



UNIVERZITA KARLOVA
Farmaceutická fakulta
v Hradci Králové

Oponentský posudek k disertační práci

„*In vitro* studium mechanismu protinádorového účinku montaninových alkaloidů čeledi Amaryllidaceae“

Autorka: Mgr. Darja Koutová

Školitel: RNDr. Radim Havelek, Ph.D.

Instituce: Univerzita Karlova, Lékařská fakulta v Hr. Králové, Ústav lékařské biochemie

Doktorský studijní program: Lékařská chemie a biochemie

Autorka této disertační práce si zvolila velice perspektivní oblast zkoumání: studium *in vitro* protinádorové aktivity montaninových alkaloidů z čeledi Amaryllidaceae. Montaninové alkaloidy představují velice zajímavou a perspektivní skupinu alkaloidů, které jsou kvalitativně i kvantitativně minoritně zastoupené ve vybraných taxonech této čeledi. Z pohledu biologické aktivity představují málo prostudovanou skupinu látek, včetně zkoumání jejich protinádorové aktivity.

Disertační práce studentky je psaná formou komentářů k přiloženým 4 publikacím autorky a je logicky uspořádána, konzistentně a čtivě sepsaná, s minimem překlepů a je zpracována velice kvalitně i po stránce grafické. Obsahuje i dostatečný počet citací, včetně aktuálních, uvedených nad rámec v přiložených 4 publikacích (celkem 56). Úvod do problematiky podává dobrý základ pro pochopení mechanismu působení látek na buněčný cyklus a apoptózu a taky zaměření práce z hlediska protinádorové aktivity zkoumaných alkaloidů. Komentáře k jednotlivým 4 předloženým publikacím jsou psány velice výstižně, stručně, ale přehledně a popisují zaměření dané studie i dosažené výsledky, včetně jejich interpretace.

Podíváme-li se na zvolené použité metody zpracování, které kandidátka používala k dosažení a interpretaci výsledků, tak studentka použila metody, které byly naprosto vyhovující pro dosažení výsledků (naplánovaných cílů) práce. Určitě by šlo použít i jiné cross-verifikační metody pro detekci proliferace nebo apoptózy (viz otázka níže), ale nebylo by to nezbytně nutné. Osobně bych doporučoval pro *in vitro* screening cytotoxického/cytostatického účinku testovaných látek použití více než jedné kontrolní nenádorové linie (např. MRC-5 spolu s HEKa, HK-2, případně WI-38). Získal by se tak ucelenější pohled účinků testovaných látek na různé nenádorové buňky.

Shrneme-li výsledky v této práci, tak tato disertační práce přináší nové, velice zajímavé poznatky z hlediska *in vitro* studia protinádorové aktivity montaninových alkaloidů, dosud málo prozkoumaných. Před publikováním prací studentky, ve kterých je hlavním autorem nebo spoluautorem, byla známá protinádorová aktivita jen u dvou alkaloidů tohoto typu (zejména u montaninu, dále byl zkoumán i pankracin). U pankracinu nebyl dosud objasněn molekulární mechanismu působení protinádorového působení, což je nezbytné pro další podrobný výzkum tohoto alkaloidu jakožto možného potenciálního léčiva u nádorových onemocnění nebo jako farmakoforu pro

přípravu jeho derivátů, neboť tento alkaloid vykazuje *in vitro* velice slibné protinádorové účinky vůči nádorovým buněčným liniím.

Závěrem, disertační práce splnila všechny sledované cíle uvedené v disertační práci (prostudování cytostatické a cytotoxické aktivity vybraných montaninových alkaloidů s použitím panelu nádorových buněčných linií odlišného histotypu a nenádorové b. linie plicních fibroblastů, včetně poodhalení molekulárního mechanismu účinku vybraného alkaloidu pankracinu na vybrané nádorové b. linie A549 a MOLT-4).

Připomínky, komentáře:

Práce obsahuje místy drobné písařské nedostatky (jednoslovné spojky a předložky nemají být na konci řádků osamocené, pozor na správné používání spojovníku a pomlčky – zejména v seznamu citací použité literatury). Pozor na používání spojovníku – jeho funkcí je spojovat slova, případně slova a číslice – např. kaspáza -3, kaspáza -8, str. 68 (správně kaspáza-3, kaspáza-8). Spojovník by neměl být na konci řádku a číslice na začátku dalšího řádku (např. MOLT-4, str. 68).

Doporučuji při používání názvů enzymů používat názvosloví IUPAC (Chemické mezinárodní názvosloví) – nepsat koncovky enzymu jako –áza, ale –asa, přestože je to z pohledu češtiny spisovně. Psát jednotně vyjádření hodnoty IC_{50} ($\mu\text{mol.l}^{-1}$ vs $\mu\text{mol/l}$; tato nejednotnost se vyskytla v práci ojedinele). Z botanického hlediska doporučuji sjednotit psaní latinských názvů rostlin (psát latinský název rostliny s, anebo bez zkratky botanika (*Catharanthus roseus* × *Vinca rosea* L.; str. 24), osobně se přikláním uvádět za taxonomický druh i zkratku botanika, který rostlinu prvně popsal, neboť tak přesně identifikujeme, o který botanický druh se přesně jedná.

Obecně, v diskuzích v kvalifikačních pracích mají být uváděné pouze dosažené výsledky a jejich konfrontace s dosud známými publikovanými výsledky v literatuře. Proto bych první úvodní a dlouhý odstavec v diskuzi zcela odstranil – obsahuje teoretickou část již uvedenou v úvodu disertační práce.

Doplňující otázky:

1. Montaninový typ alkaloidů vzniká biosynteticky mimo jiné přeskupením molekuly haemanthaminu – můžete navzájem porovnat účinky heamanthaminu a pankracinu na nádorové b. linie z hlediska cytostatického, cytotoxického, proapoptického účinku i molekulárního mechanismu?
2. Alkaloidy z čeledi Amaryllidaceae jsou obecně velice lipofilní sloučeniny, nebyl problém s rozpustností během ředění zásobních roztoků alkaloidů v DMSO vodným médiem – nedocházelo k vypadávání (zakalení) těchto roztoků během ředění?
3. Během screeningu cytotoxicity v panelu buněčných linií jste používala jako kontrolní nenádorovou b. linii fibroblastů MRC-5. Můžete navrhnout, která jiná nenádorová linie by byla vhodná pro porovnání účinků testovaných látek z hlediska působení na nenádorové b. linie?
4. Jaké jiné cross-verifikační metody pro detekci proliferace nebo apoptózy byste mohla použít, než jsou uvedené v přiložených vašich publikacích?

Závěrem, Ph.D. studentka disertační práci potvrdila schopnost pracovat samostatně a analyzovat získané výsledky, které byly dříve publikované v zahraničních časopisech s impakt faktorem. Tato disertační práce plně splňuje kritéria a podmínky vědecké práce a výše zmíněné připomínky vůbec nesnižují její velkou kvalitu a přínos. S přihlédnutím ke všem aspektům jednoznačně doporučuji tuto práci k obhajobě.