

Oponentský posudek disertační práce Mgr. Daniela Karase s názvem

**VLIV PŘÍRODNÍCH LÁTEK Z OSTROPESTŘCE MARIÁNSKÉHO
A JEJICH SEMI-SYNTETICKÝCH DERIVÁTŮ NA ANGIOGENEZI A APOPTOSU**

Disertační práce Mgr. Karase je zaměřena na studium vlivu vybraných flavonolignanů na angiogenezi, schopnost ovlivňovat proliferaci normálních a nádorových buněk a indukovat buněčnou smrt in vitro. Přírodní látky jsou zatím nevyčerpanou studnicí nových biologicky aktivních sloučenin a bohatým zdrojem inspirací pro biomedicínský výzkum obecně i pro vývoj nových léčiv a léčebných postupů. Řada úspěšně používaných léčiv má původ v přírodních zdrojích. Mezi ně patří i silymarin, extrakt ostropestřce mariánského, využívaný pro podpůrnou léčbu chronických zánětlivých jaterních onemocnění, jaterní cirhózy a toxického poškození jater. Silymarin obsahuje řadu různých polyfenolů, přičemž vlastnosti mnoha z nich nebyly doposud dostatečně popsány.

Výsledky práce dokumentují vliv vybraných flavonolignanů a jejich semisyntetických galloylesterů na endotelové buňky a nádorové buněčné linie, popisují vliv na jejich viabilitu a buněčný cyklus. V popsáných experimentech byly jako nejúčinnější identifikovány různé galloylestery DHS. Účinné koncentrace se pohybují v řádech jednotek až desítek μM . Ve srovnání s klinicky používanými léčivy nebo preparáty ve vývoji se tedy jedná o koncentrace spíše vyšší.

Výsledky experimentální práce byly publikovány v recenzovaných časopisech s IF, přičemž v jednom případě je Mgr. Karas prvním, v druhém případě pak třetím autorem. Jedná se o články v časopisech Journal of Natural Products, respektive Pharmazie. Mimo to je Mgr. Karas prvním autorem přehledného článku na téma související s disertací, který byl zveřejněn v časopise Food and Chemical Toxicology. Vzhledem k tomu, že všechny tři články jsou dílem autorského kolektivu, jeho konkrétní přínos nelze jednoznačně posoudit, i když se dá předpokládat, že prvoautorství souvisí s významným podílem na experimentech, analýze dat a jejich sepsání. Bylo by vhodné, aby během obhajoby bylo toto vyjasněno.

Po obsahové stránce se většina textu jeví poněkud nevyváženě a místy působí jako strohý výčet bez zjevné jednotící osnovy. Teoretický úvod často opakuje známé skutečnosti bez velké hloubky (např. 2.1.5 Signální dráhy PI3K/Akt a ERK, 2.2 Apoptosa nebo 2.3 Buněčný cyklus), některé kapitoly jsou až extrémně stručné (např. kapitoly 2.1.3.2.3 Sorafenib a 2.1.3.2.4 Pazopanib), jiné naproti tomu neúměrně podrobné a přitom bez přímého vztahu k tématu této práce (např. 2.1.4 Angiogenní inhibitory). Místy se tytéž informace opakují v následujících odstavcích (např. v kapitole 2.1.3.2.3 Sorafenib). Obrázky s 3D strukturami sloučenin (obr. 5-7) jsou matoucí a zbytečné, neboť v textu se o nich nediskutuje. Podobně nevhodně volené jsou obr. 8 a 10. Úroveň zpracování celé kapitoly 2.1.8 (Metody a modely pro studium angiogeneze) je velmi nízká, chybí principy jednotlivých metod; téměř výhradně jde o nedokonalý překlad jediného zdroje (citace 150) a doplňující obrázky nejsou dostatečně vysvětleny. Kapitola 2.5 Přírodní látky by se spíše měla jmenovat Polyfenoly. Jednotlivé skupiny polyfenolů (zejména flavonoidy a lignany) by měly být ilustrovány obecnými strukturními vzorci, neboť chemické definice v textu uvedené jsou pro nechemiky prakticky nečitelné. Obr. 23 je na str. 61 citován nesprávně.

Některé formulace jsou voleny nešťastně nebo nevhodně přeloženy, často se vyskytují i faktické nepřesnosti a chyby, např. tvrzení o antiangienních látkách jako nejběžněji používaných klinicky

využívaných látkách (kap. 2.1.3.2), „... efektem sunitinibu na c-KIT, základní mutaci vyskytující se...“ (kap. 2.1.3.2.2), naprosto chybně uvedená struktura endostatinu (obr. 9). Obsahově i stylisticky je velmi slabá převážná většina předposledního odstavce závěru.

