

OPONENTSKÝ POSUDEK NA DISERTAČNÍ PRÁCI
„EXPRESSE ABCB1 A REZISTENCE LEUKEMICKÝCH BUNĚK.“

Disertační práce Petra Kosztyu je zaměřena mnohočetnou lékovou rezistencí u chronické myeloidní leukemie, respektive buněk, které vykazují pozitivitu na filadelfský chromozom. Mnohočetná léková rezistence je aktuálním tématem v mnoha oborech lékařství. V případě této disertační práce se úspěšně snaží přispět k rozpoznání mechanismu vzniku ve vztahu ke specifickému typu ABC-transportéru.

Disertační práce velmi pěknou formou uvede čtenáře do problematiky popisem chronické myeloidní leukemie (CML) a přístupů k léčbě tohoto onemocnění, a také popisem početné lékové rezistence. Text úvodu někdy více, někdy méně úspěšně balancuje na hraně obecných vyjádření a příliš podrobných opisů s využitím mnoha zkratk. Základní premisa práce je však z úvodu zcela jasná.

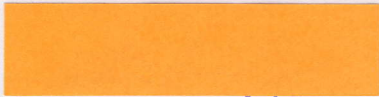
Výsledková část označená 6.1 překvapivě kromě výsledků obsahuje i vložené publikace. Není zcela jasné, proč figurují na tomto místě disertace, protože celkově není disertace koncipována jako soubor komentovaných prací. Osobně jsem očekával práce v samém závěru disertace ihned za seznamem publikací se vztahem k disertaci (str. 137). Jinak je uspořádání výsledkové části logické. Trochu na škodu je zvolené rozložení některých obrázků, např. obrázky 25 a 26 by byly mnohem přehlednější při uspořádání všech tří panelů na jedné stránce. Výsledky podporují závěry uvedené ve shrnutí na stranách 113 - 115, což dokladují i tři publikace disertanta, které prošly rigorózním recenzním řízením v impaktovaných časopisech.

K disertaci mám následující otázky a komentáře:

1. Autor disertace konstatuje rozdíl mezi detekcí exprese proteinu pomocí flowcytometru a techniky western blot. Z následné diskuse vyplývá nižší spolehlivost stanovení flowcytometrem, přitom je flowcytometr rutinně používán ke stanovení přítomnosti povrchových buněčných markerů, např. CD34. Lze tedy zpochybnit veškeré výsledky založené na detekci exprese pomocí flowcytometru?
2. V návaznosti na první otázku o problematice detekci exprese, není pak použití calceinu AM kompromitováno? Je možné využít jinou, relativně dostupnou metodu detekce akumulace xenobiotik v buňce?
3. Střední hodnota intenzity fluorescence, zde ve vztahu k měření akumulace calceinu AM, je střed píku v záznamech z flowcytometru?
4. Proč nebyla využita „klasická“ biochemie, tj. saturační křivka a její odvozené verze (např. Lineweaver-Burke), k určení kompetitivní inhibice „-tinibů“?

Celkově konstatuji, že práce přináší cenné výsledky o úloze ABCB1 v mechanismu mnohočetné lékové rezistence u pacientů s CML, což je patrné i ze tří publikací v kvalitních impaktovaných časopisech. Proto doporučuji, aby po úspěšné obhajobě byl mgr. Petrovi Kosztyu udělen akademický titul doktor ve zkratce Ph.D. dle § 47 Zákona o vysokých školách č. 111/98 Sb.

V Olomouci dne 18.11.2014


Doc. Mgr. Martin Modrianský, PhD

IČO: 652 697 05, DIČ: CZ65269705, Bankovní spojení: 71234621/0100
Nositel certifikátu ISO 9001:2000
www.fnbrno.cz

Oponentský posudek disertační práce

Název práce: Exprese ABCB1 a rezistence leukemických buněk.

Autor: Mgr. Petr Kosztu

Školitel: Doc. RNDr. Petr Mlejnek, Ph.D.

Oponent: Prof. RNDr. Jana Šmardová, CSc.

Obecná charakteristika

Předložená disertační práce se zabývá úlohou transportéru ABCB1 (P-gp) v rezistenci buněk chronické myeloidní leukemie k některým terapeutikům. Autor práce studoval (1) vztah mezi mírou exprese transportéru ABCB1 a rezistencí buněk, (2) zabýval se metodikou stanovení exprese genu ABCB1 a dále (3) studoval možnost inhibice ABCB1 vybranými inhibitory tyrosin kinas. Nepochybně se jedná o velmi významnou oblast současné onkologie. V současné době se na jedné straně rozšiřuje spektrum rutinně používaných cílených terapeutik a také spektrum typů nádorů, u kterých se používají, na druhé straně pozorujeme významný podíl nádorů, které jsou k daným terapeutikům rezistentní. Pochopení příčin a mechanismů, které jsou za rezistenci odpovědné, může pomoci najít způsoby, jak je překonat.

Hodnocení formálního zpracování

Předložená disertační práce má víceméně standardní uspořádání. Tvoří ji Úvod podávající základní informace o CML a její klíčové molekulární aberaci *BCR-ABL*. Dále je popsána cílená léčba CML inhibitory tyrosin kinas a také mechanismy rezistence k této terapii. Po stručně, ale jasně formulovaných Cílech práce následuje Metodická část, která představuje klíčové experimentální nástroje autora. K nim patří příprava experimentálních variant (lišících se mírou exprese transportéru *ABCB1*) buněčné linie K562 odvozené z chronické myeloidní leukemie a metody analýz exprese a funkce transportéru ABCB1. Kapitola Výsledky je rozdělena do tří částí (viz úvod posudku). Každá obsahuje přehledně zformulované a graficky znázorněné výstupy všech analýz a svou samostatnou diskusi. První

část (Vztah mezi expresí ABCB1a pozorovanou rezistencí leukemických buněk) je doplněna třemi publikacemi, které z těchto výsledků vycházejí a poskytují další, podrobnější, informace. Práci pak uzavírá jasně zformulované Shrnutí (v české a anglické verzi), Seznam citované literatury, Seznam použitých zkratk a přehled publikační aktivity autora. Práce je rozvržena a napsána vyváženě, adekvátně a pečlivě, po formální stránce je bez výrazných chyb.

