

Oponentský posudek na diplomovou práci

Název práce: Toxikologický potenciál bentických nostokálních sinic

Autor: Bc. Kateřina Delawská, DiS.

Oponent: RNDr. Jan Mareš, Ph.D.

Předkládaná diplomová práce Kateřiny Delawské si kladla za cíl prozkoumat toxikologický potenciál extraktů z bentických kmenů r. *Anabaena* vůči lidským rakovinným buňkám *in vitro* a produkci nejčastějších cyanotoxinů v těchto kmenech. Dalším cílem bylo testování obvyklé metodiky při vyhledávání cytotoxických látek a její vylepšení. Práce je napsána přehledně a srozumitelně, včetně prezentace obrázků a tabulek. V textu se bohužel objevuje poměrně mnoho překlepů, gramatických a občas i stylistických chyb, což naznačuje šití finální verze textu poněkud horkou jehlou, jejich množství ale nepřekračuje únosnou míru.

Oceňuji velmi zdařilý úvod práce, který shrnuje problematiku způsobem srozumitelným i čtenáři mimo obor, a zároveň obsahuje i informace zajímavé pro specialistu. Pouze bych zredukoval poněkud obsesivní členění textu do pod-pod-pod-pod-podkapitol, díky kterému se tak například v kapitole 1.1.2.3.2.3 o curacinu A znenadání dočteme i o tolytoxinu a dalších látkách.

Metodika práce je propracovaná a adekvátní cílům práce, oceňuji, že autorka sama upozorňuje na nedostatky použitých metod a podrobně rozvádí jejich možné důsledky pro vyhodnocení naměřených dat. Celkový objem práce vykonaný diplomantkou je značný a umožňuje i opatrnou formulaci obecnějších závěrů. Výsledky práce jsou zajímavé a již po menších úpravách publikovatelné v mezinárodním vědeckém časopise. Významným výsledkem je také identifikace konkrétní bioaktivní látky ve dvou kmenech, která může být dále analyzována v navazující práci. Také kapitola Diskuze je zpracována zdařile.

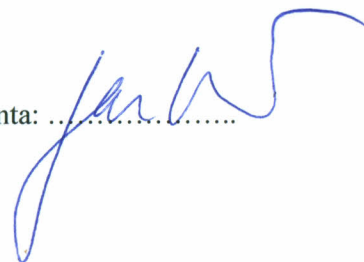
Práce splňuje požadavky kladené na diplomové práce předkládané na PŘF JU, a proto ji doporučuji k obhajobě. Práci hodnotím klasifikačním stupněm VÝBORNĚ.

Následují konkrétní otázky a komentáře:

- 1) Vzhledem k tomu, že byla práce zpracovávána na Katedře botaniky, mohla se autorka alespoň pokusit u testovaných kmenů o taxonomické zařazení do druhu na základě morfologie, i když to pro výsledky práce není příliš podstatné.
- 2) Autorka uvádí, že cyanotoxiny mají alelopatické efekty (str. 4), dále též u microcystinu na str. 8, ale neuvádí k tomu žádné citace literárních zdrojů.
- 3) Tabulka I je nekompletní, např. cylindrospermopsin produkují též rody *Microseira* a *Kamptonema*, anatoxin r. *Cuspidothrix*, atd.
- 4) Tabulka II – chybí údaje o lokalitách apod. u kmenů ze sbírky SAG, které jsou snadno dohledatelné v katalogu sbírky.
- 5) Str. 30 – autorka uvádí, že většina extraktů byla testována „mnohokrát“. Byly vždy všechny naměřené hodnoty z těchto mnoha opakování použity ve výsledných grafech?
- 6) Str. 31 – proč je za nástup morfologických efektů typu nekróza, blebbing apod. považována zrovna situace, kdy je postiženo >80% buněk? Nejsou tak zbytečně zanedbány např. efekty postihující 50-80% buněk, tedy nadpoloviční většinu?
- 7) Str. 43 – kmen SOOS B7 není v seznamu kmenů, u kterých byla provedena frakcionace extraktu. Přesto v něm byla identifikována látka zodpovědná za cytotoxicitu. Jak je to možné?
- 8) Obr. 16 B – extrakt je řazen mezi „kmene bez cytotoxické aktivity“, přestože způsobuje nekrózu ve 48 h u >80% buněk, což působí zvláště. Tento případ by mohl být rozveden také v diskuzi, kde je zcela ignorován.
- 9) Obr. 18 – Bylo by zajímavé vytvořit podobné grafy také výhradně pro mírně cytotoxické / silně cytotoxické kmene.

V Českých Budějovicích dne 13. 5. 2016

Podpis oponenta:





Oponentský posudek dizertační práce Bc. Kateřiny Delawské, DiS. - "Toxikologický potenciál bentických nostokálních sinic"

Předkládaná práce Bc. Kateřiny Delawské, DiS. se zabývá výzkumem biologicky aktivních látek produkovaných bentickými sinicemi rodu *Anabaena*, se zaměřením jak na analytickou identifikaci známých sinicových toxinů v biomase laboratorně kultivovaných kmenů, tak na hodnocení účinků jejich extraktů na lidské nádorové buňky *in vitro*.

