

Oponentský posudek na disertační práci

MUDr. PharmDr. Kamil Rudolf:

Mechanismy indukce buněčné smrti v modelu lidského maligního melanomu in vitro.

Tématika předložené disertace zahrnuje aktuální problematiku buněčné a molekulární biologie se vztahy k onkologii s cílem přispět k poznání obecných mechanismů apoptózy po ovlivnění vybranými cytostatiky. Aktuálnost tématiky podtrhuje rozšíření a závažnost lidského maligního melanomu a současně pořád nepřekonané potíže v kurativní medicíně. Stále nejsou dostatečně známy všechny komplikované mechanismy a faktory, které jsou příčinou chemorezistence a variability apoptotického chování melanomových buněk s proto každá experimentální práce usilující nové poznatky v této oblasti je z medicínského hlediska velmi cenná.

V úvodní teoretické části práce autor prokazuje dobrý přehled o výskytu maligního melanomu v naší populaci, o klasifikaci rozmanitých forem maligních melanomů i o základních klinických přístupech v lékařské praxi. Podkapitola o biologii melanomu je zaměřena hlavně na nejznámější signální dráhy, na klasifikaci DNA topoizomeráz a jejich inhibitorů.

Cíle práce vyjmenované v 7 bodech jsou stručně a jasně formulované i dobře kontrolovatelné, jejich soubor je dostatečně rozsáhlý a konciseně zaměřený na řešení zvolené problematiky.

V metodické části práce je vyčerpávající seznam použitých reagensů s uvedením firemních zdrojů. Seznam 4 použitých lidských stabilizovaných buněčných linií a technika jejich kultivace jsou dobře popsány. Výběr celé škály testovacích postupů a kontrolních měření k ověření stanovených cílů je dostatečně široký a koncisení, zahrnuje potřebné moderní molekulárně biologické techniky a svědčí o dobře promyšlené strategii při řešení této problematiky. Rozsah 20 stran věnovaný metodickým informacím je přiměřený pro experimentální výzkum tohoto typu a je autorem efektivně využit. Některé drobné nejasnosti nebo poznámky zmíním v otázkách na konci posudku.

Z podrobného prostudování výsledků vyplývá, že všechny stanovené cíle výzkumného plánu byly splněny. Data výsledků jsou v disertaci seřazeny do 14 dílčích celků, které odpovídají jednotlivým experimentálním částím což je jistě logický způsob prezentace. Přehlednosti pro znázornění splnění vytýčených cílů by však prospělo seřazení výsledkových dat do 7 celků podle zmíněných cílů i když uznávám, že by to zabralo více místa v textu i času a úsilí při tak metodicky náročném projektu. Dokumentace grafy a Western blottingových analýz jsou perfektní jak po obsahové tak formální stránce. Význam výsledků předložené práce spočívá v rozšíření poznatků o prognostických markerech maligního melanomu. Výsledková část je v disertaci nejrozsáhlejší, zabírá 32 stran.

V diskuzi autor rozebírá vlastní získané poznatky v konfrontaci s recentními literárními údaji ze světové literatury. Věnuje se zde především mechanismům buněčné odpovědi výše zmíněných čtyř lidských melanomových linií a analýze stresových signálních drah vedoucích k navození apoptózy. Diskutuje zde taky výsledky studia účinků kaptopotecinu na tři linie

s divokou formou genu p53. Významná je také i část diskuze, která se věnuje úloze mitochondrií při iniciaci a exekuci apoptózy a analýze mechanismů cytotoxických účinků kombinace obou topoizomeráz. Celkový rozsah diskuze i její obsah je přiměřený charakteru předložené disertace.

Seznam literatury má 117 položek, jeho rozsah i obsahové spektrum svědčí o velmi dobrém přehledu autora o zpracovávané tématice. Seznam vlastních publikací má celkem 6 položek z toho jsou 2 s prvním autorstvím ve významných časopisech a jedno spoluautorství na monografii. Kromě toho jsou dokumentovány 4 prezentace na konferencích. Celkově je publikační aktivita velmi kvalitní.

K předložené disertaci mám následující připomínky a dotazy:

Podle jakých kritérií byl výběr buněčných kultur pro experimenty?

Proč je na str. 27 nahoře uvedeno „slepý“ pokus místo „kontrolní“?

Převod buněk z monolayers do suspenze byl uskutečňován trypsinizací nebo škrabkou. Jaké byly kritéria pro použití některého z těchto způsobů a jaká jsou rizika poškození buněk a následného zkreslení experimentálních výsledků?

Jak by bylo možno podrobněji popsat morfologické změny v mitochondriální síti (str. 29)?

V seznamu zkratk není uvedena polymeráza PARP.

Pro dokumentaci dynamických změn mitochondrií (obr. 5-8B) byly vybrány intervaly 0, 24, 48 hod. Při to podle grafu změny byly významné zaznamenány kolem 18. hod. a zasluhovalo by to uvést obrázek z tohoto intervalu.

Formulace „Mitochondrie se také vyznačovaly změnou dynamiky pohybu“ je zavádějící. Jaká je představa o funkci cytoskeletu v tomto případě?

Závěrem rád konstatuji, že předložená disertace je příkladem kvalitní experimentální práce v oblasti molekulární a buněčné biologie. Práce přináší nové poznatky o mechanismech buněčné odpovědi na poškození DNA cytotoxickými látkami, aktivaci specifické signální dráhy a aktivaci apoptózy melanomových buněk. Plně splňuje předpoklady pro zahájení obhajovacího řízení a doporučuji po úspěšné obhajobě udělení titulu Ph.D.

Prof. MUDr. Roman Janisch, DrSc.