OPONENTSKÝ POSUDEK

Oponovaná práce:	Disertační práce, Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická, Ústav chemie a technologie makromolekulárních látek, Analytická chemie
Název práce:	Analýza vlivu komplexů přechodných kovů na nádorové buněčné linie
Autor práce:	Mgr. Lucie Melounková
Školitel:	Prof. Ing. Jaromír VINKLÁREK, Dr.
Autor posudku:	doc. PharmDr. Ondřej Soukup Ph.D.
Vypracováno v:	Hradci Králové dne 8.11.2021

Dizertační práce je předkládána k obhajobě v rámci doktorského studia komentovanou formou, k níž je přiloženo 7 impaktovaných publikací, přičemž na dvou z nich je kandidátka prvním autorem. Kvalifikační práce je zaměřena na studium cytostatických a cytotoxických účinků komplexů vanadu a molybdenu jakožto potenciálních cytostatik. Kromě účinnosti je u některých nejslibnějších kandidátů stanoven mechanismus působení případně studován rozdíl v účinnosti na nádorové a nenádorové buněčné linie. Kvalifikační práce se zaměřuje na studium výhradně *in vitro* účinků těchto nově připravených komplexů, přičemž dovozuji, že tyto látky byly připraveny na pracovišti školitele kandidátky s tím, že vlastní biologická měření byly prováděny kandidátkou na pracovišti LF UK v Hradci Králové pod vedením prof. Martiny Řezáčové.

Cílem práce bylo zejména sestudovat cytotoxické účinky komplexů přechodných kovů včetně mechanismu jejich účinku, stanovit cytotoxický účinek nově připravených komplexů pomocí WST-1 testu a pomocí pokročilejších metod jako průtoková cytometrie, western blot či qRT-PCR stanovit mechanismus cytotoxicity. Nutno hned v úvodu podotknout, že všechny cíle práce byly splněny.

V teoretické části jsou podrobně shrnuty poznatky o cytotoxickém účinku a mechanizmu působení komplexů přechodných kovů. V praktické části potom byla pomocí WST-1 testu stanovena cytostatická aktivita různých strukturních typů organokovových komplexů vanadu a molybdenu. Výsledky potvrdily, že tyto komplexy jsou vhodnými adepty pro léčbu nádorového působení. Jednoznačně bylo prokázáno, že účinnost nejslibnějších sloučenin byla řádově vyšší oproti standardně využívanému léčivu *cis*-platině. Bylo mj. pozorováno, že dochází k antiproliferačnímu efektu s vyvoláním apoptického procesu doprovázeného akumulací buněk často v G1-fázi buněčného cyklu. Také, nepřekvapivě, že cytotoxický účinek je závislý na použité koncentraci a době působení komplexů. Za velmi zajímavé považuji pozorování u thiofenového komplexu molybdenu, který prokázal výrazné preferenční působení k nádorové tkáni ve srovnání s buněčnou linií odvozenou od zdravé tkáně.

Z technického hlediska je práce zpracována velmi přehledně, s minimem překlepů či jiných typografických vad. Ke každé z přiložených publikací je vždy přiřazen odpovídající komentář. Nad rámec toho je souhrnně sepsána diskuze, která však z větší části opakuje poznatky z komentáře k publikaci. Z tohoto pohledu to působí poněkud zbytečně, avšak na závadu to není a vede čtenáře k opravdové a komplexní diskuzi a závěru. Z předložených prací bych vyzdvihl prvoautorksé práce č. 3 (IF=3,3)a č. 7 (IF=3,5), kde je jednoznačně vidět, že biologických stanovení bylo provedeno výrazně více za účelem hledání mechanismu účinku. Dále bych vyzdvihl práci č. 6 ve vysokoimpaktovaném časopise Journal of Hazardous Materials (IF>10), popisující toxicitu grafenových nosičů a jejich „očištěných" derivátů.

