



## Oponentský posudek diplomové práce Kateřiny Vickové - "Cytostatický efekt nostatinu A a jeho přírodních analogů na buněčnou linii HeLa "

Práce Kateřiny Vickové představuje na 65ti stranách výsledky zajímavého a originálního výzkumu zaměřeného na izolaci nově identifikovaných metabolitů sinice *Desmonostoc* a charakterizaci jejich biomedicínsky významných vlastností, konkrétně účinků na lidské nádorové buněčné linie.

Úvodní teoretická část s odkazy na aktuální literaturu nejprve stručně představuje hlavní strategie používané při vývoji nových léčiv a zejména látek s protinádorovými účinky, dále pak hlavní buněčné procesy, které jsou cílem pro působení protinádorových léčiv, a konečně známé a klinicky významné metabolity sinic resp. jejich deriváty s protinádorovou aktivitou.

Praktická část popisuje způsob izolace a purifikace nově objevených látek - nostatinů - z laboratorní kultury sinice *Desmonostoc muscorum*, a to s použitím několika purifikačních kroků (extrakce organickým rozpouštědlem, extrakce na pevné fázi, gelová permeační chromatografie, preparativní HPLC na oktadecylové a fenylové koloně). S izolovanými chemickými látkami označnými jako nostatiny pak byly realizovány in vitro experimenty s buněčnými liniemi HeLa a PaTu, ve kterých byly zkoumány účinky nostatinů na růst buněk a podrobněji pak působení nejučinnějšího kongeneru označovaného jako nostatin A. Kromě účinků na proliferaci a buněčné dělení bylo zkoumáno ovlivnění celé řady parametrů a buněčných procesů pomocí široké škály in vitro metod – účinky na buněčný cyklus, cytoskelet, mitochondrie, produkce energie a energetický metabolismus buněk. Velmi pozitivně vnímám také využití instrumentálně analytických technik pro stanovení změn koncentrací nostatinu A v médiu, jeho příjmu do buněk a také ověření jeho tepelné stability. Množství použitých metod, provedených experimentů, získaných výsledků a odvedené práce považuji za vysoce nadprůměrné.

Část Metody velmi dobře popisuje principy a základy použitých metod a postupů. Na řadě míst bych však uvítal podrobnější údaje týkající se způsobu provedení experimentů a jejich vyhodnocování, kde nejsou některé informace přesně specifikovány. Výsledky jsou sice přehledně a srozumitelně prezentovány, logicky na sebe navazují a hlavní závěry jsou jednoznačné, avšak v důsledku některých nejasností v metodikách zůstávají na některých místech v nejistotě ohledně toho, jakým konkrétním způsobem byla prezentovaná data získána nebo co přesně měřené parametry vyjadřují – prosil bych proto o vysvětlení/doplnění některých konkrétních situací (viz Dotazy).

Diskuze výsledků je na velmi dobré úrovni, autorka dobře komentuje a diskutuje pozorované rozdíly a trendy, vysvětluje a interpretuje získané výsledky včetně jejich diskuze, srovnání s aktuální literaturou a návrhy navazujících experimentů. Ukazuje tak, že během řešení experimentální části práce zvládla nejen metodickou a technickou stránku pokusů, ale skutečně rozumí získaným výsledkům a dokáže interpretovat, posoudit jejich význam. Hlavní výsledky jsou v závěru dobře shrnuty.

Práce je psána čtivě, bez gramatických chyb a překlepů (drobné korektury uvádím na zvláštním listu), pěknou češtinou, kterou však místy ruší používání anglickanismů. V práci postrádám abstrakt v češtině a také seznam použitých zkratk (ačkoli jsou při prvním výskytu v textu zkratky vesměs řádně definovány). Celkově struktura a rozsah textu splňují požadavky na diplomovou práci.

