



BIOLOGICKÉ CENTRUM AV ČR

Branišovská 31, 370 05 České Budějovice

Doc. RNDr. František Vácha, PhD

IČ: 60077344 DIČ: CZ60077344

Tel : 387 775 533 Fax: 385 310 356

E-mail: vacha@umbr.cas.cz

Oponentský posudek disertační práce

Název práce: „**Interactions of Cyclosporin Derivates and Silymarin Flavonoids with Plasma Membrane of Rat Hepatocyte**“

Autor: **Vladimíra Moulisová**

Práce se zabývá studiem cyklosporinů, silymarinů a jejich vzájemné interakce během působení v živočišné buňce. Jedná se o aktuální téma, které bylo ve své době iniciováno spoluprací s farmaceutickou firmou. Předložený text má v dnešní době běžnou strukturu disertační práce složené z několika publikací. Celá je napsána v anglickém jazyce, bez výrazných chyb. Má 79 stran a skládá se z úvodu, kapitol obsahujících jednotlivé články a shrnutí.

V úvodu jsou popsány látky, jejichž studiem se autorka zabývala. První je popsán cyklosporin A, jeho výskyt, struktura, funkce a využití k terapeutickým účelům, ale i vedlejší účinky. Jsou zmíněny i jiné druhy cyklosporinů. Dále následují silymariny, skupina účinných látek z Ostropestřce mariánského. Je shrnuto jejich terapeutické použití i známé molekulární mechanismy jejich působení. Na závěr se autorka zmiňuje o vzájemném působení cyklosporinů a silymarinů v organismu.

Cílem práce bylo odpovědět na tři základní otázky. Jak se váže cyklosporin A a silymariny na plasmatickou membránu krysích jater a jestli se tato vazba jednotlivými látkami vzájemně ovlivňuje. Jakou roli má cyklosporin A při oxidativním poškození buněk jater a možný účinek silymarinů jako antioxidantů při jejich ochraně. Jak se vzájemně ovlivňují cyklosporin A a jeho deriváty při interakci s plasmatickou membránou.

Na každou z těchto otázek má odpovědět jedna publikace, která je součástí předložené práce. Celkem se tedy jedná o tři práce, z nichž dvě již vyšly v recenzovaných časopisech, jedna je zaslána do redakce. U všech těchto publikací je autorka na prvním místě což naznačuje jaký byl její intelektuální přínos k této práci. Lze konstatovat, že otázky kladené v cílech práce byly zodpovězeny.

Získané výsledky jsou původní, hlavní přínos vidím v alespoň částečném odhalení otázky interakce cyklosporinů a silymarinů v buňce. Z některých nedostatků v předložené disertaci usuzuji, že na ni autorka pracovala dostatečně samostatně.

Není mi jasné, proč úvod uzavírá kapitola o účinku cyklosporinu A ve vztahu k oxidativnímu poškození buněk. Nehodila by se tato kapitola spíše do části o cyklosporinech a zmínku o silybinu, jako ochraně před poškozením vložit do kapitoly o interakci cyklosporinů a silymarinů? Stejně tak nerozumím proč se vyskytuje poslední odstavec kapitoly o interakci cyklosporinů a silymarinů právě na tomto místě. Tyto mé připomínky musí být brány jako poznámky čtenáře, který není podrobně seznámen s problematikou, v úvodu hledá zdroj poučení ale občas se v něm bohužel ztrácí.

Práci hodnotím spíše jako průměrnou. Trochu mne zarazilo, že je podle mého názoru tak atraktivní téma publikováno ve spíše horších časopisech. Vzhledem k tomu, že předložená disertace splňuje zákonné podmínky pro získání titulu PhD, doporučuji tuto práci k přijetí a obhajobě.

v Českých Budějovicích dne 2. 11. 2006



F. Vácha

Otázky k předložené práci:

Jak se pomocí excitačních fluorescenčních spekter měří přítomnost LFP ve vzorku?

Jaký je mechanismus ochrany buněk silymarinem před oxidativním poškozením způsobeným přítomností cyklosporinů? Jedná se o zhášení vzniklých reaktivních kyslíkových radikálů nebo brání silymarin interakcí s cyklosporinem vzniku těchto radikálů? V prvním článku se píše o vzájemné kompetici mezi cyklosporinem a silymarinem při vazbě na plasmatickou membránu. Má toto nějaký vztah k zmiňované ochraně?

