



Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zdravotně sociální fakulta
Katedra radiologie a toxikologie

Matice školské 17, CZ-370 01 České Budějovice, Česká republika

doc. Dr.rer.nat. Friedo Zölzer

Oponentský posudek doktorské práce Mgr. Aleše Tichého
„Apoptóza a proliferace v nádorových buněčných liniích“

Mgr. Aleš Tichý předložil svou doktorskou disertační práci „Apoptóza a proliferace v nádorových buněčných liniích“. Téma je velice aktuální, jak dokazuje na příklad seznam použité literatury, který obsahuje hlavně práce z několika posledních let, mimo jiné četné články v předních časopisech zaměřených na molekulární biologii, jako je Nature, Science a Cell. Možná by bylo vhodnější nazvat danou problematiku „Apoptóza a její regulace na buněčné úrovni“, protože analýza proteinů účastnících se apoptózy má pro tuto disertaci ústřední význam, zatímco proliferace hraje pouze menší úlohu. Také se mi zdá jako poněkud zavádějící, mluvit o medikamentózním ovlivnění, když se popisují pouze některé účinky kofeinu a ligandu indukujícího apoptózu (TRAIL). Avšak tyto úvahy nejsou takové, aby mohly pokazit celkově pozitivní dojem z této disertace.

Práce Mgr. Tichého sestává ze 2 částí. První část, která obsahuje zhruba 86 stran, je klasickou disertací, která zahrnuje přehled současné problematiky, materiál a metody, výsledky, diskusi, souhrn a závěr. Obsahuje 25 obrázků, z nichž mnohé jsou celostránkové a sestávají z několika částí. Dále je zde 11 stran literatury. Vlastní text má tedy něco málo přes 50 stran. Druhá část obsahuje 5 příloh, kopie 3 publikovaných článků a 2 dalších přijatých do tisku, kde je Mgr. Tichý buď hlavním autorem nebo spoluautorem a všechny časopisy mají impakt faktor. Formát disertační práce je tedy poněkud nestandardní, avšak níže podepsaný oponent jej oceňuje, protože jasně ukazuje na kvalitu práce Mgr. Tichého a též na její aktuálnost.

„Předmluva“ se týká obecného významu tématu a podává přehled určitých rozdílů mezi 2 buněčnými liniemi použitými v této studii. Neobjasňuje však zcela motivaci této práce, ani nevede čtenáře ke specifickým otázkám řešeným v této disertaci. To je ponecháno na oddílu “Cíl práce”, i když zde čtenář opět nemusí mít zcela jasno v otázce, jaké specifické příspěvky může disertace přinášet, protože popsání záměrů jsou velmi široké “objasnit molekulární mechanismy, které stojí v pozadí signalizace a reparace poškození DNA ... a... následné indukce apoptotického procesu”. Pokud by se to vzalo doslova, nemohla by žádná disertace tento záměr splnit. Bylo by vhodnější buď vyjádřit záměry konkrétněji nebo použít opatrnější formulace ve smyslu “příspěvek k objasnění mechanismů”.

Mezi těmito ne zcela uspokojivými oddíly však je znamenitý “Přehled současné problematiky”, který shrnuje nedávnou literaturu věnovanou apoptóze vyvolané zářením a její molekulární regulaci stejně tak jako příbuzným aspektům proliferace a reparace DNA. Je přehledný a výstižný, aktuální a relevantní pro další kapitoly popisující práci Mgr. Tichého. Pouze část o biodozimetrii nedosahuje zcela úrovně nastavené v ostatních oddílech, protože se týká pouze omezeného souboru dřívějších studií a obsahuje několik menších nepřesností (Comptonův efekt vedoucí k ionizaci, fotoefekt vedoucí k excitaci; 0,25 Gy jako dolní mez pro dicentry; FISH jako způsob, který se má přednostně používat pro interfázové buňky).