Hodnocení odborné úrovně

Také po obsahové stránce se jedná o velmi kvalitní práci. Zadání práce, řešené úkoly jsou jasně zformulovány. Zvolené metody jsou adekvátní, dobře popsané a autorem zřetelně zvládnuté. Stanovené úkoly autor splnil. O kvalitě a hodnotě jeho výsledků svědčí i jejich úspěšné publikování v zahraničních oponovaných a impaktovaných časopisech.

Připomínky

1. Na str. 19 autor opakovaně uvádí podíly pacientů s CML, kteří dosáhli „hlavní“ cytogenetické odpovědi na terapii. V tabulce 1 na str. 16 ale taková kategorie pro hodnocení není. Co tedy „hlavní cytogenetická odpověď“ znamená?
2. Autor opakovaně používá slovo „region“ pro oblast na genu („*region*“ v angličtině). Není to špatně, ale právě slovo „oblast“ se mi zdá vhodnější.
3. Na obr. 28 (str. 92) chybí pozitivní kontrola. Bez ní je výsledek málo přesvědčivý.
4. Na obr. 30 (str. 93) je jako kontrola použita linie K562 bez měřitelné exprese P-gp. Je to vhodná kontrola?
5. V diskusi na str. 98 autor uvádí: „*Problémem metody qPCR je její velká citlivost. Můžeme pak nalézt případy, kdy není na úrovni proteinu ani funkce pozorován rozdíl, přesto lze na úrovni mRNA detekovat signifikantní změnu.*“ Je to opravdu problém citlivosti metody? Není to spíš tím, že není jasné, jaký je vztah mezi hladinou mRNA a hladinou proteinu ABCB1? Na čem pak závisí volba vhodné metody? Ví se něco o regulaci exprese transportéru ABCB1? A co přesně autor myslí tím, když navrhuje „komplexní“ analýzu exprese ABCB1?
6. Slovo „nejideálnější“ (str. 99) nepokládám za správné.

Otázky do diskuse

1. V úvodní části své práce se autor podrobně zabývá strukturou fúzního genu *BCR-ABL* a variantami chimérického proteinu Bcr-Abl (str. 9-11). Uvádí, že jednotlivé varianty jsou typicky asociovány s určitými typy onemocnění. To naznačuje, že se tyto varianty Bcr-Abl pravděpodobně liší v nějaké

významné složce své funkce, svého působení. Ví se něco o rozdílech ve fungování či regulaci jednotlivých variant chiméry Bcr-Abl? Případně o jejich vnímavosti k terapii?

2. Na str. 22 uvádí autor jako jednu z možných příčin rezistence k imatinibu amplifikaci genu *BCR-ABL*. Jak častá je amplifikace *BCR-ABL* u pacientů s CML (případně jiných onemocnění)? Ví se něco o přítomnosti klonů buněk s touto aberací před podáním imatinibu? Je detekce amplifikace v souvislosti s rezistencí k imatinibu spíše důsledkem selekce nebo indukce imatinibem?

3. Vzhledem k tomu, že se zdá, že inhibitory tyrosin kinas se v závislosti na své koncentraci (případně relativní koncentraci vzhledem ke koncentraci samotného transportéru) mohou chovat jako substráty nebo jako inhibitory transportérů, jaký se dá očekávat funkční vztah mezi hladinou inhibitoru a citlivostí buňky (Bcr-Abl) na jeho působení? Dá se čekat vztah lineární nebo půjde spíše o komplikovanější průběh?

4. Za nejméně standardní na celé disertační práci považuji řešení, které autor zvolil pro zařazení diskuse. V práci není zařazena jako samostatná kapitola, ale má podobu podkapitol jednotlivých částí kapitoly Výsledky. Rozumím, proč to takto autor vyřešil, a ani to a priori nekritizuji. Jen se mi to zdá poměrně příznačné. Diskutovány jsou jednotlivé úzce vymezené, konkrétní otázky, ale trochu mi chybí širší úhel pohledu. Především záběr směrem ke klinické praxi, k praktickému využití autorových výsledků a zkušenosti. Jaká je tedy reálná situace v blastech pacientů? Pokoušel se v nich někdo měřit hladiny transportérů? V jakých (řádově) hodnotách se pohybovaly, například ve vztahu k rozpětí hodnot dosahovaných na experimentálních liniích K562. Jak prakticky relevantní jsou výsledky dosažené autorem?

5. Čím se projevuje Tangierova nemoc (str. 36)?

Závěrečné hodnocení

Podle mého názoru Mgr. Petr Kosztyu předložil disertační práci, která splňuje všechna kritéria kladená na tento typ prací. Je prvním autorem tří původních práce, které zahrnují významnou část výsledků této disertace s celkovým IF 9,36 a spoluautorem dalších dvou publikací, které souvisejí s tématem řešeným v předložené disertaci. Proto doporučuji předloženou práci k obhajobě a na základě úspěšné obhajoby udělení akademického titulu doktor ve zkratce Ph.D. dle § 47 Zákona o vysokých školách č. 111/98 Sb.

Brno, 21.11.2014


Prof. RNDr. Jana Šmardová, CSc.