



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Děkanát, Hněvotínská 3, 779 00 Olomouc

V Olomouci 29. srpna 2019

**Zápis o konání obhajoby disertační práce v oboru Lékařská chemie a
klinická biochemie**

Mgr. Daniel Karas, validační manažer a konzultant G.M. Project, Opava, student kombinované formy doktorského studijního programu *Lékařská chemie a klinická biochemie* na LF UP v Olomouci

Téma práce: „**Vliv přírodních látek z ostropestřce mariánského a jejich semi-syntetických derivátů na angiogenezi a apoptosu**“

Obhajoba se konala v Olomouci dne 29. srpna 2019 v 11:00 hod.

Komise:

předseda: prof. Mgr. Martin Modrianský, Ph.D. ✓

místopředseda: doc. RNDr. Věra Klimešová, CSc. ✓

členové: doc. RNDr. Vladimír Kryštof, Ph.D. ✓

prof. PharmDr. Kamil Musílek, Ph.D. ✓

doc. Mgr. Jan Bouchal, Ph.D. ✓

Oponenti:

prof. RNDr. Lenka Skálová, Ph.D.
Katedra biochemických věd Farmaceutické fakulty UK v Hradci Králové

doc. RNDr. Vladimír Kryštof, Ph.D. ✓
Laboratoř růstových regulátorů PřF UP v Olomouci

Školitel: prof. RNDr. Jitka Ulrichová, CSc. ✓

Předseda komise přednesl stručnou charakteristiku uchazeče, hodnocení školitele a vedoucího školicího pracoviště. Poté uchazeč vyložil podstatný obsah své disertace. Oponenti přednesli své posudky. Ve vědecké rozpravě vystoupili: viz příloha – zápis o diskusi.

Hlasování se účastnilo 5 členů komise. Kladně hlasovalo 4 členů, záporně 0 členů, neplatných lístků bylo odevzdáno 1.

Usnesení:

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

.....
prof. Mgr. Martin Modrianský, Ph.D.
předseda komise

Zápis z obhajoby disertační práce 29. 8. 2019

Mgr. Daniel Karas

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

Lékařská chemie a klinická biochemie, LF UPOL

1. Dotazy a odpovědi oponentů

A. doc. RNDr. Vladimír Kryštof, Ph.D.

a. Jaká je rozpustnost DHS a jeho galloylesterů ve vodném prostředí a jakými metodami byla ověřována při experimentech?

Látky byly použity v koncentracích, ve kterých jsou rozpustné ve vodném prostředí (limitní koncentrace je 100 μ M). Nejprve byly látky rozpuštěny v DMSO a poté ve vodném prostředí (médiu) – při kontrole pod mikroskopem nebylo pozorováno vysrážení látky. Galloylestery jsou rozpustnější, ale pro porovnání se používaly u všech látek koncentrace stejné.

b. Metodika hodnocení cytotoxicity a buněčného růstu se zdá být přinejmenším sporná. Dle textu se tyto 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 hodinách je dán jednak přírůstkem (proliferace), jednak úbytkem (cytotoxicita). Jakým způsobem eliminujete cytotoxický vliv v 72 h experimentu označovaném jako sledování proliferace?

V případě testování cytotoxicity se buňky vysejí a ihned se k nim přidají látky – výsledek se sleduje po 24 hodinách. V případě testování proliferace se buňky vysejí, nechají se 24 hodin růst, přidají se látky a výsledek se hodnotí po 72 hodinách. Jako kontrola sloužily buňky vyšetě v dané koncentraci bez přidání látek.

c. Na základě jakých kritérií byly pro studium vybrány buňky NTERA-1, THP-1 a BJ?

Experimenty na těchto buňkách byly prováděny během stáže na farmaceutické fakultě ve Štrasburku. Na tomto pracovišti jsou buňky zavedeny po dlouhou dobu, proto byly zvoleny i pro naše experimenty.

doc. RNDr. Vladimír Kryštof, Ph.D.

Vysvětlení mi nepřipadá dostatečné pro výběr buněk, nevím, jaké experimenty ve Štrasburku na těchto buňkách provádějí.

Buňky NTERA-1, THP-1 a BJ byly jediné linie, které tam měli zavedené. Provádějí experimenty, při kterých používají přírodní látky z borůvek a malin.

A které látky to jsou?

To teď přesně nevím, musel bych se podívat do publikace.

