

Oponentský posudok

na habilitačnú prácu PharmDr. Radky Michalkovej, PhD. na tému:

„Farmakologická modulácia bunkovej smrti, signalizácie a regulačných mechanizmov nádorových buniek derivátmi prírodných látok“

Predložená habilitačná práca predstavuje ucelený vedecký spis, ktorý je zameraný na štúdium mechanizmu účinku, resp. komplexných mechanizmov regulácie apoptózy nádorových buniek syntetickými derivátmi chalkónov, akridín-chalkónovými hybridmi a derivátmi indolových fytoalexínov. V práci sú popísané biochemické cesty, ktoré zasahovali do regulácie bunkového cyklu, indukcie apoptózy, redoxnej rovnováhy, autofágie, signalizačných dráh spojených s prežívaním buniek, ako aj mechanizmov mnoholiekovej rezistencie. 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 určených na terapiu nádorových ochorení.

Habilitačný spis je pomerne rozsiahly, má 299 strán. Pozostáva z úvodnej časti – literárneho prehľadu (54 strán), z cieľov habilitačnej práce (str. 55), z kolekcie prác publikovaných habilitantkou v popredných vedeckých časopisoch s vysokým impaktom a zo záverečného hodnotenia získaných výsledkov prezentovaných prác s príslušnou komparáciou so svetovou vedeckou literatúrou v kapitole „Záver a význam pre prax“. K publikovaným prácam nemám z dôvodu ich posúdenia redakčnými radami časopisov pripomienky.

V úvodnej časti spisu sa habilitantka opisuje súčasný stav poznatkov regulovanej bunkovej smrti aj jej využitia pri terapii nádorových ochorení. Deregulácia bunkovej smrti je v súčasnosti považovaná za 1 zásadných znakov karcinogenézy a predstavuje kľúčovú úlohu pri rozvoji nádorových ochorení a ich metastatického potenciálu. Tradičný prístup k onkologickej liečbe sa dlhodobo popieral najmä o indukciu apoptózy ako hlavného mechanizmu eradikácie nádorových buniek, čo viedlo k apoptickej rezistencii celého radu nádorov. Z toho dôvodu vedecká komunita prejavila záujem o prírodné látky a ich deriváty ktoré dokázali cielene ovplyvňovať viaceré regulačné uzly signalizačných dráh súvisiacich s bunkovou smrťou. Medzi štruktúrne rozmanité skupiny sekundárnych metabolitov s preukázaným protinádorovým potenciálom presahujúci rámec jednej signálnej dráhy patria chalkóny a indolové fytoalexíny, ktoré boli predmetom vedeckého bádania habilitantky.

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

V hlavnej kapitole „Súčasný stav riešenej problematiky doma a v zahraničí“ sa habilitantka zamerala na porovnanie svojich výsledkov (prezentovaných v priložených publikáciách) s najnovšími poznatkami svetového výskumu v danej oblasti.

V prvej časti sa habilitantka zamerala na podrobný opis nádorových ochorení a ich charakteristických znakov. Popisuje základné atribúty nádorových buniek, ako sú trvalá proliferácia, signalizácia, vyhýbanie sa regulovanej bunkovej smrti, neobmedzená replikácia, indukcia angiogenézy, ako aj invázia a metastázovanie. Ďalej rozoberá úlohu genómovej nestability

a schopnosť malígnej populácie adaptovať sa na selekčný tlak mikroprostredia a terapie. Tak tiež reflektuje moderný pohľad na interakciu nádorových buniek s imunitným systémom.

V druhej časti je podrobne popísaná apoptóza nádorových buniek sprostredkovaná chalkónmi a indolovými fytoalexínmi. Ide o mimoriadne zložitý proces zasahujúci kľúčové uzly regulovanej bunkovej smrti na úrovni mitochondriálnej, receptorom sprostredkovanej a stresom endoplazmatického retikula podmienenej dráhy. Na úrovni vnútornej (mitochondriálne sprostredkovanej) dráhy apoptózy sa chalkóny javia ako jeden z primárnych spúšťačov oxidatívneho stresu, ktorý vedie k narušeniu mitochondriálnej funkcie. Pri viacerých chalkónových derivátoch, vrátane nových syntetických molekúl testovaných na nádorových bunkách pečene, hrubého čreva a prsníka, bola táto sekvencia udalostí experimentálne potvrdená a prezentovaná v prácach habilitantky (Michalková a kol., 2022).