POSUDEK DOKTORSKÉ DISERTAČNÍ PRÁCE

Název práce: Interactions of Cyclosporin Derivatives and Silymarin Flavonoids with Plasma Membrane of Rat Hepatocyte

Disertantka: Mgr. Vladimíra Moulisová

Disertační práce Mgr. Vladimíry Moulisové je zaměřena na studium interakcí cyklosporinu a silymarinu na úrovni membrány potkaních hepatocytů. Cílem předkládané disertace bylo studium vazebného mechanismu cyklosporinu A a flavonoidů ostropestřce mariánského (*Silybum marianum*) na membránu hepatocytů; studium cyklosporinu A ve vztahu k oxidačnímu poškození jaterní buňky a možný protektivní účinek flavonoidů a charakterizace interakcí pěti derivátů cyklosporinu ve srovnání se značeným cyklosporinem A. Disertantka si vybrala aktuální téma, kdy studium vzájemných interakcí látek pomáhá nejen při pochopení mechanismu reakcí, ale představuje i perspektivní cestu pro přípravu nových či modifikovaných biologicky účinných látek.

Po formální stránce je disertační práce v rozsahu 79 členěna na komentář (formou úvodu, vytyčení cílů a souhrnu) ke třem původním pracím disertantky. Anglicky sepsaná práce je s minimálním počtem formálních chyb. V úvodu je nastíněn současný stav řešené problematiky, který je zpracován srozumitelným způsobem, i když mohly být použity novější publikované práce především pro silymarin. V této části se autorka dopouští některých nepřesností v terminologii. Dle mého názoru nepřesně používá termín „purified natural silymarins“ nebo „CsA-silymarins interactions“ (str. 21) vzhledem k tomu, že silymarin je směsí flavonoidů a terminologie silymarin flavonoids je přesnější. I při popisu účinku silymarinu nebo v něm obsažených flavonoidů by mělo být přesně definováno, se kterou z těchto látek byly studie prováděny – u některých citovaných prací se autorka těchto nepřesností dopouští. Ve 2. (specializované kapitole) jsou uvedeny 2 práce již uveřejněné v zahraničních časopisech a jeden rukopis odeslaný do tisku. Vzhledem k tomu, že tyto práce prošly recenzním řízením v renomovaných časopisech, je tím usnadněna práce oponenta, protože kvalita a originalita výsledků spolu s použitými metodickými přístupy již byly zhodnoceny recenzně. K těmto publikacím mám následující dotazy:

1. Práce 1. Mohou souviset rozdíly ve vytěsňování kromě vysvětlení na str. 42 také s případnou různou lipofilitou těchto derivátů?
2. Práce 2. Proč nebyly při studiu vlivu silybinu na lipidickou peroxidaci membrán srovnávány také další flavonoidy stejně jako v práci 1 ?

K rukopisu publikace odeslané do Physiological Research mám následující dotaz: V úvodní části (str. 15) disertantka píše, že by měly být deriváty cyklosporinu méně toxické - zkoušela disertantka toxicitu těchto derivátů před vlastní studií interakcí s membránami? Z čeho vycházely použité koncentrace cyklosporinů při této studii?

V závěrečné části (Summary) disertantka shrnuje výsledky svých studií v souladu s vytyčenými cíly.

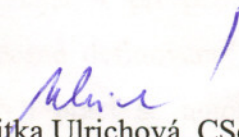
Pro lepší přehlednost práce vzhledem k citovaným publikacím se mi nejeví vhodné uvádění citované literatury ve dvou částech (za úvodem a za závěrem). Myslím si, že spojení literatury do jednoho celku by bylo přehlednější stejně jako použití seznamu zkratk, které by umožnily lepší orientaci v textu.

Všechny uvedené připomínky však nesnižují kvalitu předložené práce. Disertantka prezentací svých výsledků a jejich diskusí splnila cíle, které si formulovala pro svou disertační práci, kterou považuji za hodnotnou, hlavně z hlediska dosažených nových výsledků a návaznost na problematiku školícího pracoviště. Kvalitu uchazečky dokresluje i její publikační aktivita související s tématem disertační práce (4) a příspěvky na konferencích, které jsou uvedeny na konci disertační práce.

