

Oponentský posudok

na habilitačnú prácu MVDr. Martiny Zigovej, PhD. na tému:
„Antineoplastický potenciál indolových fytoalexínov a ich syntetických derivátov“

Predložená habilitačná práca predstavuje ucelený vedecky spis, ktorý je zameraný na štúdium antiproliferačného účinku indolových fytoalexínov a ich derivátov na ľudských nádorových bunkových líniách s cieľom identifikovať účinných kandidátov pre ďalší výskum. Zameranie spisu je mimoriadne aktuálne, rieši naliehavý problém v humánnej i vo veterinárnej medicíne. Nádorové ochorenia patria medzi veľmi závažné ochorenia, ich liečba obyčajne zahŕňa kombináciu invazívneho chirurgického liečenia, chemoterapie a rádioterapie. V ostatnom období z tohto pohľadu na význame získavajú prírodné látky rôznych chemických skupín, ktoré je možné vzhľadom na ich účinok využiť v podpornej terapii ľudských nádorových ochorení. Získané poznatky a výsledky experimentálnych prác habilitantky, ktoré sú zahrnuté v habilitačnom spise, sú vedecky hodnotné a motivujúce pre ďalšie smerovanie výskumu vo vednom odbore farmakológia pri hľadaní nových prírodných alebo syntetických liečiv proti rakovine.

Habilitačný spis je pomerne rozsiahly, má 137 strán. Pozostáva z úvodnej časti – literárneho prehľadu (22 strán), kolekcie habilitantkou publikovaných prác v popredných vedeckých časopisoch s vysokým impaktom a zo záverečného hodnotenia získaných výsledkov prezentovaných prác s príslušnou komparáciou so svetovou vedeckou literatúrou.

V úvodnej časti spisu sa habilitantka zaoberá významom kapustovitých rastlín, ako zdroja indolových fytoalexínov, pri prevencii resp. terapii nádorových ochorení. Ďalej popisuje podrobne indolové fytoalexíny, i ich pôvod a štruktúru, ako aj ich široké spektrum farmakologických účinkov, napríklad antibakteriálny protiplesňový, antiobezitný, protizápalový, antimelanogénny, antisklerotický a protinádorový účinok. Najviac farmaceuticky preskúmané zo všetkých indolových fytoalexínov sú brasinín a kamalexín. Ďalej popisuje konkrétne farmaceutické účinky fytoalexínov na ľudské zdravie, potenciálny priaznivý ako aj negatívny účinok brasinínu a kamalexínu, ako aj iných fytoalexínov na ľudský organizmus. V ďalších kapitolách habilitantka podrobne rozoberá mechanizmus protinádorového účinku brasinínu na molekulovej úrovni. Popisuje ho ako perspektívne protinádorové liečivo indukujúce 3 rôzne formy bunkovej smrti – apoptózu, autofágiu a paraptózu v nádorových bunkách prostredníctvom aktivácie signálnych dráh. V ďalšej kapitole habilitantka podobne podrobne popisuje i mechanizmus protinádorového účinku kamalexínu. Nosnou a veľmi významnou je kapitola, ktorá popisuje antiproliferačné účinky syntetických derivátov indolových fytoalexínov. V tejto kapitole habilitantka jadrne zhrnula doterajšie vedecké poznatky o farmakologických protinádorových účinkoch syntetických fytoalexínov s popisom ich mechanizmu účinku v nádorových bunkách Na molekulovej úrovni. K tejto časti habilitačného spisu nemám pripomienky.

Ciele habilitačnej práce uvedené na strane 34 sú opísané jasne a konkrétne. Sú v súlade s predloženými ďalšími vedeckými prácami.

V kapitole 3 „Vybrané práce“ sú prezentované vybrané kópie vedeckých článkov, ktorých spoločnou témou je potenciálny protinádorový účinok indolových fytoalexínov. Vedecké články prešli náročným recenzným konaním redakciami príslušných vedeckých časopisov. Z uvedeného vyplýva, že ja, ako oponent, mám uľahčenú prácu tým, že výsledky obsiahnuté v publikovaných prácach prešli prísnyim vedeckým a metodickým hodnotením redakciami príslušných vedeckých časopisov. Preto som sa ako oponent sústredil na obsahovú stránku habilitačného spisu.

