

Posudek na dizertační práci Mgr. Martina Ambrože

Seskviterpeny v protinádorové terapii

Předkládaná dizertační práce se zabývá studiem působení seskviterpenů v různých *in vitro* a *in vivo* modelech nádorových onemocnění. Hlavním motivem studia je hodnocení interakcí mezi seskviterpeny a klasickými protinádorovými léky včetně potenciálního využití těchto interakcí k omezení resistance nádorů. Tento cíl je originální a práce přináší řadu unikátních poznatků. Vědecky se práce zabývá velmi závažnou problematikou a lze tedy konstatovat, že téma dizertační práce bylo zvoleno vhodně a v souladu s nároky kladenými na doktorské studium.

Hlavní pozitiva dizertační práce

Práce je rozdělena do sekcí Úvod, Teoretická část, Cíle práce, Komentáře k publikacím, Závěry, Seznam použité literatury a Přílohy. Úvod a Teoretická část uvádí čtenáře do studované problematiky. Tato část působí konsistentně bez zbytečných podrobností a přitom nic podstatného není vynecháno. Velice oceňuji srozumitelné pojetí.

Cíle práce jsou jasně stanovené, vyplývají z informací podaných v Teoretické části, a jsou v souladu s moderními trendy výzkumu u nás i ve světě. Orientace na studium interakcí mezi přírodními látkami a běžně používanými cytostatiky představuje velmi důležitý příspěvek k dalšímu rozvoji cílené terapie a personalizované medicíny.

Komentáře k publikacím představují krátké shrnutí celkem sedmi publikovaných prací a tří prací zaslaných do impaktovaných časopisů. Doktorand je prvním autorem čtyř z těchto prací a v příloze 7.2 podrobně popisuje svůj podíl na těchto pracích. Metodicky jsou všechny práce na vysoké úrovni a výsledky studia značně rozšiřují oblast poznání či přináší zcela unikátní zjištění v oboru.

Závěry odpovídají dosaženým výsledkům. Mezi hlavní a originální výsledky patří:

- 1/ zjištění, že extrakt z *Myrica rubra* má cytotoxické účinky, zesiluje působení doxorubicinu, zvyšuje jeho intracelulární koncentraci a stimuluje oxidativní stres v *in vitro* modelu nádoru tlustého střeva Caco2.
- 2/ Detailní analýza působení hlavních složek extraktu z *M. rubra*, která zjistila jejich schopnost zvýšit protinádorové účinků doxorubicinu, 5-fluorouracilu a oxaliplatiny v *in vitro* modelech střevních nádorů a doxorubicinu v *in vivo* modelu nádoru prsu.
- 3/ Demonstrace schopnosti některých seskviterpenů inhibovat lidské cytochromy P450 *in vitro*, z níž vyplývají potenciální lékové interakce.

Výše zmíněné publikace v časopisech s celkovým impaktem kolem 20 jsou jasným důkazem, že doktorská práce Mgr. Ambrože je velmi kvalitní a zasluhuje vysoké uznání.

Počet překlepů nepřekračuje míru obvyklou u tohoto typu a rozsahu práce. Dizertace působí harmonicky a je pečlivě vypracována po stránce faktické i formální. Zároveň práce poskytuje dostatek podnětů k diskusi a zamyšlení nad možnými interpretacemi výsledků a budoucím vývojem v oboru.

Komentáře a otázky k vlastní práci

- str. 10, třetí věta pod nadpisem: formulace „Nejvíce se u obou pohlaví vyskytuje kolorektální karcinom, následovaný u žen nádory prsu a u mužů nádory prostaty.“ není moc šťastná. Podle UZIS Novotvary 2015 je u žen nejčastějším nádorem prs (26% nádorů) a u mužů prostata (23%)

následované zmíněným karcinomem tlustého střeva a konečníku (18 vs. 12%). Bylo by tedy vhodnější hovořit o incidenci u jednotlivých pohlaví.

- str. 11, druhá věta pod nadpisem: formulace ...“na základě hromadění genetických a epigenetických mutací.“ nebyla dobře zvolená – spíše by se hodilo změnit místo mutací.
- str. 11, čtvrtá věta pod nadpisem: formulace o šesti až osmi „kritických mutacích“ mi přijde vágní. Obvykle se, v tomto kontextu, hovoří o tzv. „driver“ mutacích/genech (Vogelstein et al. Science 2013), protože somatické „passenger“ mutace jsou nalézány v desítkách až stovkách genů.
- str. 16, první věta v kapitole 2.1.3.2.: režim FOLFOX (FU+leucovorin+OXPt) je rovněž často používán k paliativní léčbě kolorektálního karcinomu, který je předmětem několika prací této dizertace.
- Závěry, bod 6: tvrzení, že CAO a NER neměly v *in vivo* modelu vliv na koncentraci DOX v nádorech se neshoduje s údaji na fig. 5 z publikace VII (Hanušová et al. Biomed Pharmacother 2017), kde je patrné, že na rozdíl od plasmu, oba seskviterpeny (CAO při 100 mg/kg a NER při 50 i 100 mg/kg) v nádorech koncentraci DOX snížily.

Všechny práce přiložené k dizertaci byly recenzovány renomovanými odborníky, tudíž následující dotazy slouží spíše k podpoření diskuze a k širšímu náhledu do uvedené problematiky.

1/ Jaká je stabilita seskviterpenů ve směsi a individuálně? Jak jsou na tom různé šarže MEO? Měřili jste koncentrace seskviterpenů v inkubačních směsích s buňkami (po podání a po skončení inkubace)?

2/ Jaký je mechanismus inhibice ABCB1? V publikaci V (Ambrož et al. Molecules 2017) je z fig. 4: patrné, že proužek označený protilátkou proti ABCB1/Pgp se nachází někde mezi 200-250 kDa, ale podle Human Atlas by měl Pgp mít MW 141,5 kDa. Měli jste k dispozici standard?

3/ Proč byly použity různé testy cytotoxicity pro hepatocyty (neutral red) a Caco2 buňky (MTT)? Byly počty buněk nasazené do experimentů s hepatocyty a Caco2 shodné, nebo jak jinak byla zajištěna srovnatelnost výsledků (poměr látka vs. buněčná masa)?

4/ Řada efektů *in vitro* byla zaznamenána až při 200 μ M koncentracích seskviterpenů – jsou tyto koncentrace biologicky relevantní?

5/ V práci byla celá řada modelů, látek a jejich kombinací studována z různých pohledů. Můžete shrnout své výsledky a zkušenosti do nějakého konkrétního doporučení zda spíše extrakt nebo jednotlivý (a jaký) seskviterpen stojí za to dále studovat za účelem potlačení resistance nádorů?

Dizertační práce, dle mého názoru, splnila svůj účel, protože autor prokázal schopnost samostatné vědecké práce. Výsledky byly publikovány ve kvalitních odborných časopisech a významně rozšiřují oblast poznání. Z těchto důvodů doporučuji předloženou práci k obhajobě.

V Praze 2. listopadu 2017