Oddíl “Materiál a metody” obsahuje pouze 4 strany a je věnována malá pozornost podrobnějšímu výkladu (zejména odstavec o stanovení apoptózy pomocí vazby annexinu V), avšak lze jej považovat za odpovídající přehled, pokud si je čtenář vědom, že další informace obsahují přílohy.



Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zdravotně sociální fakulta
Katedra radiologie a toxikologie

Matice školské 17, CZ-370 01 České Budějovice, Česká republika

doc. Dr.rer.nat. Friedo Zölzer

Oddíly “Výsledky” a “Diskuse”, se opět vyznačují vysokou kvalitou a jasně a výstižně popisují vykonanou práci a její vztah k údajům v literatuře. To dokumentuje i skutečnost, že tato část práce Mgr. Tichého již byla publikována v prestižních časopisech. Má v této oblasti řadu příspěvků, jako je úvaha, že hlavním defektem buněk MOLT-4 může být nefunkční nbs1 genový produkt (důležitá složka MRN reparačního komplexu), nebo že p53 v buňkách MOLT-4 se fosforyluje nejen na Ser392 ale též na Ser15. Dále se popisuje časová a dávková závislost indukce řady proteinů týkajících se apoptózy, jako je kaspasa 8 and 9, Mcl.1 a Bid pro buňky MOLT-4 a HL-60, což jsou důležité příspěvky k současné znalosti regulace apoptózy vyvolané zářením. Použití různých experimentálních postupů pro vyhodnocení apoptózy a srovnání obdržných výsledků rovněž vzbudí zájem odborníků v této oblasti. Konečně možnost uvedená Mgr. Tichým, že lze využít indukci určitých signálních proteinů jako základ citlivé biodozimetrické metody je důmyslná, i když se nezabývá praktickými okolnostmi a výhodami či nevýhodami takové metody. Obecně by jeho práci značně prospělo, kdyby čtenáři přesně objasnil, proč byly určité práce prováděny, proč byly zkoumány určité parametry nebo proč byly zkoumány na jedné buněčné linii a nikoliv na druhé. Jeho analýza není povrchní, avšak pozornost věnovaná řadě detailů ztěžuje zachování přehlednosti.

Závěrem, i když zde bylo zmíněno několik kritických poznámek, je kvalita a hloubka práce Mgr. Tichého taková, že jistě splňuje veškeré požadavky a lze uvažovat, že bylo dosaženo sledovaného cíle. Mgr. Tichý se jeví jako mladý výzkumný pracovník se značnou perspektivou a jeho práci mohou bez váhání hodnotit známkou

“výborně”,

a proto doporučuji práci k obhajobě pro získání titulu Ph.D.

Rád bych Mgr. Tichému v rámci obhajoby jeho disertace položil následující otázky:

- 1) Návrh Vaší práce zmiňuje “medikamentózní ovlivnění”, zatímco alespoň v hlavní části práce odkazujete pouze na kofein, který by v koncentracích, které jste použil, nemohl být použit u pacientů. Co nám můžete říci o alternativách, možná o látkách analogických kofeinu, které by mohly nalézt klinické použití?
- 2) Ukazujete výsledky průtokové cytometrie pro HL-60, avšak nikoliv pro MOLT-4, a uvádíte, že apoptotické fragmenty by mohly být v této druhé buněčné linii rychleji degradovány. To by se mělo odrazit v kvalitě histogramů, zejména píku sub-G1. Je tomu tak? A jak je to s G2-blokem v těchto buňkách? Vůbec neexistuje nebo se objevuje později?
- 3) Ve svém “Souhrnu” ukazujete, že účinek kofeinu na G2-blok by mohl nastávat prostřednictvím ATM, p53 a p21, avšak to se nezdá každému v této oblasti zřetelné. Bylo by možné vysvětlovat výsledky odlišným způsobem?

V Českých Budějovicích, 22.5.2008

doc. Dr.rer.nat. Friedo Zölzer