



UNIVERZITA KARLOVA
Farmaceutická fakulta
v Hradci Králové

OPONENTSKÝ POSUDEK

disertační práce Mgr. Tomáše Zárybnického „Potential toxicity of terpenes and their effects in liver cells“

Charakterizace disertační práce

Námětem předložené disertační práce bylo experimentální studium toxického působení přírodních látek rostlinného původu na jaterní tkáň s využitím *in vitro* metod. Autor se zaměřil na posouzení hepatotoxického účinku vybraných terpenoidů, které jsou obsahovými látkami významných rostlinných drog používaných k přípravě rostlinných preparátů či v doplňcích stravy. Při řešení problematiky byla použita řada molekulárně biologických a biochemických metod, včetně moderních přístupů a nových indikátorů tkáňového poškození.

Předložená disertační práce je tvořena úvodem a přílohou obsahující soubor textů pěti prací disertanta, z nichž čtyři již byly publikovány v impaktovaných odborných vědeckých časopisech a v jednom případě se jedná o odeslaný manuskript publikace. V případě tří již publikovaných článků je uchazeč prvním autorem. Zaměření a obsah připojených publikací je v souladu s předmětem disertační práce. Jedná se o jeden článek typu review, jednu metodickou práci a 3 publikace zaměřené na studium interakcí terpenoidů s jaterními biologickými systémy.

Zhodnocení disertační práce

Oblast vědecké tematiky, kterou se autor ve své práci zabýval, plně odpovídá oborovému zaměření. Studium vlivu přírodních látek obsažených v používaných rostlinných drogách lze pokládat za poměrně aktuální, neboť užívání preparátů z rostlin či preparátů obohacených látkami z rostlin má i v naší oblasti stoupající tendenci. Informace o případných interakcích obsahových látek rostlin s důležitými biologickými mechanismy má proto význam z hlediska potenciálních nežádoucích účinků a interakcí se současně podávanými léčivými.

V úvodu práce autor popisuje současný stav poznání v dané oblasti a shrnuje základní teoretická východiska experimentálních prací. V této části stručně a přehledně shrnuje dostupné poznatky o toxicitě zkoumané skupiny terpenických látek, o možnostech experimentálního studia a predikce hepatotoxicity s využitím *in vitro* a *in vivo* modelů a uvádí i údaje o využití miRNA jako markerů jaterního poškození. Detailní popis použitých metod a výsledky, kterých bylo dosaženo, jsou uvedeny v jednotlivých přiložených publikacích. Získané výsledky jsou dále zhodnoceny i ve stručném komentáři připojenému ke každé z publikací. Cíle práce jsou v předložené disertační práci uvedeny. Dosažené výsledky tyto vytýčené cíle odpovídajícím způsobem naplňují. Podíl autora na experimentální práci, jejíž výsledky jsou v přiložených publikacích prezentovány, je v disertační práci specifikován v části 5. V závěru disertační práce (kap. 8) je zařazen stručný souhrn výsledků výzkumné práce doktoranda s uvedením hlavních závěrů. Literární přehled je psán srozumitelně, bez

závažných obsahových nebo formálních nedostatků. Kopie publikovaných prací jsou připojeny jako přílohy disertační práce.

Úroveň dosažených vědeckých výsledků obsažených v připojených publikacích je vysoká, o čemž svědčí skutečnost, že získaná experimentální data byla zveřejněna v recenzovaných odborných časopisech s IF 3,331 až 5,741. Vedle původních prací *in extenso* byl dle uvedených údajů (části 9 a 10) uchazeč autorem či spoluautorem řady prezentací na zahraničních a domácích odborných konferencích ve formě přednášek nebo posterů. Podíl doktoranda na experimentální práci a formulaci rukopisů publikovaných článků, který je uveden v 5. kapitole práce, svědčí o významném příspěvku disertanta k provedené výzkumné činnosti.