Podobne aj indolové fytoalexíny predstavujú z hľadiska mechanizmu účinku triedu prírodných zlúčenín, pri ktorých je dominantne popisovaná mitochondriálne sprostredkovaná kaspázovo závislá apoptóza. Indolové fytoalexíny a ich analógy často generujú ROS, modulujú pomer Bcl-2/Bax a sú schopné spúšťať mitochondriálnu apoptózu vo viacerých nádorových modeloch, vrátane kolorektálneho, hepatálneho a prsníkového karcinómu. Pleiotropný charakter týchto prírodných zlúčenín umožňuje zasiahnuť tieto jednotlivé dráhy apoptózy a znížiť prah potrebný na spustenie bunkovej smrti (Michalková a kol., 2023).

Tretia kapitola je venovaná konkrétne blokáde bunkového cyklu indukovanej syntetickými chalkónmi a indolovými derivátmi. Mechanizmus účinku syntetického indolového chalkónu bol študovaný na modeli karcinómu prsníka. Habilitantka vo svojej práci prezentovala, že expozícia buniek MCF-7 a MDA-MB-231 vedie k výraznej redistribúcii bunkovej populácie v rámci bunkového cyklu, so signifikantnou akumuláciou v G2/M fáze sprevádzanou nárastom sub-G1 frakcie, čo odráža súbežnú aktiváciu apoptózy (Michalková a kol., 2022). Podobný mechanizmus bol pozorovaný pri akridín-chalkónových derivátoch, najmä pri zlúčenine 1C, ktorá bola detailne charakterizovaná v citlivých, ako aj rezistentných líniiach ovariálneho karcinómu. U buniek exponovaných látkou 1C bol zaznamenaný zvýšený podiel populácie v G2/M fáze, zvýšenie hladiny fosforylovaného γ -H2A.X a zníženie hladín PCNA a fosforylovaného RB. Tieto zmeny boli pravdepodobne príčinou zablokovania prechodu buniek do mitózy. Uvedený mechanizmus bol sprostredkovaný oxidačným stresom, o čom svedčí fakt, že po expozícii buniek silným antioxidantom (N-acetylcysteínom) bol tento efekt významne potlačený alebo úplne vymizol.

V štvrtej kapitole habilitantka popisuje signálne dráhy a mitochondriálno-metabolickú odpoveď modifikovanú syntetickými derivátmi prírodných látok u rakovinových buniek. Podstata signálnej regulácie karcinogenézy je postavená na niekoľkých prepojených dráhach, ktoré integrujú mitogénne signály, metabolický stav, oxidačný stres, zápalové signály a podnety z mikroprostredia, čím určujú rovnováhu medzi proliferáciou, resp. prežitím a regulovanou bunkovou smrťou. Podrobne popisuje MAPK a p38/JNK signalizáciu, t. j. dráhy aktivované pri strese a apoptóze, dráhu NF- κ B zodpovednú za prežitie, zápal a rezistenciu, ako aj postavenie dráhy JAK/STAT v karcinogenéze a význam mitochondrií ako centra pre bunkovú smrť alebo prežívanie. Nakoniec detailne rozoberá interakciu medzi prírodnými látkami a reguláciou PI3K/Akt/mTOR, ROS/MAPK a NF- κ B/STAT3 signalizácie v kontexte mitochondriálneho metabolizmu. Je tu prezentovaný prehľadný obrázok jednotlivých signálnych dráh.

V piatej kapitole je podrobne rozpísaná autofágia ako adaptačný a letálny mechanizmus v nádorových bunkách. Je to rozsiahla a podrobná kapitola. Autofágia môže pôsobiť ako prvá línia adaptácie, ktorá oddiaľuje apoptózu najmä pri krátkodobom a miernom strese. Z terapeutického hľadiska predstavuje autofágia mimoriadne atraktívny, ale aj komplexný cieľ. Inhibícia autofágie môže v mnohých prípadoch senzibilizovať nádorové bunky voči chemoterapii, rádioterapii alebo cieľeným chemickým liekom. Na druhej strane pri nádoroch s hlbokou apoptickou blokádou sa autofágia javí ako alternatívny spôsob eradikácie nádorových buniek. Autofágia nemôže byť chápaná len ako ďalší typ bunkovej smrti, ale ako dynamický regulačný mechanizmus, ktorý môže nádorovej bunke poskytovať metabolickú flexibilitu a ochranu pred stresom, alebo sa za určitých podmienok stáva efektorom bunkovej smrti.