Z výše uvedeného plyne, že posuzovaná dizertační práce je tematicky, oborově a společensky významná, dosažené výsledky řešení byly otištěny v oborově kvalitních a významných časopisech a doporučuji předloženou dizertační práci Mgr. Lucie Melounkové s k obhajobě bez výhrad

Na kandidátku mám však několik dotazů, které mi vyvstaly během čtení dizertační práce:

1) Měla kandidátka nějaký podíl na přípravě nových komplexů? Podílela se aktivně na designu nových komplexů?
2) Rozumím správně, že hlavním mechanismem účinů komplexů přechodných kovů je produkce ROS a jejich následné propagaci v buňce vedoucí k buněčné smrti. Prosím ale o vysvětlení pasáž ze strany 24: „U alkylhydrazonových derivátů komplexů Mo(IV) bylo prokázáno, že cytotoxicita je přímo úměrná dávce kovového komplexů. **Na mechanizmu působení se značně podílí chelatace s částečným kladným náboje na kovovém iontu sdíleném s atomem donoru ligandu, kde dochází k delokalizaci chelátových prstenců π-elektronem, čímž se snižuje polaritu kovového iontu. To může zvýšit lipofilitu kovového centra, která komplexům umožní účinně proniknout přes lipidovou vrstvu buněčné membrány a narušit dýchací proces v buňce“**.
3) Ve své práci pracujete s různými typy nádorových i nenádorových linií. Mohla byste prosím uvést vlastní názor nebo názor z literatury, který jak moc je tento cytotoxický účinek specifický? Myslím tím, že pokud nalezneme vysokou účinnost na např. buňky karcinomu ovaria oproti jiným nádorovým liniím, tak tato látka v praxi opravdu je na tento nádor účinná na rozdíl od jiných nádorů.
4) S tím souvisí i následující dotaz. Ve výsledku 1 uvádíte, že buňky MOLT-4 jsou vysoce citlivé. Avšak uvedené hodnoty IC_{50} jsou uvedeny 2,2μM pro linii MOLT-4 a 2,3μM pro linii HL-60. Jak moc lze takovýto účinek považovat za specifický?
5) V celé práci se často setkáváme s pojmy „viabilita“ a „proliferace“. S tím zřejmě souvisí pojmy „cytotoxický“ efekt resp. „cytostatický“ efekt. Rozumím správně, že cytostatický účinek se pojí s proliferací buněk (vždy vztaženo k neléčené kontrole) zatímco o cytotoxickém účinku mluvíme pouze v případě pozorování mrtvých buněk pomocí metylenové modři. Pokud ne, prosím o vysvětlení pojmů
6) S tím souvisí i další dotaz. Ve výsledku 3 uvádíte, že „oba testované komplexy 3b a 4b mají **cytotoxický efekt** závislý na dávce. Při pohledu na fig.5 v dané publikaci, zejména u látky 4b lze pozorovat pokles počtu viabilních buněk bez nárůstu počtu mrtvých buněk. Jedná se tedy o cytostatický nebo cytotoxický efekt?
7) Ve výsledku 5 uvádíte, že bylo zjištěno, „že komplex 6 má selektivní účinek k nádorovým buňkám, nejvíce pak k linii buněk adenokarcinomu plic A549, zatímco nenádorové buňky plicních fibroblastů MRC-5 jsou k účinku komplexu 6 méně citlivé“ Toto potvrzují i hodnoty IC_{50} pro obě linie 3,7 a 1,0 μM pro linii MRC resp. A549. Ovšem při porovnání účinku látky na obě linie ve smyslu proliferace a viability se nenádorová linie MRC-5 její jako citlivější. Máte pro to nějaké vysvětlení prosím?
8) Prosím vysvětlete větu na str. 130: „U většiny z nich dochází k cytotoxickému působení bez zástavy proliferace buněk, pravděpodobně z důvodu špatné rozpustnosti“

V Hradci Králové dne 8.11. 2021

doc. PharmDr. Ondřej Soukup Ph.D.

[redacted]

UNIVERZITA KARLOVA
Lékařská fakulta
v Hradci Králové

Posudek oponenta disertační práce

Jméno doktorandky: Mgr. Lucie Melounková

Název práce: Analýza vlivu komplexů přechodných kovů na nádorové buněčné linie

Jméno oponenta: doc. RNDr. Věra Králová, Ph.D.

