

**UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

Katedra biochemických věd

Studijní program: Farmacie

Posudek oponenta diplomové práce

Autor/ka práce: **Petra Lakomá**

Vedoucí práce: RNDr. Eva Novotná, Ph.D.

Rok obhajoby: 2020

Garant práce:

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

Název práce:

**Vliv alisertibu a brigatinibu na aktivitu vybraných lidských
karbonylredukujících enzymů**

Rozsah práce: počet stran: 91, počet obrázků: 28, počet tabulek: 23, počet citací: 134

Hodnocení práce:

- a) Odborná úroveň a zpracování teoretické části: výborná
- b) Náročnost použitých metod: výborná
- c) Zpracování metodické části (přehlednost, srozumitelnost): výborné
- d) Kvalita získaných experimentálních dat: výborná
- e) Zpracování výsledků (přehlednost, srozumitelnost): výborné
- f) Hodnocení výsledků včetně statistické analýzy: výborné
- g) Myšlenková úroveň a rozsah diskuse výsledků: výborná
- h) Srozumitelnost, výstižnost a adekvátnost závěrů: výborná
- i) Splnění cílů práce: výborné
- j) Množství a aktuálnost literárních odkazů: velmi dobré
- k) Jazyková úroveň (stylistická a gramatická úroveň): výborná
- l) Formální úroveň práce (členění textu, grafické zpracování): výborná

Doporučuji diplomovou práci k uznání jako práci rigorózní

Případné poznámky k hodnocení: V předložené diplomové práci se autorka věnuje vlivu dvou vybraných proteinkinázových inhibitorů na aktivitu několika antracyklinreduktáz. Práce je logicky členěna, jazyková úroveň je velmi vysoká, vyskytuje se pouze minimum překlepů, gramatických chyb nebo nesprávných formulací. Teoretická část je velice dobře zpracována, nechybí žádné důležité informace nutné pro dobrou korelaci s obsahem části experimentální. Metodický a experimentální rozsah práce je mírně nadstandardní. Výsledky jsou pečlivě popsány a odpovídajícím způsobem diskutovány. Celková úroveň práce je velmi vysoká. Po obsahové ani grafické stránce k práci nemám žádné zásadní výhrady, mám pouze několik připomínek a dotazů.

Dotazy a připomínky:

Připomínky:

