



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Děkanát, tř. Svobody 8, 771 26 Olomouc, tel./fax: 585 632 063

V Olomouci 17. prosince 2014

Zápis o konání obhajoby disertační práce v oboru Lékařská biologie

Mgr. Petr Kosztyu, vědecký pracovník Ústavu imunologie LF UP a student prezenční formy doktorského studijního programu *Lékařská biologie* na LF UP v Olomouci.

Téma práce: „**Expres ABCB1 a rezistence leukemických buněk**“

Obhajoba se konala v Olomouci dne 17. prosince 2014 v 12:40 hod.

Komise:

předseda: doc. RNDr. Vladimír Divoký, Ph.D. ✓

místopředseda: doc. MUDr. Mgr. Milan Raška, Ph.D. ✓

členové: prof. RNDr. Pavel Anzenbacher, DrSc. ✓

prof. RNDr. Mgr. Marie Jarošová CSc. ✓

doc. MUDr. Edgar Faber, Ph.D. ✓

doc. MUDr. Aleš Hampl, CSc. ✓

doc. Mgr. Martin Modrianský, Ph.D. ✓

prof. RNDr. Jana Šmardová, CSc. ✓

Oponenti:

Doc. Mgr. Martin Modrianský, Ph.D. ✓

Ústav lékařské chemie a biochemie LF UP

Prof. RNDr. Jana Šmardová, CSc. viz komise

Ústav patologie LF UM a FN Brno

Školitel: doc. RNDr. Petr Mlejnek, Ph.D. ✓

Předseda komise přednesl stručnou charakteristiku uchazeče, hodnocení školitele a vedoucího školicího pracoviště. Poté uchazeč vyložil podstatný obsah své disertace. Oponenti přednesli své posudky. Uchazeč odpověděl na připomínky a dotazy oponentů.

Ve vědecké rozpravě vystoupili: viz příloha – zápis o diskusi.

Hlasování se účastnilo členů komise. Kladně hlasovalo členů, záporně členů, neplatných lístků bylo odevzdáno

Usnesení:

Přítomní členové komise tajným hlasováním rozhodli, že **Mgr. Petr Kosztyu** obhájil disertační práci a doporučili udělení akademického titulu doktor ve zkratce Ph.D. dle § 47 Zákona o vysokých školách č. 111/98 Sb.

.....
doc. RNDr. Vladimír Divoký, Ph.D.
předseda komise

Otázky oponentů a komise při obhajobě disertační práce **Mgr. Petra Kosztyu**

Otázky doc. Modrianského:

Otázka: *Lze zpochybnit všechny výsledky zeložené na detekci exprese pomocí flowcytometru?*

Odpověď: Nelze zpochybnit všechny výsledky dosažené flowcytometrem. My pouze poukázali, že při použití dané protilátky UIC2 mohou být výsledky nespolehlivé, a to vzhledem k vlastnosti dané protilátky.

Otázka: *V návaznosti na první otázku o problematické detekci exprese, není pak použití calceinu AM kompromitováno? Jakou jinou, relativně dostupnou metodu detekce akumulace xenobiotik v buňce?*

Odpověď: Použití calceinu AM není kompromitováno, protože jsme v práci neukázali nespolehlivost calceinu, ale pouze aplikace námi používané protilátky. U calceinu je potřeba dávat pozor na přítomnost látek zvyšující nebo snižující fluorescenci a na specifičnost ve vztahu k ABC transportérům.

Otázka: *Střední hodnota intenzity fluoresce, ve vztahu k měření akumulace calceinu AM, je střed píku?*

Odpověď: Střední hodnotou jsem myslel spíše průměr, ale vzhledem k tomu, že jsme se snažili používat buňky, u kterých byla exprese P-gp a tudíž záznam z flowcytometru symetrický pík, hodnota střední hodnoty intenzity a průměrná hodnota intenzity fluorescence se velmi blíží k sobě a téměř se neliší.

Otázka: *Proč nebyla využita „klasická“ biochemie k určení kompetitivní inhibice „tinibů“?*

Odpověď: Klasickou biochemii jsme nepoužili, protože jsme chtěli co nejvěrněji napodobit situaci v buňce. Vzhledem k tomu, jaký je mechanismus transportu substrátů P-gp, rozhodli jsme se použít při inhibičních testech samotné buňky, abychom zahrnuli všechny faktory, které mohou inhibici ovlivnit, jako je např. kompetice nejen o vazebné místo P-gp, ale také kompetice o místo v membráně.

Otázky prof. Šmardové:

Otázka: *Jednotlivé varianty Bcr-Abl jsou typicky asociovány s určitými typy onemocnění. Ví se něco o fungování a regulaci jednotlivých variant chiméry Bcr-Abl? Případně o jejich vnímavosti k terapii?*

Odpověď: Jednotlivé varianty se liší velikostí a tudíž i přítomností či nepřítomností určitých domén. Právě přítomnost rozdílných domén se předpokládá za důležitý faktor. Jednotlivé varianty také interagují s některými rozdílnými proteiny a rozdílné proteiny aktivují, což může vysvětlit různost onemocnění, které jednotlivé varianty způsobují. V *in vitro* podmínkách jsou všechny varianty na terapii stejně citlivé, ale varianta p190 je více agresivní

a pacienti s variantou p190 jsou častěji rezistentní na terapii. Předpokládá se určitý vliv prostředí.