Výsledky předložené disertační práce přináší nová experimentální data, která mohou mít význam pro charakterizaci interakcí vybraných terpenoidních látek s jaterní tkání a další rozvoj poznatků v této oblasti výzkumu. Velkou metodickou předností provedených experimentů z hlediska translace dat je nejen využití HeparG buněk, ale především řezů z lidské jaterní tkáně, což umožnilo získání experimentálních údajů na preparátech se značně lépe zachovalou anatomickou a funkční integritou jaterní tkáně, než je tomu u buněčných či subcelulárních modelů. Z metodického pohledu lze ještě vyzdvihnout jednu oblast studia, ve které autor ověřoval stabilitu a vhodnost vybraných referenčních genů pro studie exprese na úrovni mRNA a mikroRNA, a to na poměrně rozsáhlém souboru lidské jaterní tkáně. Validní standardizace je při těchto experimentech zásadní pro hodnocení experimentálních dat.

Zajímavým přínosem disertační práce může být posouzení vlivu přírodních terpenických sloučenin na jaderné receptory PXR. Nález pravděpodobně nezávažné indukce biotransformačních enzymů závislé na PXR může být interpretován jako indikátor relativní bezpečnosti studovaných terpenoidů. Přínosné je i poukázání na velkou interindividuální variabilitu lidských jaterních vzorků v míře vnímavosti k hepatotoxickému účinku terpenoidů (publikace II) nebo v expresi biomarkerů typu miRNA (publikace II) a biotransformačních enzymů (publikace IV). Tyto nálezy potvrzují obtížnost experimentální práce při práci s lidským biologickým materiálem a nutnost důkladného ověřování výsledků ve studované oblasti.

Připomínky a dotazy oponenta:

S výjimkou odeslaného rukopisu všechny publikace, které jsou součástí této disertační práce, prošly recenzním řízením ve kvalitních odborných časopisech. Zásadní připomínky, které by zpochybňovaly cíle, metody, výsledky či závěry práce oponent nemá. Po formální stránce je disertační práce na odpovídající úrovni. Následující připomínky a dotazy oponenta jsou proto zaměřeny hlavně na upřesnění některých údajů uvedených v teoretickém úvodu a v jednotlivých publikacích:

1. V práci je zahrnut i rukopis studie odeslané k publikaci do odborného časopisu. Autor předkládá jiné čtyři již publikované práce s IF, což je počet plně splňující požadavky na danou formu disertační práce. Z tohoto důvodu se z pohledu oponenta zdá zařazení manuskriptu jako ne zcela nutné.
2. V publikaci I jsou v tab. 1 a tab. 2 uvedeny sloupce s názvem „Concentration and application“. Ovšem uváděné číselné údaje pro jednotlivé terpeny svědčí spíše o tom, že v prvním případě nejde o koncentrace, ale o dávky.
3. V jedné z publikací byl použit pro měření toxického účinku terpenoidních látek *in vitro* MTT test. Možná by bylo výhodnější z pohledu pracnosti a přesnosti využívat spíše testy, které nezahrnují krok rozpouštění vytvořeného barviva (např. MTS test).

4. Byl výběr terpenických látek motivován jejich výlučným postavením mezi rostlinnými hepatotoxiny či existují i jiné skupiny obsahových látek rostlin s hepatotoxickým potenciálem?
5. Lze nějakým způsobem zobecnit vlastnosti terpenoidů z hlediska biologické dostupnosti po perorálním příjmu? Podléhají výraznému first-pass efektu? Jakých koncentrací v plazmě mohou látky z této skupiny dosahovat? Tyto údaje jsou významné i z hlediska in vitro experimentů.
6. V poslední práci (publikace V) jste našli významnou schopnost dvou studovaných seskviterpenů produkovat ROS, a to dokonce vyšší ve srovnání s peroxidem vodíku. Existuje nějaké vysvětlení této vysoké aktivity? Jaké strukturní prvky by mohly být odpovědné za tuto vlastnost?

Závěr:

Na základě výše uvedených skutečností konstatuji, že předložená práce Mgr. Tomáše Zárybnického „Potential toxicity of terpenes and their effects in liver cells“ splňuje požadavky kladené na doktorskou disertační práci v daném oboru a dokumentuje schopnost autora samostatně vědecky pracovat na odpovídající úrovni. Odbornou kvalitu předložené práce je možné celkově hodnotit jako velmi vysokou. Doporučuji proto uvedenou disertační práci k obhajobě, na jejímž základě by měl být udělen uchazeči vědecký titul Ph.D.

V Hradci Králové dne 22.5. 2020

doc. PharmDr. František Trejtnar, CSc.