

## Oponentský posudek diplomové práce Ing. Dominiky Tučkové - " Efektivita vyhledávání sekundárních metabolitů sinic se specifickou aktivitou proti lidským nádorovým buňkám pomocí metod "highthroughput" screeningu"

Předkládaná diplomová práce se věnuje na 126ti stranách textu problematice identifikace nových sinicových metabolitů s protinádorovou aktivitou a to pomocí in vitro experimentů s tkáňovými kulturami. Práce odráží aktuální problematiku hledání nových farmakologicky významných látek využitelných k léčbě nádorových onemocnění včetně využití moderních přístupů a technologií na bázi HTS, v kombinaci s dalšími pokročilými metodami (HPLC-HRMS).

Téma je zpracováno přehledně, v teoretické části jsou čtivým způsobem podrobně představeny aktuální poznatky týkající se mechanismů karcinogeneze a specifických vlastností nádorových buněk, zejména v kontextu zužitkování těchto poznatků při léčbě rakoviny. Úvodní část je uzavřena přehledem nejvýznamnějších sinicových metabolitů a jejich derivátů s protinádorovou aktivitou. Text je vhodně doplněn schémata a tabulkami.

Praktická část se zaměřuje na realizaci in vitro experimentů, ve kterých byl v režimu s vysokou propustností proveden skrining antiproliferačních/cytotoxických účinků frakcionovaných extraktů vybraných kmenů sinic, ověřování pozorovaných výsledků ve validačních experimentech, sekundární frakcionace, případně purifikace látek vyskytujících se v zájmových frakcích a studium jejich biologických účinků.

Použité metody jsou popsány dostatečně přesně a srozumitelně. Uvítal bych možná podrobnější popis HTS experimentů (možná již zde doplnit hustotu výsevu buněk, která je zmíněna ve výsledkové části, dále není upřesněno, zda adherentní buňky byly rovněž vysety 24 h před zahájením expozice, jako v případě ověřovacích experimentů; informace o způsobu expozice v HTS – objemy média, způsob dávkování vzorků apod.). V přípravě extraktů sinic je zmíněn kmen Brasilonema, který byl nejpodrobněji studován, nicméně z popisu výsledků se jeví, že zkoumány byly také další kmeny sinic, které nejsou specifikovány.

Ve vlastní práci byly nejprve zhodnoceny výsledky testování >1700 LC frakcí na 21 lidských buněčných liniích pomocí HTS. Následně byly vybrány vzorky pro další experimenty, které byly autorkou realizovány. Využita byla kombinace vybraných buněčných linií, hodnocených parametrů, vybrané extrakty byly dále frakcionovány, analyzovány, jak z pohledu biologické aktivity, tak HRMS analýzy kandidátních sloučenin. V rámci řešení práce autorka realizovala velké množství experimentů, během kterých zvládla použití rozmanitých metod z oblasti analytické chemie, biochemie a buněčné / in vitro biologie. Výsledky jsou prezentovány a komentovány přehledně a srozumitelně, včetně časové návaznosti a posloupnosti výzkumných prací. V průběhu řešení práce autorka demonstrovala náročnou a často komplikovanou cestu vedoucí od slibných účinků pozorovaných v HTS experimentech, přes jejich validaci v nezávisle realizovaných experimentech ve standardním laboratorním formátu, až po změny biologické aktivity pozorované v průběhu další frakcionace aktivních vzorků nebo po purifikaci zájmových kandidátních látek, které realizovala.

Některé faktory, které mohly přispět k rozdílu mezi výsledky HTS a navazujícími experimenty se v rámci experimentální práce podařilo identifikovat (rozdíly v experimentálním designu a jejich vliv na pozorovanou biologickou aktivitu). Další vysvětlující faktory jsou v práci navrženy a diskutovány, a mohou posloužit jako vodítka nebo doporučení pro další výzkum. Diskuze výsledků je na velmi dobré úrovni a ukazuje, že během řešení experimentální části zvládla autorka nejen technickou stránku, ale dokáže interpretovat a posoudit význam získaných výsledků.

