byly na linii A2780 a HeLa buňkách. Z molekulárního profilu je zřejmé, že látka K981 blokuje fosforylaci CHK1 způsobenou ionizujícím zářením podobně jako inhibitor VE821, který je inhibitor ATR kinázy. Inhibitory ATR kinázy jsou velmi perspektivní látky v protinádorové terapii a další výzkum v této oblasti bude velmi důležitý.

V druhé části práce autor syntetizoval sloučeniny, které na rozdíl od K971 samy neměly na nádorové buňky inhibiční efekt, posilovaly však efekt doxorubicinu. Tyto látky jsou založeny na změnách heteroatomů v základní kostře jednoho z prvních inhibitorů PI3K a PIKK LY294002. Jedná se pravděpodobně o inhibitory DNA-PK, i když specifický efekt na tuto kinázu nebyl prokázán. Na základě předpokladu, že patří mezi inhibitory DNA-PK, byl jejich efekt srovnáván se známým inhibitorem DNA-PK, sloučeninou NU7441.

První podskupina látek obsahuje chinazolin-4-on. Z této skupiny sloučenin se jako perspektivní jeví sloučeniny K1007 a K1008. Účinnost byla testována na buněčné linii HT-29. Látky neovlivňovaly fosforylaci CHK1 a CHK2 vyvolanou doxorubicinem.

Druhou podskupinou testovaných látek bylo 37 sloučenin na bázi purin-6-onu a pyrrolol[2,3-d]dipyrimidin-4-onu, tyto látky byly opět testovány v kombinaci s doxorubicinem. Pět z těchto sloučenin se jeví jako potenciální účinné inhibitory v kombinaci s doxorubicinem. Z této skupiny látek se nejvýznamnější jeví sloučeniny K1291, K1292, K1301, K1315 a K1316.

V diskuzi se autor zamýšlí nad nejvhodnějším způsobem substituce při syntéze inhibitorů. Z inhibitorů DNA-PK se jako nejúčinnější a také s nejlepší rozpustností jeví sloučenina K1292. Je však třeba lépe prozkoumat biologický efekt inhibitoru na molekulární úrovni. V současnosti je třeba přesně stanovit molekulární profil nádorových buněk u jednotlivých pacientů a navrhnout cílenou léčbu pro určitý nádor. Je tedy nutné přesně znát, na jaké úrovni nasyntetizované inhibitory zasahují. Z hlediska oponenta se jeví jako nejzajímavější inhibitory ATR kinázy, které působí především na buňky s mutovanou formou p53, což je nejméně polovina lidských nádorů.

Z předložené disertační práce je zřejmé využití moderních metod k syntéze inhibitorů, která je hlavním pilířem předložené práce. Biologická účinnost nasyntetizovaných inhibitorů byla ověřena klasickými testy. Z hlediska publikační aktivity autor překročil počet požadovaných publikací. O významu předložené práce svědčí 4 předložené publikace, kde je disertant první autor, všechny jsou s IF 3-5,5.

Otázky a připomínky recenzenta:

1/ Srovnáme-li Vámi nasyntetizovaný inhibitor ATR kinázy K-971 s inhibitorem VE-821, který je komerčně dostupný, jaké jsou hlavní výhody K-971 oproti VE-821?

2/ Pokud byste srovnal efekt K-971 na jednotlivé buněčné linie, bude výhodou tohoto inhibitoru, že nepůsobí na normální tkáň, ale ovlivňuje nádorové buňky s určitým defektem v molekulární výbavě např. je potlačen efekt tumor supresorových genů?

Z á v ě r:

Obsahem i rozsahem se jedná o práci splňující požadavky kladené na disertační práce. Autor prokázal, že je zkušeným experimentálním pracovníkem s rozsáhlými literárními znalostmi z oboru syntetické chemie, onkologie a toxikologie. Práce byla naplánována, provedena a sepsána vědecky odpovídajícím způsobem. Byly použity moderní metody syntézy inhibitorů ATM, ATR a DNA-PK kináz. Práce přispěla k nalezení možných nových látek využitelných ke zlepšení terapie nádorových onemocnění.

Předložená práce vyhovuje všem předpisům stanoveným pro disertační díla. Proto ji navrhuji **přijmout** a Mgr. Andršovi udělit vědeckou hodnost **Ph.D.**

Prof. RNDr. Jiřina Vávrová, CSc.