

Posudek oponenta disertační práce

Název práce: Ovlivnění cytotoxicity xenobiotik
Autor práce: Mgr. Zdeněk Dostál
Vedoucí práce: prof. Mgr. Martin Modrianský, Ph.D.
Oponent práce: prof. PharmDr. Kamil Musílek, Ph.D.

Mgr. Zdeněk Dostál předložil k obhajobě disertační práci s tématem „Ovlivnění cytotoxicity xenobiotik“.

Práce je psána v českém jazyce a má 123 stran. Autor práci rozčlenil klasickým způsobem a uvedl diskusi k vlastním výsledkům získaným v průběhu přípravy práce i závěry z nich vyvozené. Autor cituje 276 literárních zdrojů a uvedl 3 vlastní publikované práce, u nichž je prvním autorem nebo spoluautorem.

Cíle práce jsou jasně definovány se zaměřením na 3 hlavní směry tj. studium mechanismu účinku miR-29b na cytotoxicitu etoposidu, studium vlivu mifepristonu na cytotoxicitu etoposidu a ovlivnění expresního profilu miRNA u vybraných buněčných linií kvercetinem a taxifolinem.

V Teoretické části se disertant detailně soustředil na všechna studovaná témata, které řešil v průběhu přípravy disertační práce. Přehledně zpracování této rešeršní části práce chválím a lze z ní odvodit, že disertant se problematikou obšírně zabýval. V experimentální části práce autor obšírně (ale korektně) popisuje použité techniky a metody, které používal v průběhu experimentálních prací. Je zřejmé, že disertant si musel osvojit širokou škálu experimentálních technik, aby byl schopen získat uvedené výsledky. Zpracování této části hodnotím jako kvalitní, kdy by jistě bylo možné takto popsané experimenty zopakovat na jiném pracovišti.

Části Výsledky a Diskuze autor k rozčlenil na tři oddíly dle definovaných cílů práce. Experimentální výsledky jsou zřetelně popsány a doplněny relevantní diskusí ke zjištěným skutečnostem. Autor získal velmi zajímavé výsledky, které mohou být využity v dalším výzkumu.

V závěru autor shrnuje zásadní poznatky, které získal. Dále uvedl seznam publikovaných prací (články v časopisech Jimp - 2x první autor, 1x spoluautor; prezentace na konferencích) a 1x článek v časopise Jimp (jako spoluautor), který přímo nesouvisí s disertační prací. Projekty, kterých se autor účastnil, jsou uvedeny v sekci „poděkování“ bez uvedení role disertanta v projektu.

K předložené práci mám následující dotazy/připomínky a shrnuji vybrané drobné nedostatky:

Dotazy a připomínky:

1. Ve své disertační práci jste se zabýval buněčnými *in vitro* modely pro studium toxicity vybraných protinádorových léčiv. Zajímalo by mne, zda jsou k dispozici také vhodné *in vivo* modely relevantní vámi použitým buněčným liniím? A popř. jaká je přenositelnost poznatků získaných *in vitro* na animální modely např. z literárních dat?
2. Zajímavé výsledky v kapitole 5.3.3. (Obrázek 30) byly zhodnoceny jako statisticky nevýznamné díky příliš velkým odchylkám v rámci experimentálních měření. Některé výsledky pro taxifolin statistickou významnost ukázaly pro linii Hep G2 (modul A), ačkoli pro primární kultury lidských hepatocytů se je nepodařilo získat (modul B). Podobně se nepodařilo získat statisticky významné výsledky pro kvercetin. Bylo by možné tyto odlišné výsledky nějak vysvětlit?

3. Jaká léčiva jsou schválena a používána v současné klinické praxi pro blokádu efluxních buněčných mechanismů u protinádorové terapie?

Drobné nedostatky:

1. Obrázek 5 by mohl být překreslen pomocí vhodného software podobně jako další obrázky.
2. Tabulky 1-2 jsou uvedeny příliš drobným písmem a možná by bylo vhodnější je rozdělit na více tabulek, ačkoli chápu autorovu snahu o celkový přehled pro daný oddíl textu.
3. Jaký je správný název inhibitoru ABC transportéru Tarquidar?
4. Názvy léčivých látek by měly být napsány pomocí tzv. INN (International Nonproprietary Names) názvů, které je odlišují od názvů komerčních léčiv.
5. Malé množství překlepů v textu.

Předložená disertační práce je uceleným přehledem o problematice řešené autorem. Ačkoliv by bylo možné práci ještě drobně doplnit nebo mírně dopracovat (viz. výše uvedené dotazy/připomínky a drobné nedostatky), je z ní patrné, že disertant odvedl mnoho práce, která prošla kvalitním recenzním řízením (viz. 2 publikace Jimp jako první autor) a dokládá vysokou odbornou úroveň disertanta. Proto disertační práci v předložené podobě doporučuji k obhajobě.

V Hradci Králové 5. 8. 2019

prof. PharmDr. Kamil Musílek, Ph.D.
Katedra chemie
Přírodovědecká fakulta
Univerzita Hradec Králové
Rokitanského 62
500 03 Hradec Králové



Lékařská fakulta
Univerzity Palackého
v Olomouci

Ústav klinické a molekulární
patologie

Vážená paní

prof. RNDr. Jitka Ulrichová, CSc.

