
Dne 11.8.2014

***Oponentský posudek disertační práce Ing. Jany Hindřoš
Hřebačkové***

Oponovaná disertační práce:

**Působení kyseliny valproové a její účinek v kombinaci s cytostatiky
na nádorové buňky in vitro**

Autor dizertace: Ing. Jana Hindřoš Hřebačková

Oponent:

Prof. RNDr. Jiřina Vávrová, CSc.: K Polabinám 277, 500 11 Hradec Králové 11
zaměstnavatel: Fakulta vojenského zdravotnictví UO, Katedra radiobiologie, Hradec
Králové

Oponovaná disertační práce Ing. Hřebačkové má celkem 176 stran. Skládá se z literárního úvodu (44 stran), materiálu a metodiky (5 stran) výsledků práce (14 stran), diskuse a závěru (7 stran). Literatura obsahuje 375 citací. Výsledky jsou dokumentovány 24 obrázky a 7 tabulkami. V příloze je v plném znění uvedeno 6 prací kde je Ing. Hřebačková jako první autor nebo spoluautor (4 práce s IF od 1,3 do 4,25) a dvě práce v recenzovaném časopise.

Cílem disertační práce bylo zjistit, jakým způsobem ovlivňuje, inhibitor histondeacetylázy kyselina valproová neuroblastomové buněčné linie in vitro v normoxii a hypoxii. Literární úvod je obsáhlý a přehledně popisuje neuroblastom, který je nejčastějším solidním nádorem v dětském věku. V druhé části literárního úvodu je popsán vliv hypoxických podmínek na růst nádorů a především na indukci transkripčního faktoru HIF, při adaptaci nádorových buněk na hypoxické podmínky. Inhibitory histondeacetyláz inhibují HIF a vedou k usmrcení nádorových buněk v hypoxickém prostředí. Třetí část literárního úvodu je věnována protinádorové chemoterapii, především dvěma látkám, cisplatině a elliptycinu, které jsou následně

v předkládané práci užívány v kombinaci s kyselinou valproovou. Poslední část literárního úvodu je věnována kyselině valproové, která je již od roku 1970 užívána v klinické praxi jako antiepileptiku. V poslední době je zkoumán její efekt jako inhibitoru histon deacetyláz v terapii nádorových onemocnění. Acetylace histonů je jednou z nejstudovanějších posttranslačních modifikací histonů. Inhibitory histon deacetyláz zvyšují indukci apoptózy přes vzestup proapoptických proteinů rodiny Bcl-2 a naopak snižují expresi antiapoptických proteinů této rodiny. Poslední část literárního úvodu je věnována možnostem kombinace cytostatických látek a inhibitorů histon deacetyláz, za účelem zvýšení jejich protinádorového efektu.

Metodická část práce je sepsána dostatečně podrobně s uvedením všech potřebných parametrů. Autorka použila originální model neuroblastomových linií odvozených z metastáz v kostní dřeni neuroblastomu rezistentního na cisplatinu a dále linii rezistentní na ellipticin. K navození hypoxie použila autorka inkubaci buněk v hypoxické komoře obsahující 1% kyslíku. Velká část experimentální práce autorky se opírá o stanovení proteinů pomocí metody western blot, která je v práci podrobně popsána. Viabilita buněk byla testována pomocí MTT testu. Stanovila hodnoty IC50. Pomocí průtokového cytometru stanovila zastoupení buněk v buněčném cyklu a k indukci apoptózy použila dvě metody, jednak značení annexinem V a propidium jodidem a metodu TUNEL. Výsledky byly hodnoceny statisticky oboustranným t-testem na hladině $\alpha=0,05$.

Diskuse, je vzhledem k dlouhému úvodu relativně krátká, i když počet citovaných prací je velký. Významným výsledkem autorky je, že kyselina valproová (VA) se podílí na protinádorovém účinku u neuroblastomových linií nejen při kultivaci za normálních podmínek, ale také v hypoxii, kdy prokázala po inkubaci s 1 mM VA výrazné zvýšení acetylace histonu H3 i H4. Především u linie SK-N-AS prokázala po inkubaci s VA v podmínkách hypoxie, pokles transkripčního faktoru HIF. Expresí HIF-1 cílových genů byla prokázána po VA i pomocí real-time PCR. Vzestup proapoptického proteinu Bax pozorovala autorka po inkubaci s VA u všech linií v normometrii i hypoxii. Apoptóza navozená VA probíhá především aktivací vnitřní dráhy. Zvýšenou cytotoxicitu na nádorové buňky pozorovala při kombinaci VA s cisplatinou i ellipticinem. Je to pravděpodobně v důsledku rozvolnění struktury DNA po VA a lepšímu přístupu cytostatik k DNA.

Výsledky hodnocené disertační práce ukázaly, že kyselina valproová by mohla být nadějnou látkou při kombinované terapii neuroblastomů, především u nádorů rezistentních na používaná cytostatika.

Závěr :

Práce byla naplánována, provedena a sepsána vědecky odpovídajícím způsobem a přinesla nové vědecké poznatky týkající se vlivu kyseliny valproové na neuroblastomové linie. Autorka opublikovala předepsaný počet publikací. Předložená práce **vyhovuje** všem předpisům stanoveným pro disertační díla. Proto ji navrhuji **přijmout** a Ing. Hřebačkové udělit vědeckou hodnost **Ph.D.**

Prof. RNDr. Jiřina Vávrová, CSc.

