

Posudek oponenta na diplomovou práci

Autor práce: Bc. Kristýna Líňová

Název práce: Kolaterální senzitivita a exprese ABCC1 transportéru u nádorových buněk

Oponent práce: Mgr. Radek Jorda, Ph.D.

Poř. číslo	Kritérium hodnocení	Body (0-5)
1	Ucelenost a aktuálnost rešeršní části práce	4
2	Kvalita úvodní části práce (množství použitých původních pramenných zdrojů, vhodnost výběru)	4
3	Naplnění cílů práce	5
4	Logika postupu při vlastní rešeršní nebo experimentální práci	4
5	Úplnost popisu používaných metodik a postupů	4
6	Úroveň zpracování výsledků (vhodné používání grafů a tabulek atd.)	4
7	Adekvátnost interpretace získaných výsledků a jejich diskuse	3
8	Výstižnost souhrnů práce v českém a anglickém jazyce	4
9	Grafická úprava textu a obrázků	4
10	Jazyková a stylistická úroveň, respektování platného názvosloví	4
11	Správnost a úplnost legend u obrázků a tabulek (srozumitelnost bez zřetele k ostatnímu textu, vysvětlení značek, jednotky uváděných veličin)	2
12	Správnost používání citačních odkazů (přítomnost necitovaných údajů, dodržování jednotného stylu citací, používání oficiálních zkratk časopisů)	4
Celkem bodů		46

max
60

Konkrétní připomínky a dotazy (možno připojit samostatný list)

Připomínky a otázky bych rozdělil do několika skupin.

Nejvíce připomínek je asi technického rázu související se zpracováním a následnou interpretací získaných dat:

1. V kapitole 3.1.1 není uvedena koncentrace penicilinu a streptomycinu.
2. V kapitole 3.1.2 jsou uvedeny dva typy silikonového oleje. Dále v experimentální části již není uvedeno, kdy se který používá.
3. Uvítal bych důkladnější výpis chemikálií v kapitole 3.1.2. Spousta chemikálií je dodávána v různé čistotě (kvalitě) z různých zdrojů, proto bych uváděl pro upřesnění i katalogová čísla. např. inhibitory fosfatas od firmy Roche. Není jasné, jestli se jedná o nějaký koktejl, nebo směs specifických činidel.

4. Kapitola 4.1 týkající se charakteristice použitých buněk patří do materiálu (kapitola 3.1.1). Nejedná se o výsledky.
5. U popisku obrázku 11 chybí číselné vyjádření statistické významnosti jako je tomu u dalších obrázků.
6. U popisku obrázku 12 je vysvětlení statistické významnosti symbolem křížku (#), který se v grafu ale nevyskytuje.
7. U popisku obrázku 19 a dále je vysvětlení statistické významnosti symbolem „nerovná se“ ($\neq$), který se v grafu ale nevyskytuje.
8. U popisku obrázku 19-23 je uvedeno, že byl studován efekt látek na viabilitu, zatímco kapitoly se věnují vlivu látek na životnost.
9. U obrázku 26 bych uvítal přizpůsobení rozsahu osy Y k prezentovaným datům, tak aby byla dostatečně čitelná. Navíc obě tabulky by měly mít stejný rozsah osy Y pro lepší vzájemné porovnání.
10. V kapitole 4.10 nesedí pořadí prezentovaných obrázků. Nejdříve je odkaz na obrázek 29 a 30 a pak na 27 a 28.
11. U popisku obrázku 32-33 není uvedena testovaná koncentrace studovaných látek ani čas působení! U prezentovaných fotek je velikost 20 μM měřítka pokaždé jiného rozsahu. Pro vzájemné porovnání morfologie jader by měly být všechny fotky stejně velké a se stejným zvětšením.