- 1) Informace o mortalitě uvedené v úvodu nejsou zcela správné. Nádorová onemocnění představují příčinu téměř 30% všech úmrtí, takže uvedené jedno úmrtí ze šesti je výrazně podhodnocené.
- 2) Na str. 23 uvádíte, že "kombinovaná terapie DOX s inhibítorem CBR1, konkrétně pak OH-PP-Me (3-(7-isopropyl-4-(methylamino)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-5yl)phenol), využívána v praxi v léčbě nádorového onemocnění prsu (Jo et al. 2017)." Jedná se o experimentální přístup, ne o klinicky schválený.
- 3) Na str. 28 uvádíte oracin jako protinádorové léčivo. To je nepřesné tvrzení, neboť se jedná o experimentální látku, která nikdy nevstoupila do klinických studií.
- 4) Termín ATP-konkurenční na str. 32 je nevhodný, měl by být nahrazen termínem ATP-kompetitivní.
- 5) V popisu vlastností brigatinibu na str. 33 jsou popisovány klinické studie, což je v podstatě neaktuální informace s ohledem na to, že toto léčivo již bylo v roce 2017 schváleno pro terapii nemalobuněčného plicního karcinomu (tato informace zazní až v diskuzi).
- 6) O stránku dále uvádíte, že "Alisertib byl v roce 2012 Evropskou unií označen jako sirotčí léčivo, které bylo vyvinuto pro léčbu nádorového onemocnění vaječniku a pro léčbu periferního T-buněčného lymfomu. V roce 2016 dle Evropské lékové agentury (EMA) byl stažen z registru pro vzácná onemocnění a již se v této indikaci nikde v EU nepoužívá." Zde pozor na formulaci, zvláště poslední část vyznívá tak, že léčivo bylo schváleno a klinicky využíváno, což není pravda. "Granting" sirotčího statutu neznamená schválení.
- 7) Přehled pomůcek není zvykem uvádět, je to nepodstatný detail.
- 8) V sekci o rekombinantních enzýmech (str. 38) by bylo vhodné buď expresi a purifikaci enzymů popsat nebo alespoň použít citaci odkazující na jejich přípravu.
- 9) V práci je v seznamu zkratk zkratka CRE, ta však v podstatě není využita (je použita jenom jednou, a to v chybné verzi CR na str. 39).
- 10) V sekci 4.2.2 je uveden pouze objem enzymu glukóza-6-fosfátdehydrogenázy, což je bez uvedení "síly" zásobního roztoku nicneříkající informace.
- 11) Na str. 40 je v podsekcí Příprava enzymů chaoticky popsáno množství enzymu v reakci - nejprve píšete, že byly použity 3 ug a vzápětí rozepisujete různá odlišná množství pro jednotlivé enzymy.
- 12) Z popisu metod není vždy zcela zřejmé, zda se jedná o biologický triplicát nebo tři nezávislá měření. To je přitom velmi důležité s ohledem na možnost posouzení robustnosti a spolehlivosti dat.
- 13) Data z tabulek jsou téměř ve všech případech nadbytečně prezentována též ve formě grafů. Doporučuji vybrat pouze jednu formu prezentace dat. V rámci publikace by se jednalo o nepovolenou duplicitu.
- 14) Připomínku zásadnějšího charakteru mám k metodologii ukončení inkubace. Z literatury je známo, že alkalické pH vede k rozkladu chemické struktury antracyklinů (např. Beijnen et al.: Aspects of the degradation kinetics of doxorubicin in aqueous solution. Int J Pharmaceut 1986). Ukončení reakce amoniakem a následné vytřepání tak není vhodná metoda (navíc i samotná intenzita vytřepání je ovlivnitelná různými faktory). Alternativní metoda s methanolem a filtrací vzorku je mnohem správnější. Ve výsledku tedy důrazně doporučuji metodu s amoniakem nepoužívat. V práci navíc zmiňujete, že K_i bylo stanoveno pomocí obou metod, což určitě není vědecky správné.

Dotazy:

- 1) Jak jste vybírala koncentraci daunorubicinu (500 uM) pro screeningové hodnocení? Co by hrozilo při aplikaci koncentrace z té oblasti kinetické křivky, kde je dosahována saturace?
- 2) Podle čeho jste vybírala množství enzymu v reakci a proč se pro jednotlivé enzymy lišilo? Je hodnota IC_{50} ovlivnitelná množstvím enzymu?
- 3) Z jakého důvodu jste v experimentech měla zahrnutou zcela neovlivněnou neinhibovanou reakci? Pro normalizaci dat slouží DMSO/ethanol kontrola, proto nechápu, proč byla první jmenovaná varianta testována.

4) V případě alisertibu a enzymu AKR7A2 bylo pozorováno zvýšení aktivity o 22%. Ačkoliv by se pravděpodobně nejednalo o signifikantní interakci, zajímalo by mě, zda byla pro tento enzym někdy demonstrována možnost allosterické aktivace.

5) V diskuzi zmiňujete, že pozorovaný nekompetitivní mód inhibice by potencionálně mohl být výhodou pro překonání rezistence v klinické praxi s ohledem na to, že není ovlivnitelný koncentrací daunorubicinu. Je z Vašich dat možné zjistit, zda se jedná o inhibici reverzibilní či ireverzibilní? Znáte nějaká léčiva, která jsou schopna ireverzibilně inhibovat metabolické enzymy klinického významu (např. CYP450)? Pokud ano, jsou tato léčiva účinnější ve schopnosti vyvolat farmakokinetické interakce ve srovnání s léčivy, která působí reverzibilně?

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

V Hradci králové dne 22.5.2020

.....
podpis oponentky / oponenta