



POSUDEK NA DIZERTAČNÍ PRÁCI Mgr. KATEŘINY KUBEŠOVÉ „IN VITRO BIOLOGICAL ACTIVITY OF SELECTED COMPLEXES OF TRANSITION METALS“ (UP, Přírodovědecká fakulta, Olomouc)

Oponent: RNDr. Miroslav Machala, CSc.

1. Odborná charakteristika dizertační práce

Dizertační práce Mgr. Kateřiny Kubešové se zabývá studiem efektů vybraných koordinačních sloučenin (komplexů Cu a Au) s potenciálním farmakologickým významem na transkripční aktivity nukleárních receptorů a aryluhlovodíkového receptoru. V práci byly využity reportérové eseje v kombinaci s dalšími moderními metodami – EMSA, qRT-PCR a Western blotting.

Teoretická část se skládá z kapitol o transitních kovech Cu a Au a jejich vybraných komplexních sloučeninách, o metabolismu cizorodých látek s důrazem na cytochromy P450 podrodin 1, 2 a 3 a o transkripčních faktorech kontrolujících expresi těchto CYP enzymů, tedy AhR, CAR a PXR. Teoretickou část lze hodnotit celkově jako kvalitní, i přes drobné nedostatky a chyby (např. kapitola 3.2 o XME obsahuje jen starší citace a tabulka 2 naopak nezahrnuje fázi III; AhR není nukleárním receptorem apod.).

Metodická část shrnuje stručně, ale zasvěceně hlavní použité metodiky a je doplněna základními citacemi.

Dvě originální práce zabývající se efekty vybraných Cu- a Au-komplexních sloučenin s medicínským potenciálem na aktivity transkripčních faktorů AhR, PXR, GR, AR, TR a VDR. Luciferázové reportérové eseje byly kombinovány s měřením vybraných cílových genů metodami RT-PCR event. EMSA a Western blotting. Byla získána kvalitní a konsistentní data publikovaná v zahraničních časopisech. Aktuálnost získaných dat je podepřena již proběhlým oponentním řízením jednotlivých vědeckých publikací.

Diskuse (kap. 6) je stručná, ale přesně popisuje selektivní efekty komplexních sloučenin na transaktivaci AhR a nukleárních receptorů. Dizertační práce obsahuje také závěry a dvě publikované práce jako přílohy. K věcné a obsahové stránce předkládané dizertace nemám vážné připomínky.

2. Otázky oponenta do diskuse:

2.1. Které transportéry jsou specificky cílovými geny AhR, CAR a PXR?

2.2. Dimethylformamid je v in vitro esejích poněkud neobvyklé rozpouštědlo. V kapitole 4 (Metodická část) jsem nenašel údaj, proč bylo užito (např. v kap. 4.3.5 pro rozpouštění TCDD RIF a testovaných látek).



2.3. Byla testována stabilita hladiny „house-keeping“ genu GAPDH po expozici modelovými induktory?

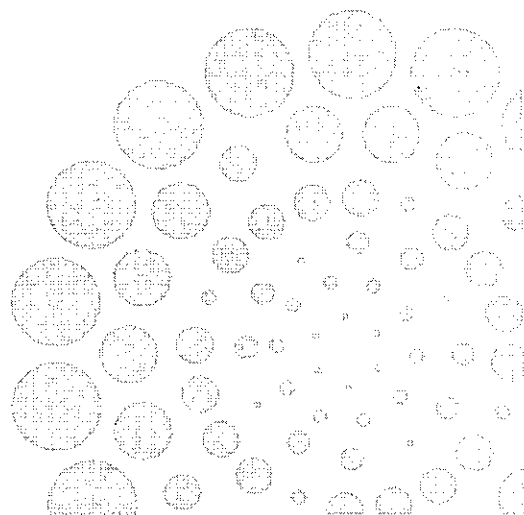
2.4. Jaká je současná znalost regulací genu SPOT14 v různých tkáních?

3. Závěr:

Celkově lze konstatovat, že Mgr. Kateřina Kubešová prokázala schopnost samostatné tvůrčí činnosti, zvládla jak teoretickou, tak i experimentální práci velmi dobře a dizertační práce vyústila do dvou kvalitních publikací v zahraničních impaktovaných časopisech (s celkovým IF = 8.4). Dizertační práci proto doporučuji přijmout a po úspěšné obhajobě udělit vědecko-akademický titul Ph.D.