- d. 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*?**

Např. V článku Nahum M. S. et al. (2019) *Superior silybin bioavailability of silybin–phosphatidylcholine complex in oily-medium soft-gel capsules versus conventional silymarin tablets in healthy volunteers* bylo testováno dosažení plazmatické hladiny silybinu. Silybin byl podáván ve formě komplexu silybin-fosfatidylcholin v olejovitých středně měkkých kapslích či jako konvenční tablety silymarinu. Plazmatická koncentrace silybinu při podání v první zmíněné formě byla 207,1 mg/l a v případě formy tablet pak 12,6 mg/l. Antiangiogenní účinky *in vivo* jsou očekávány. Pokusy *in vivo* se provádí, závisí ovšem na množství látek, časových možnostech laboratoře a dostupnosti modelů pro studium vlivu látek na angiogenezi *in vivo*.

- e. V závěru je uvedeno tvrzení o vyšší bezpečnosti přírodních látek a semisyntetických látek ve srovnání s (pravděpodobně syntetickými) protinádorovými chemoterapeutiky. Na čem se toto tvrzení zakládá?**

To, že jsou přírodní látky (včetně silybinu) bezpečnější než chemoterapeutika je známé z publikací. V publikaci *Demain A. L. and Vaishnav P. (2010) Natural products for cancer chemotherapy* se uvádí, že se v případě chemoterapeutik rychle vytváří resistance, a že jsou to látky vysoce toxické s řadou nežádoucích vedlejších účinků a je proto důležité hledat protirakovinné léky z přírodních zdrojů. V publikaci *Zhang Q-Y. et al. (2018) Natural product intervention for chemotherapy and radiotherapy-induced side effects* bylo zmíněno, že chemoterapie a radioterapie mají vedlejší účinky a velmi snižují kvalitu života, a proto bylo pro prevenci a léčbu rakoviny schváleno použití přírodních látek. Navíc se často přírodní látky podávají společně s chemoterapeutiky pro zmírnění vedlejších účinků chemoterapie. Např. v publikaci *Křen V. and Walterová D. (2005) Silybin and silymarin – new effects and applications, Chemopreventive Efficacy of Silymarin in Skin and Prostate Cancer* bylo zmíněno, že byl testován vliv cisplatiny v kombinaci s komplexem silybin-fosfolipid (IdB 1016) na lidských buňkách rakoviny vaječníku (A2780) a *in vivo* u myší. Také byly zmíněny chemoprotektivní účinky silymarinu a silybinu – chrání před škodlivým účinkem chemických látek.

doc. RNDr. Vladimír Kryštof, Ph.D.

To je asi na delší diskusi.

Ne všechny přírodní látky jsou lepší než chemoterapeutika, ale v těchto publikacích se zmiňuje, že jsou přívětivější.

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

- Klasické „protein-based“ *in vitro* testy – měří se změny funkční aktivity hodnoceného cílového proteinu v přítomnosti testované látky, nebo se sleduje fyzikální interakce testované látky s cílovým proteinem – poskytují informace o mechanismu účinku.
- Testy se savčími buňkami - poskytují informace i bioaktivitě na buněčné úrovni:
 - Jsou buď „target-oriented“ – testy založené na luciferase, fluorescenci, nebo fenotypové – informace o změně buněčného fenotypu – např. změny v buněčné morfologii.