Šiesta kapitola je venovaná oxidačnému stresu a ferroptóze. Oxidačný stres patrí medzi kľúčové faktory, ktoré zásadne ovplyvňujú osud nádorových buniek a rozhodujú o tom, či bunka prežije, alebo podľahne niektorým formám regulovanej bunkovej smrti. Nádorové bunky disponujú mimoriadne rozvinutými antioxidačnými mechanizmami a antioxidačnými enzýmami, ktoré im umožňujú nielen prežiť, ale často aj prosperovať v prostredí zvýšeného oxidačného stresu. Ovplyvnenie oxidačného stresu v nádorových bunkách je tiež jednou z ciest úspešnej nádorovej terapie. Ferroptóza predstavuje ďalšiu špecifickú formu regulovanej bunkovej smrti, ktorá je na rozdiel od apoptózy, autofágie alebo nekroptózy primárne závislá od železom riadenej degradácie bunkových membrán. Princípom je to, že dvojmocné železo môže reagovať s peroxidom vodíka za vzniku vysoko reaktívneho hydroxylového radikálu, ktorý iniciuje a zosilňuje lipidovú peroxidáciu bunkových membrán s následným poškodením membránovej integrity. Z terapeutického hľadiska predstavuje ferroptóza perspektívnu a klinicky zaujímavú alternatívu pri liečbe nádorov, ktoré vykazujú rezistenciu voči apoptóze.

Siedma kapitola je tiež rozsiahla a v princípe opisuje pyroptózu, ako aj nekroptózu ako ďalšie cesty eradikácie nádorových buniek pri zápale. Sú to zápalové formy regulovanej bunkovej smrti. Na molekulárnej úrovni je pyroptóza založená na aktivácii inflamazómov a gasdermínových pórtvorných proteínov a prebieha v dvoch fázach. Prvá fáza aktivuje receptory vrodenej imunity alebo cytokínové receptory a druhá fáza je sprostredkovaná intracelulárnymi stresormi, ako sú napríklad voľné radikály kyslíka. V nádorových bunkách môže byť pyroptóza indukovaná viacerými terapeutickými zásahmi vrátane chemoterapie, rádioterapie, resp. onkolytických vírusov. Chalkóny (napr. C10) môžu mať významnú úlohu pri aktivácii pyroptózy. Štúdie potvrdzujúce túto teóriu sú v prílohe habilitačnej práce vo forme publikácií habilitantky.

Veľmi významnou kapitolou je kapitola č. 10 – väzba nízkomolekulových látok na DNA, vzťah štruktúry a účinku (SAR) derivátov chalkónov a indolových fytoalexínov a ich súvis s reguláciou bunkovej smrti. DNA predstavuje kľúčový farmakologický cieľ viacerých protinádorových liečiv. Narušenie jej štruktúry a funkcie sa premieta do aktivácie odpovede na poškodenie, zastavenia bunkového cyklu a spustenia programovej smrti. Deriváty chalkónov a indolových fytoalexínov svojou chemickou štruktúrou môžu ovplyvňovať tento systém programovej bunkovej smrti.

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

Po formálnej stránke nemám (až na rozsah) k habilitačnej práci žiadne pripomienky, resp. výhrady. Na habilitantku mám štandardne nasledujúce 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 habilitantka názor na reálne použitie derivátov chalkónov a indolových fytoalexínov v klinickej praxi?
3. Ktorú biochemickú cestu, resp. kombináciu biochemických ciest považuje habilitantka za najúčinnějšíu pre inhibíciu rastu nádorových buniek *in vitro* derivátmi chalkónov a indolových fytoalexínov?

Celkové zhodnotenie a záver

Habilitantka je skúsenou, odborne zdatnou vysokoškolskou pedagogičkou, ktorá dosahuje veľmi dobré edukačné výsledky. Je autorkou alebo spoluautorkou 29 prác evidovaných v databázach SCOPUS a WoS a má 553 SCI citácií. Jej habilitačná práca na tému „Farmakologická modulácia bunkovej smrti, signalizácie a regulačných mechanizmov nádorových buniek derivátmi prírodných látok“ 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 prijať ju ako podkladový materiál pre habilitačné konanie a po jej úspešnom obhájení odporúčam udeliť PharmDr. Radke Michalkovej, PhD. vedecko-pedagogický titul:

„docent“

v odbore habilitačného konania a inauguračného konania farmakológia.

V Košiciach 20. apríla 2026

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