

Oponentský posudek na disertační práci Mgr. Jitky POLJAKOVÉ „Mechanismus oxidace ellipticinu peroxidasami a jeho cytotoxicity k nádorovým buňkám“

Disertační práce Mgr. Jitky Poljakové se zabývá aktuální problematikou, studií procesů osudu léčiv a jejich mechanismu účinku v lidské tkáni. Práce je konkrétně zaměřena na metabolismus a cytotoxicitu (z hlediska léčebného) rostlinného alkaloidu ellipticinu. Ellipticin je využíván jako protinádorové agens v léčbě některých typů nádorových onemocnění (nádory prsu, antileukemické činidlo a jiné). Ve své disertační práci se J. Poljaková zaměřila na několik oblastí. Jedná se o detailní prozkoumání mechanismu působení této sloučeniny po aktivaci peroxidasami a cytochromy P450, a to především zjištěním konkrétních derivátů, které vznikají v průběhu jeho metabolismu oběma enzymovými systémy, a jsou účinnější než je parentální molekula. Dále pak o studium cytotoxicity ellipticinu na lidské buněčné nádorové linie neuroblastomů a buněčné linie leukemické. Studium je doplněno i o sledování vlivu inhibitorů histodeacetylasy na cytotoxicitu ellipticinu vůči buňkám neuroblastomů. Studium uvedené problematiky je významné jak pro optimální terapeutické využití, tak i pro poznání biochemických pochodů, kterými je daná látka v organismu přeměňována. Důležité je i pro poznání molekulárních interakcí uvedeného léčiva jako nízkomolekulárního ligandu s biologicky významnými makromolekulami (s DNA jako cílovými molekulami jeho farmakologického zásahu). Vědecká práce J. Poljakové má praktický význam v možnosti využití poznatků ke zvýšení farmakologické efektivity ellipticinu či snížení jeho vedlejších účinků. O důležitosti tématu této práce svědčí i skutečnost, že studium dané problematiky bylo finančně podporováno granty GAČR a MŠMT ČR.

Disertační práce zahrnuje vlastní text, který je členěn obvyklým způsobem pro práce obdobného typu, a uceleně a výstižně sumarizuje výsledky rozsáhlého studia, které jsou detailně uvedeny v jednotlivých publikacích tvořících přílohy disertace. Dvě z těchto prací již byly publikovány, dvě práce jsou zaslané k publikaci a dvě jsou ve formě rukopisů připravených k publikaci. Vlastní text disertační práce však obsahuje též výsledky, které ještě nebyly publikovány. Oponent má tedy poměrně usnadněnou práci v hodnocení disertace J. Poljakové, neboť část práce uvedená v publikacích již prošla náročným recenzním řízením ve výše uvedených vědeckých médiích. Úvodní část práce zevrubně informuje mimo jiné o nádorech, o působení protinádorových léčiv obecně, o ellipticinu samotném, a enzymech participujících na metabolismu léčiv (např. peroxidasach, cytochromech P450, atd.). Většina použitých metod je popsána v příložených publikacích, proto je metodická část práce stručná. Z disertační práce je však nicméně patrné, že autorka zvládla širokou škálu metod, které jsou

na úrovni současného výzkumu dané problematiky (enzymologie, spektrální metody, elektroforesy, Western blot, práce s tkáňovými kulturami, HPLC, a další). Vlastní výsledky jsou velmi zajímavé, a proto podle mého názoru jich již část byla po zásluze publikována ve vědeckých periodikách. U výsledků, které dosud publikovány nebyly, jsem přesvědčen o jejich brzkém uveřejnění. Předkládaná práce dle mého názoru rozhodně plně splnila cíle, které byly zvoleny. Ellipticin je metabolicky aktivován peroxidasami jak rostlinnými tak živočišnými včetně enzymů lidských. Výsledky prokazují efektivitu peroxidas (vedle cytochromů P450) v oxidaci ellipticinu, identifikují metabolity, které jsou těmito enzymy z ellipticinu tvořeny a demonstrují jejich účinnost v aktivaci ellipticinu na reaktivní metabolity tvořící kovalentní adukty s DNA. Vysoce oceňuji poznání mechanismu, který vysvětluje tvorbu stejných aduktů ellipticinu aktivovaného jak cytochromy P450 tak peroxidasami s DNA. Ačkoliv metabolity tvořené těmito enzymy nejsou plně shodné (cytochrom P450 oxiduje ellipticin především na hydroxylované metabolity a peroxidasy na dimer ellipticinu, pouze N^2 -oxid ellipticinu je tvořen oběma systémy), adukty aktivovaného ellipticinu s DNA jsou totožné. Studie vysvětluje tvorbu stejných reaktivních intermediátů ellipticinu použitými enzymy. Jmenovitě karbeniových iontů generovaných buď z 13-hydroxyellipticinu či při oxidaci ellipticinu na dimer a z 12-hydroxyellipticinu (tvořeného z N^2 -oxid ellipticinu). Ty jako reaktivní sloučeniny atakují DNA. Výsledky disertační práce dále prokazují vysokou cytotoxicitu ellipticinu pro lidské leukemické linie (HL-60 a CCRF-CEM), pro lidské neuroblastomové linie (IMR-32, UKF-NB-3 a NB-4) včetně linií rezistentních k jiným cytostatikům a nastiňuje vysvětlení mechanismu působení ellipticinu na testované nádorové buňky. Uvádí též výsledky experimentů prokazující zlepšení účinnosti ellipticinu na neuroblastomové linie po jejich pre-inkubaci s inhibitory histondeacetylasy. Zahájeny byly i studie nutné k poznání mechanismu vzniku rezistence neuroblastomů k ellipticinu i dalším cytostatikům.