- Fenotypové testy mohou být použity k objevení nových cílových molekul či drah ovlivňujících příslušný fenotyp – za tímto účelem jsou změny v intracelulární signalizaci nebo expresi genů často charakterizovány technikami jako imunocytochemie, FACS-analýza, real-time PCR, imunoprecipitace, nebo „omics“ techniky (např. genomika, transkriptomika, proteomika, metabolomika) pro charakterizaci globálních změn v genové expresi, nebo množství metabolitů.
- Vedle savčích buněk se mimo jiné pro pochopení mechanismu účinku léků, nebo k identifikaci nových cílů a cílových drah látek používány kvasinky.
- Speciální soubor testů, které stojí na rozhraní *in vitro* a *in vivo* testů zahrnuje *in situ* a *ex vivo* metody s izolovanými tkáněmi, či orgány.
- Vzhledem k podobnosti savčích genomů a fyziologií a díky relativně krátkému reprodukčnímu cyklu se používají k hodnocení aktivity rostlinných extraktů, či izolovaných rostlinných produktů/látek myši a krysí modely.
- Široce jsou ve studiích farmakologické bezpečnosti a farmakokinetických studiích využívány také nehlodavci – králíci, psi, prasata a opice.
- Používají se geneticky modifikované myši (knockout genu, downregulace/ knockdown genu, nebo overexprese genu), či geneticky modifikované krysy.
- Používají se také ne-savčí živočišné modely – *Caenorhabditis elegans* a „zebrafish“ (*Danio rerio*) (Atanasov A. G. et al. (2015) *Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review.*).
- Obecně např. absorpční a fluorescenční mikroskopie, kvantitativní real-time PCR, Western blot, spektrofotometrie a fluorimetrie (Vecchione G. et al. (2016) *Silybin counteracts lipid excess and oxidative stress in cultured steatotic hepatic cells.*).
- Moderní metoda Seahorse – porovnání tří jamek – jamka s buňkami, jamka s buňkami a látkou a jamka s buňkami a inhibítozem např. glykolýzy – když se zjistí inhibice proteinu, můžeme se díky PCR podívat na expresi mRNA, zda jde o inhibici již na této úrovni, nebo ne (inhibice je např. vyvolaná změnou konformace).

- Mikroskopie atomárních sil (AFM) – např. sledování změn povrchů molekul v důsledku působení látky na tuto molekulu.
- Försterův rezonanční přenos energie (FRET) - sledování interakce mezi akceptorovou a donorovou molekulou, interakce může být ovlivněna působením látky.

doc. RNDr. Vladimír Kryštof, Ph.D.

To jste odpovídal na něco úplně jiného – nepochopil jste otázku, odpověděl jste spíš na její druhou část, ne jak vybrat cíl, ale jak byste jej validoval. Metod je hodně a také by to bylo na delší diskusi.

B. prof. RNDr. Lenka Skálová, Ph.D.

a. Působí všechny polyfenoly jako antioxidanty ?

Např. v publikaci *Halliwel B. (2008) Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies* bylo řečeno, že polyfenoly působí často jako antioxidanty, ale za určitých experimentálních podmínek mohou mít také účinky pro-oxidační. V publikaci *Croft K. D. (2016) Dietary polyphenols: Antioxidants or not?* Bylo řečeno, že je nepravděpodobné, že polyfenoly působí jako antioxidanty *in vivo*. Souvisí to s biodostupností a formou látky v organismu

prof. Mgr. Martin Modrianský, Ph.D.

Navázal bych na otázku, asi to bylo myšleno, jestli nepůsobí ještě jinak než na ovlivnění oxidačního stresu.

No ano, ovlivňují i jiné procesy, minimálně angiogenezi a apoptosu.

b. Byly účinky DHS a jeho derivátů testovány *in vivo* na tumorizovaných myších?

Galloylderiváty DHS zatím ne. Např. v publikaci *Tilley C. et al. (2016) Silibinin and its 2,3-Dehydro-derivative Inhibit Basal Cell Carcinoma Growth via Suppression of Mitogenic Signaling and Transcription Factors Activation* byl zjištěn inhibiční vliv SB a DHS na růst bazálního buněčné karcinomu u myší.

