



Posudek na dizertační práci Mgr. Dariny Záškové

"*Studium apoptózy u nádorových onemocnění: vztak k buněčnému cyklu a proliferaci*"

Předložená práce se zabývá sledováním vlivu kyseliny valproové na 3 vybrané nádorové linie buněk. V teoretické části autorka stručně a výstižně popisuje genetický a enzymatický aparát buňky, jejich vztah k indukci nebo blokaci buněčného dělení a reparace nebo dějů vedoucích k apoptóze buňky, indukované smrti buněk. V teoretické části jsou také podrobně charakterizovány použité hematopoetické nádorové linie. Samostatná kapitola je věnována kyselině valproové jako chemické látce s antikonvulzním a antitumorózním účinkem. Autorka zmiňuje a komentuje recentní práce, kde byl antitumorózní vliv této látky již popsán. V samostatné kapitole autorka přehledně shrnuje možnosti využití této látky v klinické praxi a její výhody oproti ostatním inhibitorům HDAC.

Následuje část experimentální s výsledky a diskuzí. O kvalitě a významnosti dosažených výsledků svědčí 6 přiložených velice hodnotných prací publikovaných převážně v zahraničních časopisech s IF. Již vzhledem k uvedenému výčtu publikací, které prošly recenzním řízením, nemám k vlastní práci podstatnější výhrady. Autorka prokázala v celé své práci schopnost dobře se orientovat v řešené problematice, úspěšně řešit dílčí kroky výzkumu a správně interpretovat dosažené výsledky. Velice oceňuji, že autorka zvládla velké množství různých technik od analytické chemie přes imunochemii, metody molekulární biologie až k práci s buněčnými kulturami a využití metody průtokové cytometrie k identifikaci významných struktur ovlivněných buněk.

Vzhledem k obsahové kvalitě vlastní práce bych měla pouze několik poznámek a doporučení.

- 1) Název práce je hodně obecný a nevystihuje přesně obsah popsaného výzkumu, kyselina valproová by se vzhledem k významu měla v názvu práce objevit.
- 2) V metodické části postrádám informace o kalibrátoru při kvantifikaci proteinů v roztoku BCA testem (str. 30); doporučuji použít termín membrána byla blokována (membránu jsme zablokovali – str. 31), chybí zmínka, zda byl u

elektroforézy použít kalibrátor molekulových hmotností pro lepší orientaci v gelu a u úlohy western blotting s imunochemickou detekcí chybí informace o specifitách použitých primárních protilátek.

- 3) Když hodnotíte změnu exprese vybraných proteinů, používáte k tomu metodu western blotting s imunochemickou detekcí, způsob hodnocení je však pouze semikvantitativní. Lze přesněji, tedy kvantitativně vyjádřit míru exprese proteinů u ovlivněných buněk, a jak by jste postupovala?
- 4) Proč jste sledovali kombinovaný účinek kyseliny valproové s kyselinou all-trans retinovou pouze u buněčné linie U-937?
- 5) Na str. 35 uvádíte, že je zásadní rozdíl v účinku kyseliny valproové na buňky linie MOLT-4 při koncentraci 2 nebo 4 mmol/l. Podobný trend zmiňujete i u buněčné linie HL-60 (str. 52). Proč jste nezvolili po tomto zjištění hustší stupnici koncentrací podobně jako např. při hodnocení EC_{50} , tj. 1-1,5-2-2,5-3-4 mmol/l? Informace „o zlomovém bodu“ by byly jistě přínosné.

Z hlediska formální správnosti bych ráda upozornila na drobné nedostatky:

- 1) doporučuji sjednotit nejen psaní enzymů, ale i dalších slov používajících koncovku *óza*, *osa* (např. str. 12 proteínasa apoptózy, kaspasy x tumorózní apod.), také doporučuji sjednotit psaní *in vivo* x *in vivo* (str. 24)
- 2) v teoretické části je velice hodnotná obrazová dokumentace, vlastní schémata, avšak ve výčtu výsledků jsou grafy, záznamy velice malé, v některých případech neostré (obr. č. 11), popisky na osách jsou téměř nečitelné (konkrétně obr. 12, 13, 14, 15, 19, 20, 21), barevné verze jsou vytištěny pouze černobíle (obr. 15), ačkoliv v úvodní části je barevný tisk použit, zbytečně to zhoršuje celkový dojem z jinak velice kvalitní práce
- 3) v textu se objevují převzaté anglické termíny downregulace (str. 52), „.....bulk transfekované...“, apod. Jaký názor má dizertantka na používání těchto anglických termínů nebo jejich doslovných překladů v českém jazyce?

Výsledky jsou diskutovány a podpořeny již známými fakty a výsledky. Jako zajímavou a velice přínosnou hodnotím kapitolu č. 7, kde jsou dosažené výsledky

přehledně shrnuty. V rámci diskuze bych ráda slyšela odpověď dizertantky na následující otázky:

- 1) V závěrečné kapitole popisujete možné mechanismy synergického účinku kyseliny valproové a ionizujícího záření na maligní buňky. Který z těchto mechanismů považujete za pravděpodobnější a jakými testy by jste tuto Vámi vybranou hypotézu ověřila?
- 2) Mají Vaše publikované články ohlas v odborné komunitě a byly již citovány?

Závěrem bych chtěla konstatovat, že předložená práce dokladuje schopnost autorky úspěšně řešit složité vědecké problémy, využívat nejmodernější metody a přístupy. Z hlediska současných aplikací buněčné biologie a vývoje medicíny je řešená problematika velice aktuální a lze s jistotou prohlásit, že tato práce určitě přispěla k rozvoji vědy a medicíny v daném oboru. Dizertantka splnila beze zbytku vytčené cíle. Uvedené skutečně drobné připomínky spíše formálního rázu nikterak nesnižují vysokou odbornou úroveň předložené práce.

Vzhledem k výše uvedenému doporučuji přijetí práce k obhajobě

V Praze dne 26. září 2008

doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.

Univerzita Pardubice, FCHT
Katedra biologických a biochemických věcí