Použité metody (měření viability MTT, stanovení apoptózy značením annexinem V, měření buněčného cyklu, kvantifikace buněčné migrace a tvorby tubulů z endotelových buněk) jsou poměrně konvenční, ale odpovídají stanoveným cílům a vzhledem k nim byly voleny vhodně. Popis použitých pomůcek se ovšem neobešel bez nepřesností (Burkerova komůrka ani ultrazvuk nejsou přístroje, zmíněné 16-jamkové desky xCELLigence nebyly v práci využity). Není dostatečně popsán způsob kvantifikace buněčné migrace a tvorby tubulů.

Výsledková část shrnuje účinky DHS a jeho galloylesterů na endotelové buňky HUVEC, HMEC1, fibroblasty (BJ) a na nádorové buněčné linie. Hodnocena byla cytotoxicita, migrace, schopnost tvořit tubuly, vliv na buněčný cyklus a apoptózu. Tato část je dokumentována tabulkami, obrázky a grafy. Není ovšem jasné, proč jsou výsledky s HUVEC uvedeny ve formě tabulky, zatímco výsledky s HMEC formou grafů. Tato nejednotnost komplikuje srovnání výsledků.

Významnější nedostatky spatřuji v designu některých experimentů a v jejich vyhodnocení. Funkční experimenty s buňkami HMEC (obr. 33) byly provedeny pouze s látkou 20GD, a to v cytotoxických koncentracích. Účinnost ostatních galloylesterů nebyla ověřována. Toto srovnání by bylo pro hlubší studium velmi užitečné. Protože ale byla sledována cytotoxicita 20GD v HMEC pouze po 72 h, nelze jednoznačně tvrdit, že pozorované účinky (tvorba trubic) souvisí s diferenciací buněk a ne pouze s cytotoxicitou. Vliv 20DG na buněčnou proliferaci a apoptózu měl předcházet studiu tvorby trubic a měl být kritériem pro výběr vhodných koncentrací. Tvrzení, že DHS potlačuje růst koncentračně závislým způsobem je evidentně nesprávné (obr. 32). V diskusi jsou tyto problematické pasáže sice komentovány, ale celkově působí tato část práce jako předběžná a optimalizační, na niž měly navázat pečlivěji navržené experimenty.

Poněkud nepřesvědčivá je „mechanistická“ studie účinku 20DG. Důvod ke studiu signálních drah AKT a ERK1/2 je z literatury zřejmý, ale v této práci není dostatečně vysvětlen. Není zřejmé, proč inkubace látky s buňkami trvala 6 h a zda byl tento interval nějak optimalizován. Vliv 20DG je překvapivě silnější při 5 μ M než při 10 μ M, což je neobvyklé. Vysvětlení poskytnuté v diskusi (str. 105) založené na cytotoxicitě je nepřesvědčivé, neboť na jiném místě (např. na str. 95) jsou za cytotoxické označovány obě koncentrace. Navíc prostý vizuální odhad intenzity signálu p-AKT také neodpovídá uvedené kvantifikaci (obr. 35); pokles signálu pAKT je sice patrný, ale snížení pod 20% se zdá být nereálné. Byl tento pokus opakován a jsou k dispozici další záznamy? A o kterou fosfoformu AKT se vlastně jedná? V podobných experimentech je nezbytné mít pozitivní kontroly (např. silybin nebo PI3K/mTOR inhibitor), které usnadní argumentaci a interpretaci v případě sporných výsledků.

V další výsledkové části je popisován vliv DHS a jeho galloylesterů na apoptózu v nádorových buněčných liniích. Pro sledování časové závislosti byly vybrány DHS a 23DG, ovšem každou látkou byla ovlivněna pokaždé jiná buněčná linie, přičemž každá látka byla aplikována v jiné koncentraci. 23GD navíc byla v některých časových bodech v koncentraci odlišné. Bez dalšího zdůvodnění tak realizace tohoto experimentu vypadá poněkud nekonzistentně. Nicméně výsledky ukazují očekávanou časovou změnu zastoupení apoptotických buněk.