RNDr. Miroslav Machala, CSc.
vedoucí odd. chemie a toxikologie
Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.
Brno

V Brně dne 25.6.2018





ÚSTAV EXPERIMENTÁLNEJ ENDOKRINOLÓGIE
"Centre of Excellence"

BMC, Slovenská akadémia vied
 Dúbravská cesta 9, 845 05 Bratislava



OPONENTSKÝ POSUDOK

doktorandskej dizertačnej práce **Mgr. Kateřina Kubešová, DiS.** na tému:

***IN VITRO* BIOLOGICAL ACTIVITY OF SELECTED COMPLEXES OF TRANSITION**

(**školiteľ**: Prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc. et Ph.D.)

V predloženej dizertačnej práci autorka prezentuje originálne výsledky, týkajúce sa štúdiu mechanizmu účinku a farmakologickej účinnosti vybraných koordinačných zlúčenín, komplexov medi a zlata, ktoré obsahujú vo svojej štruktúre chinolinón, N-donorové heterocyklické ligandy, resp. trifenylfosfín a deprotonovanú formu O-substituovaných derivátov 9-deazahypoxantínu. Rozbor o súčasnom stave problematiky, týkajúcej sa izoenzýmov cytochrómu P450, nukleárných receptorov, prechodných (tranzitných kovov) a koordinačných zlúčenín svedčí o dobrej orientácii autorky dizertácie v uvedenej problematike ako aj o vynikajúcom vedomostnom a experimentálnom zázemí pracoviska, na ktorom bola dizertačná práca vypracovaná. Základnými cieľmi dizertačnej práce, opierajúcej sa experimentálnu prácu, bol výskum účinkov vybraných komplexov medi (II) a zlata (I) na signálne dráhy xenoreceptorov a vybraných nukleárných receptorov hormónov.

Aktuálnosť zvolenej témy:

Aktuálnosť zvolenej témy je nesporná, nakoľko výsledky uvedené v dizertácii menovanej majú svoje „novum“ a nepopierateľný význam pre toxikológiu, o čom svedčia i publikované práce autorky spolu s kolektívom spolupracovníkov ako aj ich možné perspektívne uplatnenie v klinickej praxi. Tieto fakty výrazne zdôrazňujú vysokú aktuálnosť riešenia zvolenej témy.

Plnenie cieľov dizertácie:

Široký metodický potenciál, pomocou ktorého autorka dizertácie študovala biologickú aktivitu vybraných koordinačných zlúčenín (*in vitro*) naznačuje na cieľavedomosť autorky dizertácie, dobrú odbornú prípravu ale aj manuálnu zručnosť v laboratóriu. Napriek náročnosti cieľov, významný počet získaných pôvodných výsledkov naznačuje, že ciele dizertácie boli splnené v plnom rozsahu definovanom v predkladanej práci.

Zvolené metódy výskumu:

V práci bola použitá široká paleta moderných sofistikovaných metodických prístupov, kde dominujú metódy molekulárnej a bunkovej biológie („Reporter gene assay“, reverzná transkripcia s následnou polymerázovou reťazovou reakciou, detekcia proteínov metódou „Western blotting“, „Electromobility shift assay – EMSA“, t.j. väzobné štúdie aryl-uhl'ovodíkového receptora (AhR) na špecifický úsek – responzívny element na molekule DNA), atď., t.j. metódy, ktoré nevyhnutne vyžadujú množstvo kvalitných chemikálií, kultivačných médií, špecifických línii nádorových buniek, komponentov reakcií ako aj kvalitné a finančne náročné prístrojové zázemie.

Výsledky dizertačnej práce:

Významnými prínosmi dizertácie je rad pôvodných výsledkov, ktoré autorka dizertácie experimentálnou prácou s využitím sofistikovaných metodických prístupov získala. Výsledky jednoznačne ukázali, že 1) Koordinačné zlúčeniny obsahujúce v molekule dvojmocnú meď v ľudských hepatocytoch ako aj v nádorových bunkových líniiach aktivujú AhR a zároveň indukujú gény závislé od AhR; 2) Komplexy zlúčenín obsahujúce jednomocné zlato sú schopné aktivovať AhR ale aj nukleárny receptor PXR a zároveň aj indukovať cieľové gény AhR a PXR; 3) Komplexné zlúčeniny obsahujúce jednomocné zlato vykazujú anti-androgénové ako aj anti-glukokortikoidné účinky.

