

## **Oponentský posudek na habilitační práci**

**Autor: RNDr. Katarína Bruňáková, PhD.**

**Prírodovedecká fakulta**

**Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach**

**Název práce: Biotechnologická alternatíva produkcie sekundárnych metabolitov v rodoch *Taxus* a *Hypericum***

Oponent: prof. RNDr. Ladislav Havel, CSc.

Mendelova univerzita v Brně

Ústav biologie rostlin

Zvláště v poslední době jde možné pozorovat odklon od čistě chemických léčebných prostředků. Stále se zvyšuje zájem o biologicky aktivní látky získané bezprostředně z přírodních, respektive rostlinných zdrojů, které farmakologicky jsou využitelné. Vedle toho jsou četné molekuly léčených látek tak složité, že jejich chemická syntéza je velmi nesnadná, příliš drahá nebo dosud dokonce nemožná. Zároveň jsou zdroje těchto látek omezené, zvláště když jejich zdrojem jsou planě rostoucí rostliny. Názorným příkladem je i v předložené práci uváděný paclitaxel. Ukázalo se, že tato látka má vynikající protinádorové účinky, především u nádorů mléčné žlázy, vaječníku a plic. Na jednu léčebnou kúru se však spotřebovala celá jedna rostlina, což je strom nebo keř jehličnanu druhu *Taxus brevifolia* Nutt. dosahujícího výšky až 15 m s kmenem o průměru do 50 cm. Tento druh roste ve velmi omezeném množství na západním pobřeží Severní Ameriky. Získat potřebné množství léčebně aktivní látky z přirozených zdrojů je prakticky nemožné. Chemická syntéza paclitaxelu je velmi náročná. Jestliže se však použijí jeho přirozené prekurzory je syntéza značně jednodušší a především ekonomicky zvládnutelná. Tyto prekurzory se získávají pomocí biotechnologických metod –

kultivací pletiv resp. buněk. Tento příklad zjednodušeně uvádím (v práci je vše popsáno detailně), abych ukázal, jak aktuální je téma předložené habilitační práce z praktického hlediska. Zároveň nacházejí tyto metody široké uplatnění i v oblasti teoretického výzkumu.

Po formální stránce spis skládá ze pěti úvodních stran včetně titulní strany. Dalších 73 stran je věnováno vlastnímu tématu práce. Tato část je členěna na „Úvod“, „Literární přehled“ a „Závěr“. Pokračuje 31 stran je věnováno soupisu použité literatury. Pak následuje seznam 17 příloh a dále samotné přílohy, což jsou separáty textů, z nichž je u 10 článků habilitantka první autorkou. Třináct textů představují publikace ve hodnotných vědeckých časopisech, čtyři texty jsou kapitoly z monografií, které vyšly v prestižních světových nakladatelstvích.

Kvalitě článků ve vědeckých časopisech nebo kapitol v monografiích se není v tomto posudku třeba věnovat, protože před svým publikováním prošly recenzním řízením, o jehož náročnosti není pochyb, jak každý vědecký pracovník z vlastní zkušenosti ví.

V části „Úvod“ správně zdůvodňuje proč se ve své práci dlouhodobě zabývá problematikou explantátových kultur farmaceuticky zajímavých rostlin. Potrhuje možnosti produkce látek s léčivými účinky, pomocí biotechnologických přístupů, kdy může jít o zefektivnění jejich produkce oproti klasickému pěstování nebo o umožnění jejich získávání ve větším množství v případě, kdy jsou jejich zdrojem ohrožené rostlinné druhy, příkladem je výše uvedený druh *Taxus brevifolia*. Zároveň habilitantka podtrhuje význam explantátových kultur pro výzkum vzniku a biologické aktivity těchto látek v rostlinných organismech. Dále v této kapitole zdůvodňuje proč byly jako experimentální objekty vybrány rody *Taxus* a *Hypericum*, především druhy *Hypericum perforatum* L. - řubovníka bodkovaného, třezalky tečkované – a *Taxus baccata* L. - tisu obyčejného, tisu červeného.