Získané výsledky jsou v disertační práci adekvátně hodnoceny a tvoří hodnotný základ pro rozvoj vědeckého bádání v této oblasti do budoucnosti. Navíc je základem i pro praktické využití.


Disertační práce Mgr. Jitky Poljakové je i po stránce formální dobře zpracována. Považuji ji za odborně velmi zdařilou a zajímavou. K práci mám následující dotazy a poznámky:

- 1) Ellipticin je v této práci prokázán účinným cytotoxickým agens pro některé nádorové linie, Působí také na normální buňky? Do jaké míry? Jak se vyrovnají s ellipticinem orgány bohaté na CYP a peroxidasy, játra, nadledvinky, plíce, atd....?

- 2) Je pravdou uvedená incidence neuroblastomů 7-10%? Znamená to, že téměř každé desáté novorozeně je postiženo? Tato hodnota je pro ČR nebo má širší geografický význam?
- 3) Co znamená zkratka IVS (strana 8)? Není v seznamu zkratek. Podle mého názoru uvádění výsledků formou Tab. 8 a obr. 18 je duplikace výsledků. „Invadovat“ (strana 7) má jiný význam než je český výraz „zasahovat“.
- 4) Jako mechanismus vzniku mnohočetné lékové rezistence je uvedeno vypuzení cytostatik mimo buňky pomocí transportních proteinů. Jsou cytostatika beze změn, nebo biotransformační enzymy hrají v tomto procesu nějakou úlohu?
- 5) Vyvolává se léková rezistence proti ellipticinu u pacientů, pokud ano jak často ve srovnání s jinými cytostatiky?
- 6) Lze považovat dimerizaci ellipticinu za jeho detoxikační reakci v buňkách? Nebo se jedná o přechodný stav?
- 7) Jako pravděpodobný mechanismus cytotoxického působení ellipticinu v nádorových buňkách jste uvedla jeho kovalentní interakce s DNA. Předpokládám, že oxidační reakce ellipticinu v buňce jsou lokalizovány mimo jádro, a DNA modifikující produkt ellipticinu musí být velmi aktivní a okamžitě reagující s okolními makromolekulami. Zřejmě ve větším měřítku musí být modifikovány proteiny a RNA než DNA. Jak se dá vysvětlit reakce s jadernou DNA? Je možné, že tvořící se adukty ellipticinu s deoxynukleotidy jsou svým původem adukty s mitochondriální DNA? Není pravděpodobnější mechanismus účinku cytotoxicity ellipticinu v modifikaci pro buňku životně důležitých molekul typu proteinů nebo RNA než v jádře lokalizované DNA?
- 8) Vysvětlíte princip „komparativní genomová hybridizace“.

Po celkovém zhodnocení předložené disertační práce Mgr. Jitky Poljakové mohu konstatovat, že plně odpovídá nárokům kladeným na disertační práce k udělení titulu **Ph.D.** a doporučuji, aby byla podkladem k udělení tohoto titulu ve smyslu Zákona o vysokých školách a navazujících prováděcích předpisů.

V Praze, 16. 05. 2006


RNDr. Befekadu Asfaw Debela, CSc.

Ústav dědičných metabolických poruch, 1. LF UK