- c. Byla provedena nějaká klinická (epidemiologická) studie protinádorového působení ostropestřce mariánského nebo silymarinu u lidí ?
- i. V databázi **drugbank.ca** zmíněno, že je dokončena fáze 1 testování silymarinu na pokročilém hepatocelulárním karcinomu.
 - ii. V databázi **clinicaltrials.gov**: tři studie o tom, že se používá silymarin pro zlepšení vedlejších účinků chemoterapie, ale ne přímo k léčbě samotného tumoru:
 - 1. Silymarin (Milk Thistle Extract) in Treating Patients With Acute Lymphoblastic Leukemia Who Are Receiving Chemotherapy (dokončeno 2013) – použití silymarinu v léčbě jatrních onemocnění vyvolaným chemoterapií.
 - 2. The Efficacy of Silymarin as Adjuvant Therapy on Colorectal Cancer Patients Undergoing FOLFIRI Treatment (dokončeno 2017) – silymarin použit pro zlepšení vedlejších účinků chemoterapie (FOLFIRI) ve střevě.
 - 3. Evaluation of Effects of Silymarin on Cisplatin Induced Nephrotoxicity in Upper Gastrointestinal Adenocarcinoma (dokončeno 2015) - použití silymarinu proti cisplatinou vyvolané nefrotoxicitě.
 - iii. V databázi **clinicaltrials.gov**: dvě studie v souvislosti s přímým použitím silymarinu (silybinu) na pacientech s rakovinou:
 - 1. The Effect of High-dose Silybin-phytosome in Men With Prostate Cancer (dokončeno 2014) – podávání silybinu pacientům s rakovinou prostaty před jejím chirurgickým odstraněním.
 - 2. A Phase II Study to Assess Efficacy of Combined Treatment With Erlotinib (Tarceva) and Silybin-phytosome (Siliphos) in Patients With EGFR Mutant Lung Adenocarcinoma (dokončeno 2014) – léčba pacientů s EGFR mutantním plicním adenokarcinomem pomocí erlotinibu a silybinu.
 - iv. Na stránkách **cancer.gov (2019)**:
 - 1. zmíněno, že se silymarin klinicky testuje jako léčivo proti onemocnění jako hepatitida, cirhóza, nebo poruchy žlučníku.
 - 2. dále, že zlepšuje účinky protirakovinných léčiv (např. cisplatinu a doxorubicinu proti rakoviným buňkám vaječníků a prsu).
 - 3. Přímý efekt má silymarin proti rakovině prostaty, prsu a ektocervikálním tumorovým buňkám.

- v. Na stránkách **stephensoncancercenter.org (2019)** dělány klinické studie na lidech s akutní lymfoblastickou leukémií, rakovinou prostaty, hlavy a krku a hepatocelulárním karcinomem.

2. Dotazy a odpovědi v rámci diskuze

doc. Mgr. Jan Bouchal, Ph.D.

Zeptal bych se k western blotingu, u obrázku s fosfo-akt nevidím tak podstatný rozdíl, jak prezentujete, jak to bylo spočítáno?

Neodpovídá to...

Jak jste dělali densitometrii?

Jako přímo to zpracování?

doc. RNDr. Vladimír Kryštof, Ph.D.

Navážu, přesně toto jsem vytkl v posudku práce, čekal jsem, že to v rámci obhajoby zmíníte. Hodnocení neodpovídá kvantifikaci. Byl experiment opakován?

Byly provedeny 4 nezávislé experimenty.

doc. Mgr. Jan Bouchal, Ph.D.

Vybral jste asi reprezentativní blot, proto to neodpovídá kvantifikaci.

Při hodnocení vlivu látek na nádorové linie jste u BJ buněk použil jen kyselinu galovou, proč chyběly ostatní studované látky?

Testovalo se to se všemi látkami, ale efekt byl pouze u kyseliny gallové.

Tak to tam chtělo zmínit.

doc. RNDr. Věra Klimešová, CSc.

Studoval jste čtyři estery, z toho dva byly účinnější, čím si to vysvětlujete?

Myslím, že to může být dáno biodostupností – různý vstup látek do buněk.

Ale látky se strukturně zase tak významně neliší, jsou izomery.

I tak. Myslím, že to souvisí s biodostupností.

prof. PharmDr. Kamil Musílek, Ph.D.

Říkal jste, že 7 a 23 deriváty měly odlišné působení pro THP-1 a NTERA-2 buňky, s tím bych nesouhlasil. Také mi chybí, jak už řekl pan docent Kryštof, nebyly pořádně použity pozitivní a negativní kontroly. Něco, u čeho se už ví, že to má pozitivní působení v tomto směru. Víte, co je to PENS? Tam by se našlo dost dalších látek, které by také vyšly pozitivně.

prof. MUDr. RNDr. Vilém Šimánek, DrSc.

Já bych měl jen 2 poznámky. Jinak silymarin brát jedině jako chemoprotektivum, nehledat u něj cytostatické efekty. A pak rozdíl v účinnosti mezi mateřskou látkou a modifikovanými deriváty – to, že se spojí dvě různé látky, z nichž každá má nějaký účinek sama o sobě, finální efekt bude ovlivněn biodostupností.

prof. Ing. Jan Vacek, Ph.D.

Strukturní analoga patentních látek – ano, je tam různý vstup do buněk, ale co se zamyslet nad stabilitou. Rozdíly napříč studiemi jsou relativně malé, dá se předpokládat, že s kyslíkem budou galloylované deriváty reaktivnější, a ve finále tam nemusí být ani přítomna ta vlastní látka, kterou studujete.