Následující část habilitační práce, „Literární přehled“ je rozdělena do kapitol. První z nich s názvem „Taxol® a hypericín – příběhy dvou přírodních látek s jedinečným mechanismem účinku“ ukazuje, že autorka věnuje nemalý zájem i o klinické využití farmaceuticky atraktivních látek – paclitaxelu a hypericinu, které produkují jak rody *Taxus* resp. *Hypericum*, i historii jejich medicinského využívání. Dále tato část ukazuje, že autorka pečlivě studovala i biochemii jejich syntézy i poměrně složitou taxonomii sledovaných rostlinných druhů. Konstatuje rovněž, že výskyt paclitaxelu není vázán jen na rod *Taxus*. Je produkován i jinými rostlinnými druhy i druhy hub.

Další kapitola literárního přehledu nese název „Bunkové a explantátové kultury rodů *Taxus* a *Hypericum* – modelové systémy pro genetické a metabolické štúdium“. Začátek této kapitoly opět ukazuje široký záběr vědomostí dr. Brutňákové. Svědčí o tom „Krátký pohľad do

histórie“. Tento pohled ukazuje, jakou detailní pozornost tomuto tématu věnovala. Ještě více o tom svědčí podkapitola „Morfogenetický potenciál explantátových kultur rodov *Taxus* a *Hypericum*“ Zde je detailně popsána nejdříve problematika iniciace a kultivace explantátů rodu *Taxus*. Do celkového kontextu výzkum této problematiky jsou zasazeny vlastní práce habilitantky. Jsou to z části práce z publikací, které jsou příloh (přílohy 1, 2). Jsou zde však citovány i jiné, nepřiložené, práce autorky. V další části „Regeneračný systém in vitro a somaklonálna variabilita regenerantov *H. perforatum*“. Zde je na základě komplikovaného způsobu generativního rozmnožování zdůrazněna nutnost využívání technik explantátových kultur ve šlechtění l'ubovníka – třezalky. Následuje vlastní popis regeneračního systému, který jako jeden z prvních odvodila prof. Eva Čellarová se spolupracovníky v už roce 1992. Tento popis do habilitačního spisu patří, neboť zavedení tohoto postupu bylo základem celé řady dalších prací včetně prací dr. Brutňákové, na základě kterých vznikla i předložená habilitační práce. Dále je věnována pozornost příčinám tzv. somaklonální variability, tzn. vzniku genetických změn v důsledku kultivace v různých systémech explantátových kultur. Tyto genetické změny vedou, jak je konstatováno, i ke změnám fenotypovým (příloha 3). Na druhé straně určité genotypy vykazují stabilitu (příloha 4). Zajímavé bylo zjištěné, potvrzené i v dalších pracích, že obsah hypericinu negativně koreluje s ploidií rostlin.

V následující podkapitole „Biochemický potenciál explantátových a bunkových kultur rodov *Taxus* a *Hypericum*“ jsou uvedeny výsledky získané při odvozování a kultivaci různých pletiv druhů obou rodů s ohledem na produkci paclitaxelu a jiných látek taxanové struktury u rodu *Taxus* hypericinu a pseudohypericinu a řady dalších sloučenin. U rodu *Taxus* (část „Bunkové kultúry rodu *Taxus* ako zdroj pre produkciu paclitaxelu a iných taxánov“) bylo velmi obtížné vůbec vhodně rostoucí kultury získat. To se podařilo, a tak mohly být provedeny různé analýzy včetně analýz obsahu sledovaných látek (přílohy 1, 2, 5). V další části „In vitro systémy pre produkciu hypericínov a iných fenolických látok rodu *Hypericum*“ je ukázáno, že explantátové kultury rodu *Hypericum* jsou důležitým zdrojem farmaceuticky významných látek a mohou tak nahradit klasické pěstování rostlin.

V další podkapitole „Modely pre molekulárno-genetické štúdium biosyntetických dráh taxánov a hypericínov“. Je věnována pozornost biosyntetickým drahám s pomocí metod molekulární biologie. V části „Biosyntetická dráha taxánov“ jsou uvedeny detaily týkající se tohoto tématu. Přínosem k této problematice jsou práce, na kterých se podílela habilitantka, uvedené v přílohách 6, 7 a 8.