Předseda oborové rady DSP Lékařská chemie a klinická biochemie

Oponentský posudek na dizertační práci Mgr. Zdeňka Dostála „Ovlivnění cytotoxicity xenobiotik“

Předkládaná práce je pečlivě vypracována v klasickém členění na 123 stranách. Teoretická část výstižně popisuje základní informace o studovaných látkách, rodině miR-29 a o vybraných proteinech zapojených zejména do procesu programované buněčné smrti. Hloubka literární rešerše je dokumentována 276 citovanými pracemi. K řešení cílů práce byla použita celá řada metod od přípravy primárních kultur hepatocytů a kultivace ustavených buněčných linií, přes sledování cytotoxicity, viability a exprese vybraných molekul, po pokročilé přístupy RNA interference, flow cytometrie a Affymetrix microarrays. Výsledky, které navazují jak na vlastní diplomovou práci, tak na problematiku dlouhodobě studovanou na Ústavu lékařské chemie a biochemie, jsou rozdělené do tří kapitol. První část je věnována především významu miR-29b pro navýšení cytotoxicity etoposidu v HeLa buňkách. Druhá část přináší detailní studium neočekávané synergie etoposidu a mifepristonu v buňkách HepG2, doplněné o funkční experimenty se specifickými inhibitory ABC transportérů v několika definovaných buněčných subliniích K562. Nakonec jsou popisovány účinky zejména taxifolinu na buňky HepG2 a primární hepatocyty. Dosažené výsledky jsou pregnantně formulovány v českém i anglickém souhrnu a většina z nich byla již publikována ve dvou prvoautorských impaktovaných pracích. Mgr. Zdeněk Dostál je také prvním autorem přehledného impaktovaného článku s přímým vztahem k dizertační práci a rovněž spoluautorem impaktované práce na příbuzné téma.

Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc
prof. MUDr. Zdeněk Kolář, CSc.,
přednosta
tel.: +420 585632451
e-mail: kolarz@tunw.upol.cz
www.lf.upol.cz



Dotazy k teoretickém úvodu:

1. Vámi studovaná miR-29 vykazuje tumor supresorové vlastnosti a její zvýšená exprese by mohla mít léčebný potenciál. Jaké jsou obecné možnosti terapeutického doručení interferujících RNA do cílových nádorových buněk?
2. Na stranách 31-33 jsou popsány výsledky *in vivo* experimentu autorů Garelnabi a kol. 2014. Fyzické cvičení je obecně považováno za příznivé, avšak v tomto případě docházelo k nárůstu exprese onkogenní miR-21. Je toto pozorování autory blíže vysvětleno nebo diskutováno?

Dotazy k vlastní práci:

1. Obrázek 15 ukazuje mírně vyšší aktivaci caspázy-3 po působení miR-29b a „c“ ve srovnání s miR-29a. Není však zřejmé, jak jednotlivé miR-29 navyšují aktivní caspázu-3 oproti působení samotného etoposidu, případně ve srovnání s neovlivněnou kontrolou. Můžete prosím prezentovat také tato data?
2. Snížení exprese anti-apoptického proteinu Mcl-1 vedlo ke snížení viability buněk ovlivněných etoposidem (obrázek 16). Byla rovněž sledována aktivace apoptózy? Druhá siRNA proti Bak zvýšila expresi obou isoform Mcl-1 (obrázek 16a, vpravo). Proč byla tato siRNA vybrána pro další experimenty (obrázek 16b)? Byl účinek na Mcl-1 pozorován opakovaně?
3. V části 5.2. poskytnete vysvětlení zajímavé synergie etoposidu s mifepristonem v buněčné linii HepG2. Plánujete otestovat význam inhibice ABC transportérů mifepristonem také u dalších nádorových linií, případně v *in-vivo* experimentech? Je nějaká kombinace cytostatika a inhibitoru ABC receptorů využívána v klinické praxi nebo testována v klinických studiích?
4. Na základě microarray dat jste vybrali k dalším analýzám miR-375 a proteiny Zeb2 a vimentin (obrázky 30-32). Ve validačních experimentech jste nepotvrdili vliv taxifolinu na miR-375, nicméně jste pozorovali mírný nárůst Zeb2 a výrazný pokles vimentinu. Byly tyto



změny spojeny se změnou morfologie buněk? Plánujete sledování dalších parametrů jako je proliferace buněk nebo jejich invazivní schopnosti?

Drobné připomínky (v rámci obhajoby není nutné reagovat):

- V obrázku 17b chybí popis tmavých a bílých sloupců.
- Na konci diskuze jsou zmíněny předběžné výsledky ohledně změn beta-cateninu po působení taxifolinu, které však nejsou uvedeny ve výsledkové části.
- Na straně 79 zmiňujete příznivý účinek androgenů na buňky karcinomu prsu díky snížené expresi miR-21. Nicméně pro terapii nejvíce problematických „triple-negativních nádorů“ s androgenovým receptorem se jako slibné jeví naopak antiandrogeny (např. Lehmann et al. 2014 PMID: 25103565, Traina et al. 2018 PMID: 29373071, Giovannelli et al. 2019 PMID: 30872694).

Mgr. Zdeněk Dostál předkládá kvalitní práci, ve které jasně prokazuje své tvůrčí schopnosti a splňuje požadavky pro udělení titulu Ph.D. v oboru Lékařská chemie a klinická biochemie.

V Olomouci 15.července 2019