Závěr:

Práce splňuje základní požadavky na disertační práci a autorka prokázala schopnost samostatné vědecké práce. Proto doporučuji, aby byla přijata k obhajobě a po jejím obhájení byl ve smyslu paragrafu 47 Zákona o vysokých školách č. 111/98 Sb. udělen Mgr. Vladimíře Moulisové akademický titul Ph.D.

V Olomouci 27. října 2006


Prof. RNDr. Jitka Ulrichová, CSc.
Ústav lékařské chemie a biochemie
Lékařská fakulta UP, Olomouc

OPONENTSKÝ POSUDEK DISERTAČNÍ PRÁCE

Název disertační práce: *Interactions of Cyclosporin Derivatives and Silymarin Flavonoids with Plasma Membrane of Rat Hepatocyte*

Jméno studenta: **Mgr. Vladimíra Moulisová**

Předložená diplomová práce přináší ucelený pohled na skupinu cyklosporinových derivátů, jejich strukturu, metabolismus a širokou paletu účinků, včetně jejich nejvýznamnějšího, a to imunosupresivního účinku, kterého se využívá při posttransplantační léčbě a léčbě autoimunitních onemocnění. Hlavním úskalím použití cyklosporinu je především jeho nefrotoxický a hepatotoxický účinek, který omezuje jeho použití. Z tohoto důvodu jsou hledány látky, která by snížily tyto nežádoucí vlivy na minimum. Do skupiny těchto látek patří i „silymarinové“ flavonoidy, které jsou známy svými antioxidačními a membránově stabilizačními účinky. Přestože mechanismy interakce „silymarinových“ flavonoidů na membráně hepatocytu nejsou známy, je možné předpokládat, že budou interagovat s membránovými proteiny hepatocytu obdobně jako cyklosporiny. Z tohoto pohledu je tedy nutné prozkoumat vliv flavonoidů na interakci cyklosporinů s vazebným proteinem, což bylo i hlavním cílem této disertační práce. Dalšími cíly této práce bylo studium vlivu jednotlivých derivátů cyklosporinu na vazbu cyklosporinu A a zhodnocení role flavonoidů v protekci cyklosporinem indukované lipoperoxidace.

Předložená práce obsahuje 79 stran včetně tří publikací. Je členěná na tři části Introduction obsahující Cíle práce, Specialized Chapters obsahující zmíněné publikace a Summary. Dále obsahuje také životopis autorky. Pro lepší orientaci chybí snad jen kapitola Seznam zkratk

V úvodu autorka popisuje strukturu, metabolismus cyklosporinových derivátů a také jejich širokou paletu účinků, včetně jejich nejvýznamnějšího imunosupresivního účinku. Podrobně je zde popsána také interakce cyklosporinů s intracelulárními a membránovými proteiny, včetně P glykoproteinu a MRP2. Dále se autorka detailně zabývá protektivními účinky „silymarinových“ flavonoidů (silybinu, silydianinu a silychristinu), které byly izolovány ze semen Ostropestřce mariánského, *Silybum Marianum* (L.) a jsou jako hepatoprotektivum užívány již od středověku.

V kapitole Specialized chapters jsou tři publikace (jedna připravena k odeslání), které popisují provedené experimenty se suspenzemi hepatocytů izolovaných z potkanů a jejich výsledky.

V kapitole Summary autorka diskutuje zjištěné výsledky v kontextu se aktuální literaturou a hodnotí závěry plynoucí z výsledků jejich experimentů.

Kladně hodnotím velkou přehlednost zpracované problematiky a její šíři, která svědčí o výborném zvládnutí studované problematiky, nejen ze strany teoretické, ale i experimentální. Tato práce je přínosem pro všechna pracoviště zabývající se studiem vazebných proteinů a výsledky této práce jsou v kontextu v roce 2006 publikovaných prací zabývajících se podobnou problematikou.

Doporučuji, aby daná práce byla obhájena jako práce disertační a byla zařazena mezi 25% nejlepších studentů.

Otázky:

1. Myslíte si, že by mohly být „silymarinové“ flavonoidy vhodnou volbou proti nežádoucím účinkům při léčbě cyklosporinem *in vivo*????
2. Nebyl by ochranný efekt omezen nízkou biodostupností „silymarinových“ flavonoidů???

V Ostravě, 26.10.2006



RNDr. Zdeněk Švagera, Ph.D.

Ústav klinické biochemie

Fakultní nemocnice s poliklinikou Ostrava

17.listopadu 1790

Ostrava