Prvá priložená práca (review) sa zaoberá kľúčovými vlastnosťami indolových fytoalexínov a je zameraná najmä na ich antiproliferačnú aktivitu. Záverom tejto práce autori konštatujú, že jednou z ciest hľadania nových účinných fytochemikálií na báze indolových fytoalexínov je ich syntetická úprava. Tieto látky vďaka svojej jednoduchšej štruktúre a antiproliferačnej aktivite sa javia ako potenciálne účinné prírodné liečivá s protinádorovým účinkom.

V druhej predloženej kópii vedeckej práce cieľom bolo preskúmať antiproliferačnú aktivitu brasinínu a jeho derivátov na ľudskej rakovinovej bunkovej línii. Bolo zistené, že spomedzi dvadsaťjeden testovaných zlúčenín vykazoval 1-metoxybrassinín najsilnejšiu antiproliferačnú aktivitu v bunkách Caco-2 s IC_{50} 8,2 ($\pm 1,2$) $\mu\text{mol l}^{-1}$. Prietoková cytometrická analýza odhalila 1-metoxybrassinínom indukované zvýšenie obsahu sub-G1 frakcie DNA, ktorá sa považuje za marker apoptickej bunkovej smrti. Apoptóza sa potvrdila aj testom fragmentácie DNA. Okrem toho kvantitatívna PCR v reálnom čase ukázala, že 1-metoxybrassinín zvýšil expresiu proapoptického Bax a znížil expresiu anti-apoptických génov Bcl-2 a Bcl-xL, zvýšil aktivitu kaspázy-3, -7, štiepeného PARP a znížil obsah intracelulárneho GSH.

Cieľom tretej predloženej práce bolo preskúmanie antiproliferačného účinku brasinínu a jeho derivátov v podmienkach *in vitro* na ľudských rakovinových bunkových líniiach. Spomedzi siedmich testovaných zlúčenín, homobrasinín (K1; N-[2-(indol-3-yl)etyl]-S-metylditiokarbamát) vykazoval najsilnejší účinok. Prietoková cytometrická analýza odhalila zvýšenie G2/M vyvolané K1 fázy spojené s dysreguláciou expresie α -tubulínu, α 1-tubulínu a β 5-tubulínu. Autori naznačujú, že inhibičný účinok K1 môže byť sprostredkovaný prostredníctvom inhibície tvorby mikrotubulov. Okrem toho K1 súčasne so zastavením G2/M zvýšil aj populáciu buniek s obsahom DNA pod G1, čo sa považuje za marker apoptickej bunkovej smrti aktiváciou kaspázy-3, ako aj produkciou vnútrobunkových reaktívnych foriem kyslíka (ROS).

V štvrtej predloženej kópii vedeckej práce autori prezentovali sériu nových biologicky aktívnych trifluórmetyl obsahujúcich indolových derivátov. Cieľové 2'-aminoanalógy a 2,2'-diaminoanalógy metyléteru 1-metoxyspirobrassinolu nesúceho (4-trifluórmetylfenylamino) alebo 3,5-bis(trifluórmetyl)fenylamino- fragment boli pripravené metodikou spirocyklácie. Novosyntetizované indolové analógy vykazujú vyššiu účinnosť antiproliferačného účinku voči ôsmim ľudským leukemickým a solídnym nádorovým bunkovým líniiam ako ich rodičovský prírodný fytoalexín. Najsilnejšími antiproliferačnými látkami boli 2,2'-diaminoanalógy disponujúce dvoma 3,5-bis(trifluórmetyl)fenylamínovými skupinami, ktoré vykazovali vyššiu účinnosť ako cisplatina proti sledovaným nádorovým bunkovým líniiam, ale zároveň nižšiu cytotoxicitu ako cisplatina na nemalígnych myších fibroblastoch NIH 3T3.