Diskuse posuzované disertační práce se jeví jako těžkopádná, její informační hodnota nedosahuje očekávané úrovně. Zbytečně jsou opakovány experimentální detaily, naopak chybí kritické srovnání jednotlivých výsledků s publikovanými fakty a jasné vysvětlení rozporů. Prakticky se v ní neobjevuje analýza mechanismu účinku a možných molekulárních cílů studovaných sloučenin. Srovnání účinných koncentrací silybinu a silymarinu v odlišných koncentračních jednotkách ($\mu\text{mol/l}$ vs. $\mu\text{g/ml}$) postrádá smysl, protože neumožňuje přímé porovnání a posouzení hypotézy o aktivní složce extraktu. Výsledky jednotlivých experimentů jsou diskutovány v oddělených podkapitolách, což je zejména v případě účinků na HUVEC a HMEC1 nevhodné, neboť se jedná o výsledky úzce související s angiogenezí; integrace výsledků a zejména společný komentář by diskusi výrazně vylepšily. Strukturovaně je prezentován také závěr, což u takto krátké kapitoly nepovažuji za adekvátní.

V neposlední řadě bych se chtěl vyjádřit k formální stránce posuzované práce. Rozsahem se jedná o práci poměrně krátkou, odpovídající spíše práci diplomové. Členění práce je tradiční, obsahuje teoretickou část, soupis metod, popis výsledků, závěr a rozsáhlý soubor citované literatury (340 položek). Formátování textu a typografická úroveň je nízká. Autor práce zjevně neumí pracovat s členěním textu na odstavce a kapitoly. Velké množství odstavců má pouze po jedné větě. Také některé kapitoly jsou velmi krátké a obsahují 1-3 věty. Využívá desetinného třídění až do osmé úrovně, což je pro práci tohoto rozsahu poněkud zbytečné a navíc to paradoxně snižuje její přehlednost. Některé kapitoly mají nevhodně pouze jednu podkapitolu (např. kap. 2.1.7, 2.4, 2.5.1.7.2, 2.5.1.7.2.1), přičemž v jednom případě část textu vyčlenil do jediné další podřazené podkapitoly (kap. 2.5.1.7.2.1). Obrázky často přetékají na další stranu. Vzájemná pozice obrázků a tabulek a jejich legend také není optimální, rovněž často přetékají na další stranu. Formátování tabulek a obrázků je nejednotné, použité písmo se neliší od hlavního textu. Velikost obrázků vzhledem k formátu strany a velikosti písma je nevhodná. Nedokonalý je též seznam zkratk - některé zkratky vysvětluje anglicky, jiné překládá do češtiny, uvádí zde buněčné linie (jejichž označení obvykle zkratkami nejsou). To vše výrazně zhoršuje čitelnost a přehlednost celého textu.

Pro diskusi navrhuji následující otázky:

1. Jaká je rozpustnost DHS a jeho galloylesterů ve vodném prostředí a jakými metodami byla ověřována při experimentech?
2. Metodika hodnocení cytotoxicity a buněčného růstu se zdá přinejmenším sporná. Dle textu se tyto dvě metody liší pouze v délce inkubace buněk, přitom pro hodnocení buněčného růstu by měla být zahrnuta kontrola na počátku experimentu. Byla tato hodnota uvažována? Počet buněk po 72 h je dán jednak přírůstkem (proliferace), jednak úbytkem (cytotoxicita). Jakým způsobem eliminujete cytotoxický vliv v 72 h experimentu označovaném jako sledování proliferace?
3. Na základě jakých kritérií byly pro studium vybrány buňky NTERA-1, THP-1 a BJ?
4. Vliv sloučenin na angiogenezi byl sledován metodami in vitro, přičemž účinné koncentrace jsou poměrně vysoké, zvláště ve srovnání s klinicky používanými léčivy. Jaké jsou dosažitelné hladiny studovaných sloučenin in vivo? Předpokládáte, že tyto sloučeniny nebo přírodní preparáty s obsahem těchto sloučenin mohou v rozumných koncentracích vykazovat antiangiogenní účinky in vivo? Jsou plánovány pokusy s modely in vivo?
5. V závěru je uvedeno tvrzení o vyšší bezpečnosti přírodních a semisyntetických látek ve srovnání s (pravděpodobně syntetickými) protinádorovými chemoterapeutiky. Na čem se toto tvrzení zakládá?

6. Navrhněte moderní experimentální metody, kterými by šly zjistit proteinové (nebo jiné molekulární) cíle studovaných sloučenin v buňkách a jak by tyto cíle bylo možné validovat?

Přes výše uvedený soupis nedostatků a výhrad bych chtěl konstatovat, že cíle práce lze považovat za splněné. Protože práce odpovídá požadavkům, které stanovuje § 47 Zákona o vysokých školách č. 111/98 Sb, doporučuji ji s uvedenými výhradami k obhajobě a zároveň navrhuji, aby po jejím úspěšném absolvování byl Mgr. Karasovi udělen akademický titul doktor ve zkratce Ph.D.