### Připomínky a komentáře

- Na str. 2 je uvedeno, že „*Komplexní přístup [k objasnění mechanismu účinku malých molekul] je založený na podobnosti fenotypu strukturálně nepodobných látek*“, dle mého názoru by bylo přesnější uvést „na podobnosti účinků na fenotyp“ nebo „na podobnosti fenotypických odpovědí“.
- Přístup k objasnění mechanismů účinků chemických látek popisovaný na str. 3 je označen v souladu s citovaným článkem Salvador & Luesch jako „přímý přístup („reverzní genetický“)\", dle mého názoru by bylo v této souvislosti přesnější použít termínu „reverzní chemická genetika“
- V kapitole Metody – oddíl 3.3.1 je uvedeno, že v závislosti na typu pokusu byly použity kultivační mikroděsky různých formátů (24, 96 nebo 384 jamkové desky různého typu, sklíčka). V oddílech 3.3.3-3.3.11 by proto bylo vhodné vždy specifikovat, jaký konkrétní mikroděskový či jiný formát byl pro



daný pokus použít a také upřesnit hustotu výsevu (ukázkově je toto popsáno např. v oddíle 3.3.5). Bez takové specifikace totiž informace o počtu vyšetřovaných buněk na jamku nebo o objemech přidávaných roztoků (např. bylo přidáno „200 uL DMSO“, „100 uL trypsinu“, „1 x 10<sup>4</sup> buněk na jamku“ atd.) postrádají potřebný kontext.

- Obr. 8 bylo by dobré doplnit legendu o barevnou identifikaci jednotlivých chromatogramů
- Obr. 11 není jasné, kterou frakci chromatogramy znázorňují (F2, F3, F4, jejich kombinaci?)
- Na některých místech (text, popisky grafů) jsou jako jednotky uváděny „nMol“ či „μMol“ – to je poněkud neobvyklé až matoucí, jednotka „mol“ reprezentuje látkové množství (počet částic), zatímco molární koncentrace se značí buďto „mol/l“ anebo „M“
- Na Obr. 20 by bylo vhodné dodat vysvětlivky/popisky k úsečce nad osou-x rozlišující jednotlivé hodnocené fáze buněčného cyklu
- Není jasné, v jakých jednotkách jsou vykresleny výsledky stanovení NosA v médiu – popiska „Relativní množství NosA“ v grafech na Obr. 22 a 23 není v textu ani legendě objasněna
- Podle mne zbytečné anglikanismy - mašinérie, „mounting“, „base peak“ chromatogram, „countercurrent“ chromatografie, „upregulovaný“

#### Dotazy

1. Jakým způsobem byly buňky exponovány? Z textu kapitoly Metody usuzuji, že buňky byly zkoumanými látkami exponovány již při výsevu? V opačném případě by měla být specifikována doba kultivace buněk před expozicí (přidáním látky). V případě přidávání nostatinu již během výsevu – lze nějak rozlišit vliv látky na proliferaci od možné inhibice adheze buněk?
2. Na str. 11 je parametr IC<sub>50</sub> definován jako „inhibiční koncentrace, při které dochází k zamezení růstu“, a zřejmě v tomto smyslu je v textu termín dále používán. Nicméně takto kvantifikovaným parametrem může být nejen růst, ale i viabilita, migrace, enzymatická aktivita apod., což by mělo být vždy specifikováno. Především ale IC<sub>50</sub> neoznačuje o koncentraci látky, která způsobí „zamezení“ sledovaného jevu, ale vyvolá jeho redukci o 50%.

V této souvislosti mne zajímá, jak byly stanoveny hodnoty IC<sub>50</sub> prezentované a diskutované v textu práce (např. Tab. III na str. 37) – jde o hodnoty odvozené z počtu dělení nebo z inhibice proliferace? Co představuje hodnota indikovaná červenou linkou (cca 1.0) v Obr. 15-17, 19 a 31?