V piatej predloženej štúdií sa skúma potenciálna terapeutická účinnosť 1-metoxizobrassinínu (MB-591), derivátu indolových fytoalexínov, ktoré sa nachádzajú v rastlinách čeľade Cruciferae na bunky rakoviny vaječníkov citlivé na cisplatinu (A2780) aj rezistentné na cisplatinu (A2780 cis). Zistenia ukazujú, že MB-591 vykazuje antiproliferačný účinok na obidve bunkové línie s výrazne zvýšenou účinnosťou voči bunkám citlivým na cisplatinu. Látka vyvoláva zmeny v distribúcii bunkového cyklu, najmä vo fázach S a G2/M, sprevádzané zmenami v kľúčových regulačných proteínoch. Okrem toho MB-591 spúšťa apoptózu v oboch bunkových líniiach, ktorá zahŕňa štiepenie kaspázy-9, indukciu štiepenia PARP a poškodenie DNA sprevádzané tvorbou reaktívnych foriem kyslíka (ROS) a mitochondriálnou dysfunkciou. Látka selektívne indukuje autofágiu v bunkách rezistentných na cisplatinu. Štúdiá ďalej skúma vzájomné pôsobenie MB-591 a antioxidantu N-acetylcysteínu (NAC) pri modulácii bunkových procesov. NAC vykazuje ochranný účinok proti cytotoxicite vyvolanej MB-591, pričom ovplyvňuje distribúciu bunkového cyklu a proteíny súvisiace s apoptózou. Okrem toho NAC vykazuje inhibičný účinok na iniciáciu autofágie v

bunkách rezistentných na cisplatinu, čo naznačuje jeho potenciálnu úlohu pri prekonávaní mechanizmov rezistencie.

Všetky hore uvedené zistenia v predložených článkoch sú podrobne zanalyzované a prediskutované v kapitole 4. Táto kapitola je najpodstatnejšou kapitolou habilitačného spisu. K tejto kapitole nemám žiadne pripomienky.

Prínosy pre ďalší rozvoj vedy a prax spočívajú v získaných poznatkoch, ktoré sú originálne, veľmi cenne pre rozvoj základného, ako aj aplikovaného výskumu v prezentovanom vednom odbore. Prínosy sú v podstate prezentované v záveroch kapitoly 4.

Po formálnej stránke nemám k habilitačnej práci žiadne pripomienky resp. výhrady. Mám na habilitantku nasledovne otázky:

1. Prosím aby habilitantka pri obhajobe prezentovala svoje stanovisko k ďalšiemu rozvoju vednej disciplíny z aspektu pedagogickej práce, ako aj z pohľadu výskumných aktivít.
2. Aký má názor habilitantka na reálne použitie derivátov indolových fytoalexínov v klinickej praxi?
3. Ktorú biochemickú cestu, resp. kombináciu biochemických ciest považuje habilitantka za najúčinnejšiu pre inhibíciu rastu nádorových buniek *in vitro* derivátmi indolových fytoalexínov?

Celkove zhodnotenie a záver

Habilitantka je skúsenou, odborne zdatnou vysokoškolskou pedagogičkou, ktorá dosahuje veľmi dobré edukačné výsledky. Je autorku alebo spoluautorkou 24 prác evidovaných v CC a má 377 SCI citácií. Jej habilitačná práca na tému: „Antineoplastický potenciál indolových fytoalexínov a ich syntetických derivátov“ predstavuje hodnotný vedecký spis a je prínosom pre rozvoj vedného odboru „farmakológia“.

Záverom môžem konštatovať, že predložená habilitačná práca spĺňa všetky podmienky kladené na tento druh vedeckých prác. Odporúčam príslušnej habilitačnej komisii ju prijať ako podkladový materiál pre habilitačné konanie a po jej úspešnom obhájení odporúčam MVDr. Martine Zigovej, PhD. udeliť vedecko-pedagogický titul:

„docent“

v odbore habilitačného a inauguračného konania: farmakológia.

V Košiciach 11. novembra 2024

prof. MVDr. Jaroslav Legáth, CSc.
Katedra farmakológie a toxikológie
Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach
Komenského 73, 04181 Košice