Předkládaná disertační práce je věnována biologickým účinkům komplexů přechodných kovů, konkrétně cytostatickému působení nově připravených sloučenin molybdenu, vanadu a platiny. Zabývá se rovněž možností využití grafenových nanočástic jako nosičů pro transport léčiv. Studovaná problematika je vzhledem k frekvenci a závažnosti nádorových onemocnění stále velmi aktuální. Metaloterapeutika jsou již mnoho let využívána v terapii řady nádorových onemocnění, vývoj nových sloučenin má však potenciál zmírnit nežádoucí vedlejší účinky této léčby a zvýšit její účinnost.

Doktorandka se uvedené problematice věnovala již v rámci své bakalářské a diplomové práce. Předkládaná disertační práce je uspořádána jako komentovaný soubor sedmi publikací. Všechny byly publikovány v časopisech s impaktním faktorem, v rozsahu IF 2.433 – 9. 038, dvě publikace odpovídají zařazení Q1, čtyři publikace zařazení Q2. Doktorandka je první autorkou dvou prací, v ostatních případech jejich druhou autorkou. Z tohoto výčtu je zřejmé, že doktorandka více než dostatečně prokázala schopnost přispět k rozvoji vědeckého poznání v rámci studovaného tématu.

Hlavní náplní práce doktorandky bylo studium biologických účinků připravených sloučenin na preklinických modelech *in vitro*, zejména stanovení cytotoxického potenciálu těchto sloučenin a nastínění molekulárního mechanismu jejich působení. V teoretické části práce se proto autorka věnuje některým aspektům regulace buněčného cyklu, zejména úloze proteinů p53 a p21 a jejich ovlivnění buněčným stresem. Druhá část úvodu shrnuje současné znalosti o biologických a cytotoxických účincích v současnosti využívaných i nově připravovaných metaloterapeutik, poslední kapitola je pak věnována problematice grafenových nanostruktur. Z experimentální části vyplývá, že doktorandka zvládla řadu metodických přístupů, které vhodně využila k danému cíli. Práce přinesla nové poznatky o biologickém působení komplexů přechodných kovů s potenciálně cytostatickými účinky, včetně komplexu, který vykázal selektivní účinnost na nádorovou buněčnou linii ve srovnání s linií nenádorovou.

UNIVERZITA KARLOVA
Lékařská fakulta
v Hradci Králové

Po formální stránce práce svou strukturou odpovídá požadavkům na disertační práci. Úvod i diskuse jsou doložené 278 citacemi, metody jsou podrobně popsány, výsledky ve formě souboru publikací jsou vhodně komentovány. Nutno však konstatovat, že text práce zejména v teoretické části obsahuje řadu formálních i věcných nepřesností (např. v popisu úlohy onkogenů a tumor-supresorových genů, popisu role proteinových tyrozinfosfatáz, při převodu řady anglických slovních spojení do češtiny a také při použití a psaní některých odborných termínů). Dále bych v teoretické části práce uvítala pasáž věnovanou biologickému chování metaloterapeutik *in vivo*.

K práci mám následující dotazy:

1. Kultivační média představují komplexní směs mnoha organických a anorganických látek, které mohou případně reagovat s testovanými sloučeninami. Byly popsány interakce metalosloučenin se složkami kultivačního média? Mohou se případně týkat i Vámi testovaných sloučenin?

2. Nově syntetizované sloučeniny prokázaly schopnost cytotoxického působení *in vitro*. Lze nyní na základě jejich struktury a publikovaných výsledků odhadnout, jak se budou chovat v pokusném, případně lidském organismu? Budou jejich farmakokinetické vlastnosti podobné již užívaným platinovým sloučeninám?

Doporučení

Předložená disertační práce splnila plánované cíle a zvláště publikační aktivita doktorandky svědčí o její schopnosti tvořivé vědecké práce. Doporučuji proto přijmout práci jako podklad k obhajobě a na základě úspěšné obhajoby udělit Mgr. Lucii Melounkové titul Ph.D.

V Hradci Králové, 27. 10. 2021

[redacted]

doc. RNDr. Věra Králová, Ph.D.
Ústav lékařské biologie a genetiky
Univerzita Karlova
Lékařská fakulta v Hradci Králové