

**UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

Katedra biochemických věd

Studijní program: Bioanalytická LDZ

Posudek oponenta diplomové práce

Rok obhajoby: 2023

Autor/ka práce: **Bc. Kateřina Tučková**

Vedoucí práce: prof. Ing. Vladimír Wsól, Ph.D.

Konzultant/ka: Mgr. Lenka Laštovičková, Ph.D.

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

Název práce: **VYUŽITÍ VYBRANÝCH INHIBITORŮ K PŘEKONÁNÍ
ANTHRACYKLINOVÉ REZISTENCE V TERAPII NÁDOROVÝCH
ONEMOCNĚNÍ (IN VITRO STUDIE)**

Rozsah práce: 70 stran, 22 obrázků, 14 tabulek, >60 citací

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: | dobré |
| g) Myšlenková úroveň a rozsah diskuse výsledků: | dobrá |
| h) Srozumitelnost, výstižnost a adekvátnost závěrů: | velmi dobrá |
| 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 čtyř vybraných cílených léčiv na aktivitu několika enzymů z nadrodin AKR a SDR. Práce je logicky členěna, jazyková úroveň je vysoká, vyskytuje se relativně malé množství překlepů. Místy se vyskytují nesprávné formulace. Obsah teoretické části koreluje s obsahem části experimentální. Metodický a experimentální rozsah práce je standardní až mírně nadstandardní. Výsledky jsou sice pečlivě popsány, ale jejich analýza není zcela správná. Rovněž diskuze by zasluhovala vylepšení a rozšíření. Celková úroveň práce je i přesto vysoká.

Dotazy a připomínky:

Připomínky:

- 1) Objevují se nejednotné formy určitých výrazů, např. in-vitro vs. in vitro v kurzívě.
- 2) V úvodu bych uvítal krátkou informaci o tom, co bude náplní práce.

3) Vyskytují se nesprávná "dogmatická" tvrzení, např. že daunorubicin je nejčastěji používaným antracyklinem (str. 14) nebo že nejzávažnější mechanismus rezistence na ANT je redukce (str. 18).

4) V práci je několik nevhodných formulací, které vyúsťují ve vědeckou nesprávnost nebo přímo ve ztrátu smyslu, např. většina pacientů má obvykle pozvolný nástup (chybí nemoci; str. 13), díky čemuž narušuje expresi genu (má být genů, str. 15); dvoušroubovice DNA se rozvine, inhibuje enzym topoizomerasu II, což naruší reparační mechanismy buňky a vznikají jedno či dvouvláknové zlomy (nesprávný mechanismus, navíc reparační má být replikační), tyto enzymy jsou ve zvýšené míře exprimovány (určitě ne všechny; str. 18), AKR je základ, který symbolizuje funkci enzymu (symbolizuje nadrodinu; str. 19), mají malou molekulovou hmotnost (proteiny nikdy nemají malou MW; str. 21), výzkumná látka (je schválená pro terapii; str. 23), HER2 má sklon k metastazování do mozku (receptor ne, nádorová buňka s expresí receptoru; str. 26), graf IC50 vznikl v závislosti specifické aktivity na logaritmické koncentraci ASCI (graf ukazuje závislost aktivity na koncentraci; str. 49)

5) Zvláště působí název sekce 2.2 Inhibitory bez další specifikace, lepší alternativou by byla Cílená protinádorová léčiva.

6) Kontroly bez enzymu a bez substrátu by měly být provedeny v přítomnosti DMSO, podobně jako kontrola 100% aktivity.

7) Zkratky by měly být vždy zavedeny při prvním výskytu daného termínu v textu, ne pouze uvedeny v seznamu zkratk (chybí např. u Glc-6-P na str. 33).

8) V Tab. 4 chybí jednotková koncentrace glukosa-6-fosfátdehydrogenasy, bez ní není možné posoudit, zda je množství enzymu v regeneračním systému správné či nikoliv.

9) Zásadní výtku mám k prezentaci dat a statistické analýze. Prezentovat nezávislá opakování jedno po druhém je nesmyslné, vždy je potřeba udělat průměry nezávislých měření a stanovit směrodatné odchylky. Minimální počet nezávislých opakování pro biologické pokusy je 3, toto není splněno u screeningu. Statistická analýza je provedena v rámci technických replikátů pro jednotlivá nezávislá opakování, což je v rozporu se základními principy analýzy vědeckých dat (statistika se aplikuje na průměr nezávislých opakování). Mnohde jsou vyvozeny závěry i v případě, že se jedná o nesignifikantní změnu (např. což je v případě 10 μ M v jedné inkubaci aktivace o 7,5 % a v druhé inkubaci inhibice o 12,4 %; str. 44). Pokud není signifikantní změna, daný děj se neodehrál (!). Navíc chybí údaje o aplikovaném statistickém testu.

10) Druhou zásadní výtku mám k diskuzi, která by zasluhovala výrazné rozvedení. V aktuální verzi se jedná spíše o opakování výsledků a vysvětlení obecných zákonitostí (např. principu nekompetitivní inhibice). Diskutovat by se dalo mnoho otázek, např. vztah inhibičního účinku ke struktuře (porovnat strukturu testovaných látek se strukturou látek, které již byly prokázány jako inhibitory CREs), důležitost interakce s enzymem AKR1C3 (známý onkogen, potenciální terapeutický cíl i v monoterapii), interakce s dalšími klinicky důležitými enzymy (např. cytochromy P450) a jejich dopad na účinnost/bezpečnost kombinované léčby aj. Na konci diskuze je uvedena C_{max} asciminibu o řád špatně (cca 1,7 vs uváděných 17 μ M), což zásadně ovlivňuje závěrečnou interpretaci dat.

Dotazy

1) Na str. 17 píšete, že rakovinové buňky mohou v nádorech vytvářet prostorové bariéry, které brání adekvátnímu průtoku krve, čímž snižují účinnou expozici nádoru léčivu. Mohla byste tento děj blíže popsat? Pokud je mi známo, tak většina nádorových buněk naopak podporuje angiogenezi, aby podpořila svůj růst.

2) Z jakého důvodu se prováděla kontrola 100% aktivity bez DMSO (NI; Tab. 3)? Všechna data se vztahují ke kontrole 100% aktivity s DMSO.

3) Aplikovala jste variabilní enzymová množství pro jednotlivé isoformy AKR/CBR (Tab. 5). Co bylo důvodem? Může množství enzymu nějak ovlivnit inhibiční parametry?

4) Na str. 39 uvádíte, že asciminib aktivoval enzym AKR1A1. Nemohlo by jít o interefenci? Testovala jste možné fluorescenční vlastnosti samotného asciminibu za podmínek stanovení daunorubicinu (480/560 nm)? Jsou z literatury známy nějaké induktory diskutované isoformy?

hodnocení, práce je: velmi dobrá

k obhajobě: doporučuji

V Hradci Králové

19. května 2023

podpis oponenta/ky