Prínos pre ďalší rozvoj vedy:

Predložená dizertačná práca predstavuje významný prínos pre rozvoj poznania mechanizmu účinku a farmakologickej účinnosti vybraných koordinačných zlúčenín, komplexov medi a zlata. Získané pôvodné výsledky môžu nájsť podstatnú využiteľnosť vo viacerých vedných odboroch, najmä v ľudskej fyziológii a patofyziológii. Výsledkom práce a prínosom pre ďalší rozvoj vedy sú prezentované **tri karentované publikácie, z toho dve prvoautorské** v renomovaných zahraničných časopisoch s výrazným impakt faktorom (najvyšší je 4,519, druhý najvyšší je 3,858 a tretí je 3,581). Ďalej menovaná bola **ako prvá autorka troch zo štyroch prezentácií** na zahraničných vedeckých podujatiach.

Poznámky a pripomienky:

K vykonaniu experimentálnej práce, t.j. k výberu jednotlivých metodík, uskutočneniu analýz, k forme vyhodnotenia a spracovania výsledkov nemám principiálne pripomienky.

- Autorka dizertácie v teoretickej časti na str. 38 podrobne vymenúva nukleárne receptory podrodiny 1. Do tejto skupiny však patrí aj "farnesoid X" receptor (FXR), ktorý taktiež heterodimerizuje s nukleárnym receptorom typu RXR. Na druhej strane, receptor typu AhR (str. 40) nepatrí do klasickej rodiny nukleárných receptorov, je však členom rodiny transkripčných faktorov typu "basic helix-loop-helix".
- Vo výsledkovej časti dizertácie (str. 52), kde sa popisujú komplexné zlúčeniny (1-4) s dvojmocným atómom medi by bolo vhodné poukázať na príslušné číslo obrázku, kde sa štruktúry týchto látok nachádzajú. Rovnaká pripomienka platí aj pre komplexné zlúčeniny zlata (str. 64). Naviac, na str. 64 v prvom odstavci, obr. 7 nekorešponduje s textom prvej vety, ktorá uvádza daný obrázok.

- Ako si autorka dizertácie vysvetľuje výrazne silný antagonistický účinok komplexnej zlúčeniny jednomocného zlata, označenej ako "1" ($3,5,3'\text{-T}_3 + \text{"1"}$) v porovnaní so zlúčeninami označenými ako "2" a "3", ktoré síce tiež vykazujú značný antagonistický účinok, avšak nie až tak výrazný ako komplexná zlúčenina označená ako "1" ?
- V diskusnej časti dizertácie tiež chýba prípadný odkaz na príslušné obrázky dokumentujúce chemické štruktúry študovaných a analyzovaných komplexných zlúčenín na príslušné obrázky. Rovnako by bolo vhodné diskutovať vo väčšom meradle prínos pre danú vednú oblasť, ktorý vychádza z pôvodných výsledkov uvedených v dizertácii ako aj v publikáciách v renomovaných odborných časopisoch.
- V časti popisujúcej použitú príslušnú literatúru sa hneď v prvom riadku objavil produkt "tlačiarenskeho škriatka", ako sa v terminológii minulého storočia takejto chybe hovorilo, čo samozrejme neznižuje kvalitu predloženej dizertačnej práce.

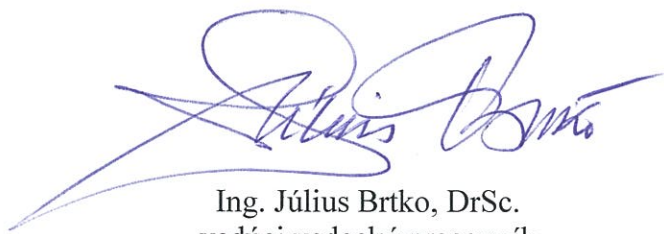
Záver:

Predložená práca predstavuje pôvodné prínosné vedecké dielo, ktoré bolo precízne vypracované a je významné pre rozvoj poznania v oblasti biologických vlastností vybraných typov koordinačných zlúčenín. Predložená dizertačná práca Mgr. Kateřiny Kubešovej, DiS spĺňa všetky náležitosti práce typu „Ph.D. thesis“. Z týchto dôvodov

n a v r h u j e m ,

aby po úspešnej obhajobe doktorandskej dizertačnej práce bola **Mgr. Kateřine Kubešovej, DiS** udelená hodnosť **Ph.D.** v odbore P1527 **Biológia**

V Bratislave, 31.05.2018



Ing. Július Brtko, DrSc.
vedúci vedecký pracovník