Konkrétní otázky k experimentální části a zpracování:

1. Byl v kapitole 3.2.1 použit RIPA pufr jen s inhibitory fosfatas jak uvádíte nebo i inhibitory proteas?
2. V jakém experimentálním uspořádání (destičky, panely) probíhal test v kapitole 3.2.8 (stanovení buněčné proliferace a viability)? Překvapuje mě použití vysokého množství MTT, který se přidává k 2 ml buněk. Jaký je důvod proč se daný test nedělal ve standardizovaném uspořádání v 96-jamkovém panelu?
3. Jak si vysvětlujete výsledky z WB, obrázek 10a? Proč u buněk A549 je zřetelný vysoký band proteinu ABCC1 oproti úzkému proužku (bandu) u buněk K562?
4. U popisku obrázku 11 a dále píšete o tom, že výsledky jsou průměrnými hodnotami ze 3 měření. Jedná se o trojí měření stejného vzorku na MS nebo tří nezávislých vzorků ovlivněných buněk?
5. Obrázky 15-18 ukazují WB exprese NRF2 v různých experimentech. V popiscích je uvedeno, že výsledky v grafu jsou průměrnou hodnotou ze 3 měření. Jedná se o 3 kvantifikace programem Image J nebo 3 WB? Kvantifikace obrázku 18a je nevhodná vzhledem k nekonzistenci pozadí exprese NRF2 z důvodu skládaného obrázku z vícera různých expozičních, možná i experimentů.
6. Proč je v kapitole 4.3 studován vliv verapamilu a chrysinu na intracelulární obsah GSH po 3 a 6 hodinách, když v předchozí kapitole 4.2 je studován vliv na eflux GSH po 24 h?
7. Proč byl vliv studovaných látek na proliferaci a viabilitu pomocí MTT testu stanoven zrovna po 48 hodinách. V literatuře se setkáváme většinou se sledováním účinku po 24 nebo 72, popřípadě 96 h?
8. V kapitole 4.11 je uvedeno, že bylo počítáno množství apoptotických buněk pod mikroskopem vzhledem k buňkám neapoptotickým. Jakým způsobem to bylo prováděno (okem, softwarem, absolutní počet v zorném poli)?

Další otázky k diplomové práci:

1. V teoretické části předložené práce autorka vcelku věcně vysvětluje princip kolaterální senzitivity a její vztah k expresi a roli buněčných transportérů a vztahu k regulaci oxidačně-redukční rovnováhy buňky. Tyto poznatky využívá v experimentální práci, kde

studuje vliv verapamilu a chrysinu na dvě buněčné linie lišící se expresí jednoho z transportérů. Nebylo by lepší použít buněčné linie, u kterých byla prokázána zvýšená exprese transportérů po vytvoření resistance na nějaké léčivo tak, aby se dala porovnat citlivost na studované látky u parentální linie a linie resistantní? Tyto postupy jsem našel i v citované literatuře stejně tak i alternativu, případnou transfekci parentálních buněk plasmidem pro expresi jednotlivých transportérů. Navrhovaný způsob by tak dovolil vyhodnocení parametru selektivity nebo RR (resistance ratio) vypočtený jako podíl IC_{50} parentální vůči resistantní linii (J Med Chem. 2011 Jul 28;54(14):4987-97; Biochemical Pharmacology 90, 235-245).

2. Proč bylo v této práci použito právě verapamilu a chrysinu? U verapamilu uvádíte, že je zástupcem první generace a problémem je jejich nízká specifita, poměrně nízká účinnost a toxicita v dávkách potřebných pro inhibici. Proč nebyly použity MDR modulátory třetí generace jako elacridar, laniquidar, zosuquidar a tariquidar vykazující vysokou specifitu a nízkou toxicitu?
3. U kterých látek v souvislosti s kolaterální sensitivitou byla prokázána funkce chemosenzitizéru, kdy dojde k redukci expresi P-gp a nádor se znovu stane citlivý na konvenční chemoterapeutika, jak ukazujete na obrázku 6? Je známo toto u verapamilu a chrysinu?

Závěr: práci doporučuji /nedoporučuji k obhajobě.

V Olomouci dne: 13.5.2019

Podpis: Mgr. Radek Jorda, Ph.D.

