

Recenze doktorské disertační práce Mgr. Rudolfa Vrabce „Alkaloidy *Vinca minor* L. a jejich biologická aktivita.“

Disertační práce Mgr. Rudolfa Vrabce je zaměřena na izolaci, identifikaci a charakterizaci složek komplexu alkaloidů *Vinca minor* L., farmakologicky významného druhu rodu *Vinca* z čeledi Apocynaceae. Disertant pracoval v měřítku, které již není zcela obvyklé – vycházel ze 60 kg drogy, což mu umožnilo získat v dostačujícím množství i minoritně zastoupené alkaloidy.

Samotný text disertace má klasické členění a rozsah 112 stran bez seznamu literatury. Text je psán příjemnou, kultivovanou češtinou, s únosným počtem překlepů, jazykových neobratností a terminologických chyb. Na tomto místě bych vytknul nesprávné české názvy živočichů, z nichž se získává acetylcholinesterasa pro testování. V textu na str. 44 a 45 je uvedeno, že jde o úhoře, české názvy příslušných rodů jsou ovšem paúhoř (*Electrophorus*) a parejnek (*Torpedo*). Několik drobných formálních připomínek uvedu ještě na zvláštním listu.

TEORETICKÁ ČÁST

(str. 14-48) podává čtivý a přehledný úvod do problematiky, proporcionálně členěný na kapitoly, jejichž náplní jsou:

1. Rod *Vinca*, taxonomické členění, charakterizace, chemotaxonomie čeledi, strukturní typy známých alkaloidů a jejich biosyntéza. Oceňuji zejména kompaktní zpracování podkapitoly **3.1.8. Obsahové látky rodu *Vinca* L.**, kde jsou na 18 stranách uvedeny základní strukturní a bibliografické údaje k více než 160 látkám.
2. Biologické aktivity indolových alkaloidů *Vinca minor* L.
3. Alzheimerova choroba, stručný přehled patofyziologie, recentní možnosti farmakoterapie, vybrané enzymy jako cílové struktury léčiv.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST,

(str. 49-68) popisuje použité materiály, isolační, separační i analytické metody v dostačující míře a bez nadbytečných detailů tam, kde bylo lze odkázat na podrobnější popisy v publikacích. Za zmínku stojí objem výchozího materiálu – 60 kg drogy – a rovněž fakt, že disertant neopomenul uvést, kdo ověřil taxonomické zařazení a kde je uložen dokladový vzorek. Ocenění si zaslouží důraz na pečlivost provedení a čistotu použitých chemikálií, jak pro izolaci alkaloidů, tak při přípravě enzymů pro testování inhibičních aktivit. Řada detailů izolačních metod je uvedena v oddílu 4.3. kdy popisy a výtěžky jednotlivých frakcí a látek izolovaných mnohastupňovými postupy zahrnujícími extrakce kapalina-kapalina, chromatografie, krystalizace, zpětné využití matečných louhů atd., doprovází popis toho, jak se k dané frakci dospělo. Užitečné jsou rovněž ilustrativní fotografie kontrolních TLC vizualizovaných Dragendorffovým činidlem a UV detekcí (str. 59-61).

V části práce věnované testování biologických aktivit se disertant zaměřil, v souladu s tradicí pracoviště, zejména na interakce s enzymy, které jsou možnými terapeutickými cíli

ve vztahu k Alzheimerově chorobě, jmenovitě acetylcholinesterasy, butyrylcholinesterasy, prolylologopeptidasy a glykogensynthasa kinasy. Pro odhad schopnosti látek překonat hematoencefalickou bariéru použil výpočtu LogBB a pro látku VR-19 i test průchodu umělou membránou (PAMPA-BBB: Parallel artificial membrane permeation assay). Látky, které se podařilo izolovat v dostatečném množství, byly testovány rovněž na cytotoxicitu vůči panelu buněčných kultur zahrnujících devět nádorových a jednu fyziologickou linii.