Otázka: *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?*

Odpověď: Amplifikace se vyskytuje u blastických buněk v 30 % případů. Před podáním imatinibu se vyskytuje v závislosti na fázi, kdy je pacient diagnostikován. Pokud je diagnostikován v chronické fázi, pak je amplifikace spíše nepravděpodobná, ale nelze ji ve vyjimečných případech vyloučit. Amplifikace se objevuje v souvislosti s nestabilitou genomu buněk chronické myeloidní leukemie.

Otázka: *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?*

Odpověď: Vztah mezi hladinou tyrosin kinasového inhibitoru a citlivostí buněk (Bcr-Abl) se dá očekávat velmi komplikovaný, vzhledem k tomu, kolik faktorů se na tomto vztahu podílí. Záleží na koncentraci inhibitoru, při nižších koncentracích působí inhibitory jako substráty, při vyšších poté jako inhibitory P-gp. Záleží dále na míře exprese P-gp a dalších faktorech.

Otázka: *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?*

Odpověď: Hladina P-gp v blastech buněk CML bude velmi heterogenní. Byly naměřeny jak nízké, tak vyšší hodnoty. V jedné publikaci nebyli schopni detekovat protilátkou UIC2 žádnou expresi. Obecně se ale u nádorových buněk předpokládá spíše nižší exprese, kterou nelze vůbec porovnávat s expresí nádorových linií získaných *in vitro* selekcí protinádorovým léčivem. Naše výsledky ukazují, že i když dojde k mírnému zvýšení exprese P-gp u nádorových buněk, neznamená to, že tyto budou obecně rezistentní. Mohou být případy, že buňky na jedno léčivo budou rezistentní, zatímco na druhé nikoliv. Dále jsme ukázali, že účinnost inhibice P-gp je závislá na expresi P-gp, proto je důležité testovat inhibitory P-gp na nádorových liniích, u kterých exprese P-gp odpovídá expresi P-gp nacházené u klinických vzorků.

Otázka: *Čím se projevuje Tangierova nemoc (str. 36)?*

Odpověď: Tangierova nemoc je autosomálně recesivní onemocnění, které je způsobeno mutací genu *ABCA1*. Projevuje se zvětšenými žluto-oranžovými mandlemi, zvětšenou slezinou, játry, abnormalitami oka, sníženou koncentrací cholesterolu v krvi, absencí HDL v plazmě, akumulací cholesterolu v retikulo-endotheliálních buňkách mandlí, brzlíku, lymfatických uzlin, kostní dřeni, sleziny, ukládáním tuku ve Schwannových buňkách nebo hladkém svalstvu.

Otázky členů komise v průběhu diskuze

Doc. Modrianský: *Interferují imatinib a nilotinib s calceinem AM? Jsou tedy imatinib a nilotinib kompetitivní inhibitory P-gp?*

Odpověď: Myslím, že neinterferují, což bylo ukázáno při testu na buňkách K562 bez měřitelné exprese P-gp a u kterých byla fluorescence calceinu AM neměnná. Ukázali jsme, že imatinib je slabý kompetitivní inhibitor, nilotinib byl jak kompetitivní inhibitor, tak také dokáže P-gp inhibovat nadbytkem substrátu.

Doc. Raška: *Co je známo o celkové regulaci funkce P-gp? Byly připravené buňky stejné morfologicky?*

Odpověď: P-gp je regulován velmi složitě a komplexně, ať už jde o stabilizaci mRNA, iniciaci translace, trafiking na místo určení, posttranslační modifikace a další. Připravené buňky byly skutečně morfologicky stejné.

Doc. Hampl: *Jak nestabilní jsou použité linie, co se týká nestability genomu? Začaly se buňky chovat v průběhu let odlišně?*

Odpověď: Buňky K562 jsou dosti nestabilní, dochází u nich k polyploidiím, různým přestavbám genomu. Ano, buňky se chovaly časem mírně odlišně, což jsme pozorovali na změně hodnoty IC50, při testování cytotoxického působení různých léčiv.

Doc. Divoký: *Dá se u pacienta očekávat heterogenní nebo homogenní populace buněk v souvislosti s expresí P-gp?*

Odpověď: U pacienta se dá očekávat rozhodně velmi heterogenní populace s různou expresí P-gp, ale je velmi těžké říci, v jakém rozmezí tato exprese je.

Doc. Faber: *Měli jste k dispozici také další inhibitory tyrosinových kinas?*

Odpověď: Měli jsme k dispozici ještě dasatinib, který ale nebyl v hlavních experimentech použit.