

Oponentský posudek na doktorskou disertační práci
MUDr. Věry Králové předložené pod názvem:
„Účinky seleničitanu sodného na buňky lidského kolorektálního karcinomu s odlišným p53 genotypem“.

Předkládaná doktorská disertační práce je věnována úloze selenu a možnostem jeho využití v chemoprevenci a terapii nádorového onemocnění kolonu. I když výzkum protinádorových účinků různých forem selenu na nádorové buňky *in vitro* a *in vivo* trvá již řadu let a prací na toto téma je úctyhodná řada, stále je co zkoumat s ohledem na detailní mechanismy jeho účinků u konkrétních typů nádorů.

MUDr. Králová ve své studii poměrně komplexně popisuje účinky selenu ve formě seleničitanu sodného na nádorové buňky kolonu s ohledem na proliferaci a buněčnou smrt. Konkrétně se zaměřila zejména na úlohu genu pro nádorově supresorový protein p53 v těchto účincích. Byl k tomu vhodně využit modelový systém dvou linií odvozených z lidského adenokarcinomu kolonu HCT-116 a HCT-116 KO s chybějícím funkčním genem pro p53.

Po formální stránce práce svou strukturou odpovídá požadavkům na disertační práci. Působí uceleně, je napsána pečlivě dobrou češtinou. Úvod i Diskuse doložené 168 citacemi prokazují autorčinu znalost a dobrou orientaci v dané problematice. Metody jsou velmi podrobně popsány. Výsledky jsou dobře dokumentovány řadou obrázků a grafů se statistickým vyhodnocením.

Práce má především popisný charakter a sleduje širokou škálu parametrů vztahujících se k buněčné proliferaci a smrti a vyplynulo z ní, že p53 má pouze dílčí úlohu v účincích seleničitanu na tento typ nádorových buněk kolonu. Výsledky v souladu s vytyčenými cíli práce dobře dokumentují různé parametry srovnávající účinky koncentrační škály seleničitanu na proliferaci (metabolická aktivita, množství proteinů, syntéza DNA) a buněčnou smrt (sub G0, aktivace kaspáz) obou typů buněk. Kromě toho byly sledovány morfologické změny a buněčný cyklus. Z výsledků vyplývá, že doktorandka zvládla širokou škálu experimentálních přístupů a metod, které vhodně využila k danému cíli, včetně časosběrné videomikroskopie, průtokové cytometrie či nové metody xCELLigence pro měření tzv. buněčného indexu. Kvalitní je také dokumentace z detekce imunofluorescence.

Nutno říci, že v práci mi chybí nějaký závěr z přehledu řady poznatků z úvodu, co je a co není známo a na základě toho vytvoření hypotézy pro cíle práce. Stejně tak by usnadnilo posouzení práce, kdyby bylo v Diskusi lépe vyjádřeno a zdůrazněno to, které výsledky jsou ve srovnání s předcházejícími pracemi jiných autorů originální a přinášejí nové poznatky. Osobně z výsledků považuji za nejvýznamnější zjištění a doložení autofagické formy buněčné smrti u zkoumaného modelu. K tomu by bylo dobré ověřit, zda tento typ smrti funguje i v jiných modelech nádorových buněk kolonu, příp. jak reagují buňky odvozené z normální tkáně.

Vzhledem k tomu, že většina výsledků předkládaných v disertační práci byla publikována v recenzovaných zahraničních časopisech lze shrnout, že disertační práce MUDr. Králové splnila vytyčené cíle a přinesla některé nové poznatky o možných mechanismech působení selenu na nádorové buňky kolonu. Představuje také základ pro další rozvoj této problematiky s ohledem na detailní mechanismy působení selenu v buněčných signalizacích.

K práci mám následující poznámky a dotazy:

- Jaké jsou výhody použití selenu ve formě seleničitanu sodného ve srovnání s jinými formami?
- Vysvětlíte podrobněji možnou prooxidační versus antioxidační úlohu selenu.
- Je superoxid výhradní formou kyslíkových radikálů indukovaných selenem a jaká je úloha oxidu dusíku?
 - Z výsledků nelze rozlišit jaký typ apoptické dráhy seleničitan sodný indukuje (vnější vs. vnitřní). Vzhledem k produkci superoxidu v mitochondriích a úloze p53 v indukci apoptózy by stálo za to věnovat pozornost dějům spojeným s mitochondriemi – kaspáza-9, proteiny z rodiny Bcl-2, atd. Byly některé z nich detekovány?
 - Z čeho byla hodnocena statistika ve sloupcových grafech u výsledků z xCELLigence (3 nezávislé pokusy nebo rozptyl při měření). U křivek žádné rozptyly nejsou uvedeny.
 - Studovala autorka rozdíl v aktivaci nějakých signálních drah v souvislosti s působením seleničitanu (PI3K/Akt, JNK) nebo expresi beta-kateninu, na něž se zaměřuje pozornost výzkumu?
 - Jaké mechanismy nezávislé na p53 (Závěry bod 4) má autorka konkrétně na mysli?
 - Jaké jsou poznatky o působení seleničitanu sodného na nádory kolonu *in vivo*?

Závěr:

Disertační práce MUDr. Věry Králové splnila plánované cíle a rovněž splňuje všechny další požadavky kladené na tento typ prací. Doporučuji proto přijmout ji jako podklad k obhajobě a na základě úspěšné obhajoby udělit MUDr. Věře Králové titul doktor (Ph.D.).

V Brně dne 26. 4. 2011

Doc. RNDr. Jiřina Hofmanová, CSc.
vedoucí vědecký pracovník
Biofyzikálního ústavu AV ČR v.v.i. v Brně,
Královopolská 135

.....