VÝSLEDKY

Těžiště výsledkové části (str. 69-119) spočívá ve výčtu a podrobné charakterizaci izolovaných alkaloidů. Celkem 23 látek bylo identifikováno a řádně charakterizováno metodami hmotové spektrometrie a nukleární magnetické rezonance, u většiny byla stanovena i optická otáčivost. Z toho počtu 22 bylo ztotožněno s látkami v literatuře již popsány, pro několik ale byla analytická data upřesněna a doplněna o údaje, které původní literatura postrádala. U látky s kódem VR-9 bylo zjištěno, že jde o dosud nepopsaný hydroxyderivát již známého vinkaminoreinu, tato látka byla pojmenována (+)-Vinkaminorudein. Látky, které byly dostupné v dostatečném množství, byly otestovány na inhibiční aktivity vůči cholinesterasám (hAChE, hBuChE), prolylologopeptidase, glykogensynthasa kinase a na cytotoxicitu vůči devíti nádorovým a jedné nenádorové buněčné linii. Alkaloid VR-19: **(-)-2-Ethyl-3[2-(3-ethylpiperidinyl)-ethyl]-1H-indol**, u něž byla zjištěna nejslibnější hodnota logBB a také nejvýraznější inhibiční aktivita vůči butyrylcholinesterase, byl testován na schopnost průchodu biologickými bariérami PAMPA testem a jeho interakce s butyrylcholinesterasou byla podrobena dockingové studii.

Výsledky výzkumu doktorand se spolupracovníky zpracoval do tří publikací (z toho 2x první autor), pěti přednášek na konferencích (z toho dvě on-line) a dvou posterů, což s rezervou splňuje počet požadovaný pro připuštění k obhajobě.

Do diskuse bych chtěl doktorandovi položit následující dotazy:

1. Řada ze studovaných série látek vykazuje inhibiční aktivitu vůči butyrylcholinesterase, avšak žádná z nich neinhibuje acetylcholinesterasu. Je takový jev známý i pro jiné strukturní typy inhibitorů cholinesteras? Jsou známy i inhibitory cholinesteras specifické naopak jen pro hAChE?
2. V diskusi na str. 106 uvádíte odkaz na studii Bahadori et al., Nat Prod Commun 2012, 7(6), 731-734, kteří pro celkový alkaloidový extrakt *Vinca minor* zjistili srovnatelnou inhibiční aktivitu vůči AChE i BuChE. Mohl byste to nějak komentovat s ohledem na zjištění, že Vámi testované alkaloidy *V. minor* AChE neinhibovaly?
3. Jaká farmakologická aktivita látky 19 v CNS se dá očekávat vzhledem k její specifitě vůči BuChE?

Závěr:

Disertační práce Mgr. Rudolfa Vrabce je podle mého názoru na velmi dobré odborné úrovni a její autor plně prokázal, že je schopen samostatné vědecké práce. Toto hodnocení nijak nesnižují drobné výtky formálního charakteru. Doporučuji proto, aby jeho práce byla komisí pro obhajoby přijata k obhajobě a po jejím úspěšném absolvování autorovi udělena vědecká hodnost doktor.

V Praze 12. května 2022

Prof. Dr. RNDr. Oldřich Lapčík
Ústav chemie přírodních látek
VŠCHT, Technická 5
166 28 Praha 6

Recenze doktorské disertační práce Mgr. Rudolfa Vrabce Výtky formálního charakteru a překlady

Str. 44 a 45 Česká názvy rodů *Electrophorus* a *Torpedo* jsou: paúhoř a parejnok, Nikoli úhoř, jak je nesprávně uvedeno.

Str. 15

odst. 3.1.2.: ... slohová neobratnost: mezi další významný druh rodu *Vinca* patří...
správněji např: ...dalším významným druhem rodu *Vinca* je...
(nelze patřit *mezi jeden* druh)

Str. 21

odst. 3.1.2.: ... slohová neobratnost: byl strukturně rozluštěn...

Str. 44

odst. 3.1.2.: ... slohová neobratnost (anglicismus): glutamátovém vychytávání ...
správněji: vychytávání glutamátu

		má být
Str. 19 ř. 2	vykytují	vyskytují
Str. 23 ř. 11	methylnmethylenový <u>m</u> můstek	methylnmethylenový ...
Str. 25 ř. 3	pár zástupci	několika zástupci ...

Na více místech textu je použit název enzymu *syntasa*. Dle mého názoru je tato podoba slova nesprávná. Je možné užít buď konzervativní podobu *synthasa* (v odborném textu bych ji preferoval), nebo progresivní *syntáza* (např v textech popularizačních).