Diplomová práce je vypracována na 62 + 3 stranách. Úvodní teoretická část je výborně a srozumitelně zpracovaná po obsahové i stylistické stránce. Úvod práce přináší syntézu aktuálních informací z renomovaných pramenů a poskytuje nejen informace relevantní pro experimentální část práce, ale zároveň a poskytuje velmi čtivý a hodnotný vhled do problematiky bioaktivních sinicových metabolitů (nejvýznamnější sinicové toxiny dále cytotoxické látky s farmakologicky zajímavým potenciálem).

V rámci experimentální část realizovala autorka skutečně rozsáhlé množství práce s použitím širokého spektra metod, zahrnujících kultivaci téměř 40 kmenů *Anabaena*, přípravu extraktů pro *in vitro* experimenty, vlastní *in vitro* experimenty s buněčnou linií HeLa, analytické stanovení cyanotoxinů, HPLC frakcionace extraktů a hodnocení jejich biologické aktivity. Použité metody jsou velmi dobře a srozumitelně popsány (drobné připomínky viz níže).

Rovněž získané výsledky jsou srozumitelně prezentovány. Diskuze výsledků je na velmi dobré úrovni, autorka dobře komentuje a diskutuje pozorované rozdíly a trendy, popisuje i možné limitace použitých metod a jejich vliv na interpretaci výsledků, včetně navržení alternativních postupů.

Jednotlivé části textu na sebe účelně a logicky navazují a výsledky jsou v závěru dobře syntetizovány a shrnuty, v práci se vyskytuje jen minimum chyb a překlepů.

Drobné poznámky a dotazy uvedené níže jsou míněny pouze pro obecnou informaci studentky k dalšímu zkvalitnění její práce (předpokládám diskuzi k některým bodům v průběhu obhajoby):

- Na straně 14 autorka zmiňuje inhibici „vodivých spojů (gap junction) mezi buňkami“ jako příklad mechanismu cytotoxického účinku. Inhibice mezibuněčné komunikace mezerovými spoji však v mnoha případech nesouvisí s cytotoxickými účinky (ve smyslu indukce buněčné smrti nebo inhibice proliferace), naopak bývá spojována s inhibicí buněčné diferenciaci či zvýšením proliferace.
- V kapitole Metodika je na str. 22 uvedeno použití kolony typu „C8 Oasis HLB“. C8 je označení pro reverzně fázové sorbenty na bázi oktyl-modifikovaného silikagelu, zatímco Oasis HLB je kopolymerní sorbent poly(divinylbenzen-N-vinylpyrrolidon). O jaký typ kolony se tedy jedná, případně jaká byla velikost kolony?
- V kapitole Metodika postrádám na str. 25 informace o přesném složení a koncentraci jednotlivých komponent kultivačního média (finální koncentrace L-glutaminu, FBS, druh a koncentrace antibiotik). Uvedeny jsou pouze přidávané objemy, nikoli však koncentrace zásobních roztoků nebo finálního koncentrace těchto komponent v médiu.
- V kapitole Metodika na str. 25 autorka zmiňuje nutnost přidavku L-glutaminu do kultivačního média RPMI z důvodu jeho „nezbytnosti pro syntézu proteinů“. Proč je z celkem 20 proteinogenních aminokyselin do média přidáván právě L-Glutamin?



- Ačkoli rozumím snaze vyhnout se opakovanému uvádění relativně komplikované vysvětlující legendy pro výsledkové grafy, považuji její vyčlenění do Obr. 8 a její absenci v Obr.9-16 za poněkud netypické řešení.

- V kapitole Výsledky na str. 30 je uvedeno, že některé extrakty musely být vyloučeny kvůli opakovaným kontaminacím. Je tím míněna kontaminace *in vitro* kultur HeLa buněk exponovaných extrakty příslušných kmenů? Předpokládá se, že kontaminující mikroorganismy pocházely z kultivovaných sinic, nebo mohlo dojít nějakým způsobem ke kontaminaci v průběhu přípravy extraktů a *in vitro* experimentu?

-Výsledky frakcionace jsou na str. 43 prezentovány pouze slovně, myslím, že jednoduché tabulkové shrnutí by bylo názornější a přehlednější pro představu o počtu frakcionovaných kmenů, jednotlivých testovaných frakcí a jejich účinků (např. %viability), chromatografické záznamy (280nm) pak mohly být uvedeny do příloh.

- Na straně 48 autorka diskutuje limitace metody MTT, zejména její schopnosti spolehlivě odrazet změny v počtu buněk a případné cytostatické účinky. Vedle navrhovaných metod přímého mikroskopického hodnocení nebo počítání buněk, jaké další nepřímé metody hodnocení počtu/denzity buněk by mohly být použity jako alternativa k MTT pro rychlý screening?

Celkově je předložená diplomová práce Kateřiny Delawské výborně zpracována, obsahuje řadu nových a vědecky hodnotných poznatků (např. absence produkce cyanotoxinů zkoumanými bentickými kmeny *Anabanea*, metodické poznatky týkající se screeningu cytostatických/cytotoxických/proapoptických účinků sinicových extraktů, izolace nové cytotoxické látky). Předloženou magisterskou diplomovou práci Kateřiny Delawské doporučuji přijmout a v případě úspěšné obhajoby hodnotit nejlepší možnou známkou.

V Brně dne 16. května 2016

Pavel Babica

RNDr. Pavel Babica, Ph.D.

RECETOX – Research Centre for Toxic

Compounds in the Environment

Faculty of Science, Masaryk University

Kamenice 753/5

62500 Brno

+420 549 494 620