V další části „Predpokladaná biosyntetická dráha vedúca k hypericínom“ je věnována pozornost biosyntéze hypericinu a pseudohypericinu.

Důležitou součástí klasického i biotechnologického získávání metabolitů z rostlin je uchování genetické stability zdrojového rostlinného materiálu. Vedle klasických i biotechnologických metod zde našla uplatnění kryokonzervace (kryoprezervace). Této problematice je věnována kapitola „Kryokonzervácia ako nástroj dlhodobého uchovávania genetického materiálu v rode *Hypericum*“. Přínos habilitantky v tomto směru ukazují přílohy 9, 10, 11, 12, 13, 14. Veškeré získané výsledky jsou shrnuty v příloze 12. Příloha 9 ukazuje originální invenci při objasňování viability buněčných kultur v závislosti na složení směsí látek užívaných v kryoprotektivních postupech. Technika kryokonzervace byla použita i pro uchovávání kriticky ohroženého druhu (příloha 11). Zajímavé bylo i porovnání využití této techniky u druhů s různou strategií odolání nižším teplotám (příloha 13). Podkapitola „Zmeny biochemického potenciálu rastlín rodu *Hypericum* v dôsledku stresu asociovaného s kryogénnym pôsobením“. I v tomto směru byly získány velmi zajímavé výsledky (přílohy 11, 13, 15).

Další kapitola „Modulácia sekundárneho metabolizmu v rodoch *Taxus* a *Hypericum*“ se zabývá možnostmi řízení syntézy sekundárních metabolitů zásahy do biosyntetických drah. Pozornost je věnována buněčným kulturám rodu *Taxus* (část „Stratégie zvyšovania biosyntetickej kapacity bunkových kultúr rodu *Taxus*“) i rodu *Hypericum* (část „Metabolomické štúdium a elicitácia sekundárneho metabolizmu v rode *Hypericum*“). Příspěvek dr. Bruňákové k této problematice obsahují přílohy č. 3, 4, 15, 16, 17.

Další podkapitola „Biotechnologická produkcia ako alternatívny zdroj získavania sekundárnych metabolitov v rodoch *Taxus* a *Hypericum*“ uvádí současný stav („Súčasný stav a možnosti biotechnologickej produkcie taxánov“) a perspektivy („Perspektívy biotechnologickej produkcie farmaceuticky významných metabolitov rodu *Hypericum*“) produkce žádaných látek pomocí biotechnologických metod. Z celé habilitační práce je zřejmé, že tomuto tématu nemalou měrou přispěla svojí vědeckou prací i dr. Bruňáková (přílohy 4, 11, 17). Jak autorka spisu konstatuje odhalení detailů biosyntetické Odhalenie dráhy hypericinů je je studována v současné době na úrovni metabolomu, transkriptomu aj genomu.

Kapitola „Zaver“ v kondenzované formě výsledky celé habilitační práce s uvedením četných projektů umožňujících řešení celé problematiky a spolupracujících pracovišť.

K práci mám jediný dotaz

Je finanční obrat fytoproduktů na bázi *Hypericum perforatum* zaznamenali v roce 2011 skutečně 83 bilionů amerických dolarů nebo se spíše jedná o miliardy amerických dolarů?

### **Závěr**

Předložená habilitační práce představuje výsledky téměř dvacetileté vědecké práce RNDr. Kataríny Bruňákové, PhD. v porovnání se stavem celé problematiky se světovou literaturou. O kvalitě této práce svědčí i to, že část výsledku v ní uvedených byla vyžádána do kapitol v monografiích, které vyšly v prestižních nakladatelstvích. Předložená habilitační práce je jedním z důstojných vyústění vědecké školy, kterou založila a vede prof. RNDr. Eva Čellarová, DrSc. Po stránce stylistické je práce napsána velmi čtivě, což svědčí o pedagogických schopnostech dr. Bruňákové. Konstatuji, že předložený spis splňuje všechny požadavky kladené na habilitační práce, a proto doporučuji vědecké radě Přírodovědecké fakulty Univerzity Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach

**k jeho přijetí jako práci habilitační a k jejího obhájení.**

V Brně dne 9. 8. 2021