



Oponentský posudek na bakalářskou diplomovou práci

Název práce: Buněčná fúze a kancerogeneze
Autor práce: Hana Maršíková
Oponent: RNDr. Vratislav Horák, CSc.

Předložená práce se zabývá jednou z teorií vzniku nádorů na základě buněčné fúze. Cílem práce bylo zjistit, zda samotná fúze zdravých myších buněk získaných z kostní dřeně může vést k jejich maligní transformaci. Bakalářská práce o rozsahu 43 strany má klasické členění používané pro vědecké práce. Téměř celou první polovinu práce představuje důkladný literární přehled, ve kterém jsou na základě recentních publikací představeny mutační a chromozomální hypotézy kancerogeneze. Autorka pro tuto část prostudovala rozsáhlý soubor odborné anglické literatury, která je abecedně uvedena v závěru práce. V kapitole „Materiál a metody“ jsou detailně popsány jednotlivé postupy, které byly použité pro izolaci myších buněk z kostní dřeně, pro jejich další zpracování *in vitro* a pro otestování nádorového potenciálu fúzovaných buněk *in vivo*. Následuje kapitola „Výsledky“, ve které jsou sumarizovány nálezy spojené se sledováním fúze buněk z kostní dřeně a optimalizace tohoto procesu a výsledky analyzující působení trypsinu na adhezi buněk z kostní dřeně v závislosti na přítomnosti proteinů v kultivačním médiu. Uvedené nálezy jsou vhodně dokumentované formou grafů a doplněné mikrofotografiemi z inverzního mikroskopu a z histologicky obarvených buněčných nátěrů. Krátce jsou rovněž zmíněna pozorování z *in vivo* testování fúzovaných buněk. V „Diskusi“ autorka stručně rozebírá dosažené výsledky a snaží se je začlenit do kontextu chromozomální teorie vzniku nádorů. „Závěr“ pak přehledně shrnuje v pěti bodech zásadní dosažené výsledky.

K práci mám následující dotazy a drobné připomínky:

1. Kolik samic myší C57BL/6 bylo pro izolace buněk z kostní dřeně a následné pokusy použito? Jak velká variabilita mezi jednotlivými zvířaty v získaných výsledcích byla pozorovaná?
2. Byla prováděna nějaká bližší imunocytochemická analýza kultivovaných buněk před a po fúzi, která by charakterizovala heterogenitu kultivovaných buněk, úroveň jejich diferenciaci a případně prokázala změnu v expresi proteinů ve vztahu k buněčné fúzi?
3. V práci jsou histologicky dokumentované dvou- a vícejaderné fúzované buňky. Byla provedena podrobnější karyologická analýza, která by jasně prokázala aberantní chromozomální počet v důsledku fúze buněk?
4. Byly získané nějaké důkazy o tom, že ve fúzovaných buňkách dochází rovněž k fúzi jader a že fúzované buňky vykazují zřetelnou proliferační kapacitu?
5. V práci se uvádí (str. 25), že vícejadernost po fúzi se vyskytovalo u zhruba 6% buněk. Znamená to, že v dalších *in vitro* a *in vivo* pokusech po fúzi byla použita heterogenní buněčná populace, ve které fúzované buňky představovaly pouze 6%? Jaká byla viabilita fúzovaných buněk při následné kultivaci? Nedá se vymizení shluků buněk (popisované na str.27) a neúspěch při vytvoření nádorů



- in vivo* (str. 30) vysvětlit spíše nízkou viabilitou fúzovaných buněk resp. jejich selektivní likvidací imunitním systémem po subkutánní aplikaci?
6. Jsou skutečně útvary uváděné na fotografiích na str. 28 a 29 a popisované na str. 27 buněčného původu? Jaké jsou pro to důkazy (histologické nebo imunocytochemické barvení, výsledky z elektronové mikroskopie)?
 7. V grafech prezentovaných v práci by bylo vhodné kromě průměrných hodnot vynést rovněž směrodatné odchylky, ze kterých by byla patrná variabilita získaných výsledků.
 8. Citace na str. 8, řádek 6 by měla znít „(Hanahan and Weinberg, 2000)“ místo uvedeného „(Hanahan et al., 2000)“, protože se jedná pouze o dva autory.
 9. Jak má být chápána věta na str. 13, poslední odstavec: „Kancerogeny rozumíme chemické a fyzikální látky, inhibující kancerogenezi.“?
 10. V citaci na str. 17, řádek 23 a str. 37, řádek 20 a 22 by mělo být u autora (možná českého původu) použito jeho příjmení tak, jak je uvedené v citované práci (tedy Novak místo Novák).
 11. „Cíle práce“ uvedené na str. 18 jsou tak stručně charakterizované, že chybí konec třetí věty. Jak má znít?
 12. Nadpis podkapitoly 3.2.3 na str. 20 má být „Trypsinizace“ (místo „Trypsiniace“)

Obecně by bylo možné polemizovat s celkovým zaměřením práce, protože fúzní teorie vzniku nádorů a metastáz uvažuje o fúzi buňky normální s buňkou nádorově změněnou. To zaručuje fúzované buňce zachování všech vlastností charakteristických pro nádorové buňky včetně vysoké proliferační a migrační kapacity. Při použití zdravých buněk bych nepředpokládal, že fúzované buňky tímto procesem získají potřebný nádorový potenciál vedoucí *in vivo* ke vzniku nádoru a případně ke tvorbě orgánových metastáz. To ostatně negativní výsledky předložené práce potvrzují.

Závěr:

Přes výše uvedené drobné připomínky se domnívám, že **předložená práce je velmi kvalitní a splňuje veškeré požadavky kladené na bakalářskou práci.** Autorka jasně prokázala, že je schopná zvládnout na vysoké úrovni zadanou problematiku v teoretické i praktické rovině. Osvojila si řadu laboratorních metod potřebných pro izolaci buněk z kostní dřeně, pro jejich kultivaci *in vitro* a jejich základní charakterizaci. Pomocí těchto postupů získala vlastní výsledky, které vhodným způsobem zdokumentovala a interpretovala. Proto jednoznačně **doporučuji, aby předložená bakalářská práce byla přijata k obhajobě a po jejím úspěšném obhájení byl Haně Maršíkové udělen titul „Bc.“**