3. Předpokládám, že parametr „počet dělení buněk“ na Obr. 15-17, Obr. 19, Obr. 31 byl získán ze změn v počtu buněk, které byly kvantifikovány pomocí časosběrné mikroskopie (toto není jednoznačně uvedeno). Z čeho a jak přesně byl parametr „počet dělení buněk za 72 h“ vypočítán a co reprezentuje (počet zdvojení populace, průměrný počet dělení na buňku, ...)?
4. Jakým způsobem byl získán a vypočten parametr „inhibice proliferace“? Z výsledků časosběrné mikroskopie nebo z MTT testu?
5. Teplotní stabilita NosA byla zkoumána v pevném stavu nebo v roztoku? Pokud v roztoku, tak v jakém? Může mít skupenství látky nebo složení roztoku vliv na teplotní stabilitu? Na str. 52 je uvedeno, že dobrá tepelná stabilita poukazuje na to, že nostatin není peptid. Nicméně např. sinicové cyklické peptidy microcystiny jsou známé svou vysokou tepelnou stabilitou.
6. Autorka konstatuje, že je „velkým překvapením“, že většina přidávaného NosA zůstávala v průběhu expozice v okolním médiu, nikoli uvnitř buněk. Jaké hodnoty by v daném experimentálním uspořádání (100 tis. buněk na jamku, 1 mL média, koncentrace NosA 400 nM) musela dosáhnout koncentrace NosA v buňkách, kdyby se většina (nebo alespoň polovina) této látky z okolního média přesunula do buněk? Objem HeLa buňky uvažujme pro jednoduchost 2000 μm<sup>3</sup>



(<http://bionumbers.hms.harvard.edu/bionumber.aspx?id=103725&ver=3>). Byla by taková intracelulární koncentrace srovnatelná např. s pozorovanými hodnotami intracelulárních koncentrací používaných cytostatik – např. paclitaxelu?

7. Ve frakci „buněčné“ a „trypsinové“ nebyl NosA detekován – jaký byl detekční limit pro toto stanovení, tedy jaká byla nejnižší detekovatelná koncentrace NosA v buňkách dle použitého postupu?
8. V kapitole 4.2, Obr. 24 a Obr. 25G – byla kontrola pro srovnání (100% v Obr. 24, varianta G v Obr. 25) stejná pro variantu odmyv i trypsinizace, případně „Nostatin 24 h“ a „Nostatin 48 h“? Jak dlouho byly inkubovány kontrolní buňky (72 h, 24+72 h, 48+72 h)?
9. Autorka uvádí na str. 51, že „obsah NosA a jeho analogů v biomase sinice“ je „relativně nízký“. Jaké jsou koncentrace NosA a jeho analogů v biomase sinic v porovnání s koncentracemi jiných sekundárních metabolitů sinic?

### Závěr

Celkově práci hodnotím jako velmi kvalitní, vyniká především vysokou rozmanitostí použitých a studentkou zvládnutých metod (preparativní a analytické metody, metody buněčné in vitro biologie) a velkým počtem provedených experimentů, v rámci kterých byly navíc získány zcela nové a unikátní vědecké poznatky, jež jsou velkým příslibem pro další navazující výzkum. Jak však vyplývá z výše uvedených připomínek a dotazů, zejména popis metodik a výsledkových grafů ve finálním textu mohl být podrobnější. Předloženou magisterskou diplomovou práci Kateřiny Vickové doporučuji k obhajobě.

V Brně dne 9. ledna 2018

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



### Drobné opravy / překlepy:

- Abstrakt „naturally occurred structural“  
*occurring structural*
- p1 rezistentní buněk  
*rezistentních*
- p4 „potenciální“ vs. „potencionální“ (p1, p3, p6, p55)
- p5 mašinérie
- p8 neefektivní glykolýzy  
*raději „méně efektivní“*
- p8 „například MAPK (mitogen-activated protein kinase), ERK (extracellular signal-regulated kinase) nebo dráha PI3K/AKT (phosphatidylinositol 3-kinase/ Protein kinase B)“  
*nepřesná formulace, ERK kinázy jsou podskupinou / příkladem MAPK*
- p13 „IC50 [cryptofycinu] se pohybuje v řádech pikomolů.“  
*... upřesnit v jakém systému, pro jaký parametr...*
- p14 „mlže *Dolabella auricularia*“  
*zmiňovaný organismus je plž*
- p17 BSA je zkratka používaná pro bovinní sérový albumin, nikoli fetální bovinní sérum
- p21 v 3.3.1 je uvedeno, že pro „pro konfokální mikroskopii“ byly buňky kultivovány na sklíčkách, konfokální mikroskopie ale podle dalšího popisu metod a výsledků nebyla používána
- p25 „při eseji“  
*„assay“ není „essay“*
- P23 „mounting gel“  
*montovací gel (resp. médium)*
- P27 „base peak chromatogram“  
*chromatogram základního píku spektra*
- P29 „extracted ion chromatogram“  
*extrahovaný iontový chromatogram*
- p51 „countercurrent“ chromatografie  
*protiproudá chromatografie*
- p53 „Cryptoficin“  
*„cryptofycin“, ale toto je „počeštělé“ jen napůl, tak spíše „kryptofycin“ anebo zde zůstat u anglické verze (nemáme oficiální české názvoslovi sinicových metabolitů)*