V Olomouci, 10. června 2019



UNIVERZITA KARLOVA
Farmaceutická fakulta
v Hradci Králové

POSUDEK OPONENTA DISERTAČNÍ PRÁCE

Název disertační práce : Vliv přírodních látek z ostropestřce mariánského a jejich semi-syntetických derivátů na angiogenezi a apoptosu

Jméno doktoranda: **Mgr. Daniel Karas**

Jméno oponentky: Prof. RNDr. Lenka Skálová, Ph.D.

Předkládaná disertační práce Mgr. Daniela Karase přináší nové poznatky o účincích silybinu, 2,3-dehydrosilybinu a jejich galloylesterů v endotelových a nádorových buňkách. Zjištěné antiproliferativní a antiangiogenní působení těchto látek je nadějným příslibem jejich možného využití v léčbě nádorových onemocnění. Téma disertační práce je velmi aktuální a významné, neboť onkologická onemocnění jsou stále jednou z hlavních příčin úmrtí v rozvinutých zemích. Hledání nových přístupů pro prevenci a léčbu těchto onemocnění je proto právem v popředí vědeckého zájmu.

K teoretické části disertační práci přistoupil doktorand svědomitě, o čemž svědčí její podrobné zpracování s využitím téměř 300 citací. V teoretické části nejprve doktorand detailně seznamuje čtenáře s angiogenezí a jejím mechanismem, proangiogenními faktory a angiogenními inhibitory. Rovněž jsou v první části představeny modely a metody využívané pro studium angiogeneze. Další podkapitoly jsou pak věnovány stručnému popisu apoptosy a buněčného cyklu. Poslední podkapitola je zaměřená na polyfenoly, zvláště pak na flavonolignany ostropestřce mariánského a jejich deriváty.

Cíle disertační práce jsou výstižně a přehledně formulovány. K dosažení cílů doktorand zvolil moderní přístupy a metody. Využité buněčné modely a použité metodiky jsou adekvátně popsány v experimentální části disertační práce. Dobrá metodická úroveň experimentální práce pak byla zárukou pro získání hodnotných výsledků a jejich úspěšného publikování. Výsledky jsou přehledně prezentovány v grafech a tabulkách se stručným komentářem a následně jsou detailněji popsány a diskutovány v šesté kapitole. Hlavní dosažené výsledky jsou pak shrnuty v závěrečné kapitole.

Výsledky, které jsou obsaženy v disertační práci, se staly součástí tří vědeckých publikací v kvalitních zahraničních časopisech. Navíc je doktorand spoluautorem další vědecké publikace, která nebyla zahrnuta do disertační práce. Tato skutečnost svědčí o úspěšné práci doktoranda i celého vědeckého týmu.

Předkládaná práce splnila zadané cíle a požadavky kladené na disertační práci. Doktorand svoji práci přinesl nové informace, které rozšiřují vědecké poznání a jsou podnětem pro další vědeckou práci v dané oblasti.

K práci mám následující připomínky:

- Řazení jednotlivých podkapitol v teoretické části mi nepřipadalo zcela logické
- V českém textu se doktorand nevyhnul občasnému anglickému slovosledu, anglikanismům a nepřesným překladům (např. rat = potkan, aryl hydrocarbon receptor = receptor pro aromatické uhlovodíky)
- Názvy enzymů i sloučenin se v češtině píší dohromady (např. tyrosinkinasa, silybin-O-fosfát)
- Obrázky 3 a 17 jsou téměř nečitelné
- Členění diskuse do podkapitol podle publikací mi připadalo zbytečné, očekávala bych v této kapitole vhodné propojení výsledků. Rovněž jsem postrádala v této kapitole určitý nadhled a výhledy do dalších studií.
- Závěry by mohly být stručnější, nejlépe v bodech přesně odpovídacích jednotlivým cílům.

K práci mám následující dotazy:

- Působí všechny polyfenoly jako antioxidanty?
- Byly účinky DHS a jeho derivátů testovány *in vivo* na tumorizovaných myších?
- Byla provedena nějaká klinická (epidemiologická) studie protinádorového působení ostropestřce mariánského nebo silymarinu u lidí?

Závěr:

Předložená disertační práce a publikační aktivita Mgr. Daniela Krause mě opravňují k prohlášení, že doktorand prokázal schopnost samostatné tvořivé vědecké práce. Proto doporučuji, aby mu po úspěšné obhajobě disertační práce byl udělen titul Ph.D.

V Hradci Králové 6.5.2019

Prof. RNDr. Lenka Skálová, Ph.D.
Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta,
Katedra biochemických věd