Ačkoli se v rámci práce nepodařilo ve vybraných extraktech a frakcích identifikovat a izolovat sloučeniny vykazující silný selektivní antiproliferační, cytotoxický či proapoptický účinek na nádorovou linii rakovinu prsu, v rámci práce byla získána řada cenných výsledků a metodických zkušeností, které mohou být uplatněny v navazujícím výzkumu.

### Připomínky a komentáře

Po formální stránce je práce psána čtivě, jen s malým množstvím chyb nebo překlepů. Na některých místech se autorka možná zbytečně uchyluje k používání anglikanismů („triple-negative“, „highthroughput“) či hovorových

výrazů („čistá látka“, „problém nasazení“, „efekt táhnoucí se přes koncentrace“, „výhody“ nádorových buněk), ale celkově toto nesnižuje čtivost ani srozumitelnost textu.

- Na str. 9 je u problematiky zkracování telomer uvedeno „*jakoby docházelo k chybě a kopírování nebylo provedeno až do konce.*“. Nejedná se o chybu kopírování, ale o důsledek způsobu, jakým dochází k syntéze zpoždujícího se vlákna při replikaci (v důsledku vlastnosti DNA polymerázy - její 5' → 3' polymerizační aktivity) a to v kombinaci s lineárním uspořádáním chromozomu.
- Na str. 80 je uvedeno, že „*Nádorové buněčné linie by neměly být ovlivněny žádnou kontaktní inhibicí*“ – domnívám se, že toto neplatí zcela univerzálně, u některých nádorových buněčných linií může být kontaktní inhibice růstu v určité míře zachována (HepG2), nejedná se nutně o binární stav „ano/ne“.

## Dotazy do diskuze

- U popisu charakteristických vlastností nádorových buněk jsou jako příklady soběstačnosti v produkci růstových signálů zmíněny autokrinní produkce růstových faktorů, nebo zvýšená exprese receptorů pro růstové signály. Existují i další možnosti? V obrázku 5 je jako příklad této vlastnosti zmíněn velmi rozšířený onkogen *ras*. Jakým způsobem je v tomto případě soběstačnosti v růstových signálech zajištěno?
- Vedle možného vlivu rozdílů v hustotě výsevu buněk, či možným změnám ve složení vzorku během uskladnění, existují další faktory, které by mohly přispět k rozdílům v HTS experimentech a validačních experimentech? Mohly hrát nějakou roli také možné mezilaboratorní rozdíly v samotné kultivaci buněk a postupech realizaci in vitro experimentů (zdroj buněk, pasáže/pasážování, složení a šarže médií/FBS, způsob přípravy a dávkování expozičních médií/roztoků, poměr buňky-médium)? Mohl by možný vliv těchto faktorů být posouzen např. použitím referenční / modelové látky či látek v HTS a validačních experimentech?
- Byly experimenty s vybranými frakcemi nebo izolovanými látkami opakovány také nezávisle, pro potvrzení reprodukovatelnosti?
- Hustota výsevu buněk a fáze růstové křivky během experimentu může podle získaných výsledků významně ovlivnit účinky. Při jakých hustotách výsevu, resp. v jakých fázích růstové křivky, se podobně koncipované experimenty provádějí v jiných studiích (např. NCI-60?).

Předloženou práci hodnotím jako velmi kvalitní, vyniká počtem a rozmanitostí použitých a zvládnutých metod i množstvím provedených experimentů, v rámci kterých byly získány a v DP představeny originální, cenné a průkopnické poznatky v oblasti in vitro HTS skrínování frakcionovaných sinicových extraktů, jež jsou příslibem pro další navazující výzkum. Diplomovou práci Ing. Dominiky Tučkové doporučuji k obhajobě.

V Brně dne 20. května 2021

doc. RNDr. Pavel Babica, Ph.D.

RECETOX

Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita

Kamenice 753/5

62500 Brno

+420 549 494 620