**Posudek na magisterskou diplomovou práci Bc. Kateřiny Vickové  
„Cytostatický efekt nostatinu A a jeho přírodních analogů na buněčnou linii  
HeLa“**

Práce má klasický formát diplomové práce. Úvodní část je napsána velmi přehledně a srozumitelně. Cíle práce jsou přesně formulovány. Jen čtenáře zarazí, když se najednou setkává s nostatinem A, měl by být na tuto informaci připraven. Část „Materiál a metody“ je napsána přesně a srozumitelně, jen opět by člověk měl být připraven a v úvodní části se alespoň něco dozvědět o použitém sinicovém kmenu. Metodický rozsah práce je úctyhodný.

První bod kapitoly „Výsledky“, týkající se sinice a nostatinu A, by měl být, jak jsem naznačil, rozvinut širěji v úvodní části. Inkrement je přírůstek, takže věta o snižující se molekulární váze o inkrement není úplně správná. V kapitole 4.3 mi není úplně jasné, proč hlavní látka, NosA byla testována jen s linií HeLa, kdežto analoga byla testována na dvou liniích. Látka s vyšším m/z 2519 nebyla testována vůbec, přestože z výsledků plyne, že čím větší m/z, tím je větší účinek.

Pro získání iontů byl použit šetrný elektrosprej, ale jelikož o daných molekulách toho moc nevíme, je otázkou, k čemu při ionizaci docházelo. Jaká je jistota, že např. NosA má opravdu molekulovou hmotnost 2504, když máme k dispozici jen m/z. Byla provedena kontrola izotopických píků, aby se vyloučilo, že iont je třeba 2x větší ale se dvěma náboji? Domnívám se, že by bylo vhodné použít i jinou byť mnohem méně přesnou nezávislou metodu stanovení molekulové hmotnosti (prosím o návrhy, co by připadalo v úvahu). Ten inkrement je CH<sub>2</sub> nebo dusík? To by se z přesně určeného m/z dalo pravděpodobně zjistit. Taky

se domnívám, že by se mělo více vědět o chemické povaze NosA. Jaké možné metody navrhuje? Proč selhala NMR?

Analýza vlivu NoS na buněčný cyklus je velmi zajímavá, rovněž tak barvení aktinu a tubulínu. Zde by rovnou mělo být deklarováno, co z obrázků plyne, i když se to dá domyslet a je to dále diskutováno. Obecně bych do kapitoly „Výsledky“ víc řadil interpretaci, co naměřené znamená a do diskuze zařadil jen širší možné souvislosti .

Výsledky jsou na sedmi stranách v kapitole „Diskuze“ velmi důkladně a přehledně diskutovány. Jsou vyvozeny adekvátní závěry.

Rozsah citované literatury je dostatečný, snad jen drobnou poznámku, že je třeba dodržet jednotnost v použití velkých písmen v názvech časopisů.

Předložená diplomová práce je velmi kvalitní a je založena na širokém spektru velmi dobře zvládnutých metod. Hodnotím ji stupněm „výborně“ a Kateřinu Vickovou za ni velice chválím.



RNDr. Jan Ženka, CSc.

V Českých Budějovicích dne 11.1.2018