



Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové

OPONENTSKÝ POSUDEK NA DIPLOMOVOU PRÁCI

Název diplomové práce: Cytotoxicita vybraných isochinolinových alkaloidů indukci apoptózy

Práci zpracovala: Bc. Veronika Tejkalová

Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická

Akademický rok 2014/2015

Studijní program: N3912 Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor: Bioanalytik

Vedoucí práce: RNDr. Radim Havelek, PhD.

Konzultant práce: RNDr. Karel Královec, PhD.

Oponent: prof. MUDr. Martina Řezáčová, PhD., Ústav lékařské biochemie, Lékařská fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze

Doporučení k obhajobě: **Doporučuji**

Posudek:

Předkládaná diplomová práce má experimentální charakter. Autorka zkoumá vliv devíti isochinolinových alkaloidů izolovaných z rostlin čeledi Papaveraceae a Fumariaceae na linie nádorových buněk A549, Jurkat a MOLT-4. Práce na 95 stranách je standardně členěna, výsledky experimentů řádně doloženy obrázky a grafy.

Teoretická část v rozsahu 18 stran obsahově odpovídá zadané problematice. Autorka zde shrnuje poznatky o biologických účincích studovaných alkaloidů a podrobně charakterizuje jednotlivé typy alkaloidů. Tato část práce se naneštěstí obsahuje mnoho překlepů, gramatických chyb a jazykově chybných větných spojení. Řada vět je formulována velmi neobratným způsobem, což značně snižuje čitelnost textu (namátkou s. 12 „buněk, které ... ztratili“; „dovolují přežít terapii indukovanou apoptózu“ – co indukuje co?; s. 16 „Několik skupin a jejich nejdůležitějšími zástupci jsou probrány níže.“; prakticky žádná stránka neunikla podobným neobratnostem). Fakticky po odborné stránce však závažné chyby neobsahuje, prosím však autorku, aby v rámci obhajoby upřesnila své myšlenky v odpovědích na dotazy 1) a 2).

Metodicky je tato práce na velmi vysoké úrovni a autorka ovládla řadu náročných metodik, včetně kultivace buněčných linií, průtokové cytometrie a fluorescenční mikroskopie. Použité metody jsou popsány na 15 stranách textu. Metodická část opět poměrně neobratně (ilustrativně - přehled použitých chemikálií na s. 33 je přehledkou světových jazyků – proč „amino acides non-essentiels“, když na s. 37 je použit český termín „neesenční aminokyseliny“; proč „Sodium



Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové

Pyruvate“, když na s. 37 je opět v protokolu použit český „pyruvát“; pochopení mechanismu detekce kaspázy 3/7 na s. 46 z popisu vyžaduje značnou fantazii; závěrečná věta sekce na s. 47 „Rozdíl na hladině $p < 0,05$ byl považován jako statisticky významný pokud, není uvedeno jinak, t-test.“ zcela postrádá smysl) avšak fakticky správně popisuje principy využitých metod i podrobné protokoly jednotlivých postupů.

Jádro práce tvoří vlastní výsledková část (34 s.). Autorka zde předkládá výsledky rozsáhlého experimentování, ve kterém zhodnotila působení devíti různých alkaloidů a dvou kontrolních látek na tři nádorové buněčné linie pomocí různých metodik. Dále autorka u dvou aktivních sloučenin (chelidonin a homochelidonin) testovala podrobněji mechanismus cytotoxického působení, hodnotila různými metodami indukci apoptózy a ovlivnění buněčného cyklu. Autorka získala řadu zajímavých a dobře doložených výsledků. Na straně 54. postrádám v grafu výsledky testování 50 $\mu\text{mol/l}$ kryptopinu.

Literatura obsahuje 84 citací, kde autorka dodržela citační normy.

Z předložené diplomové práce je zřejmé využití celé škály špičkových metodických přístupů, a solidní pochopení těchto náročných metod. Získané výsledky jsou dobře zdokumentované a originální. Hlavním nedostatkem je stylistická neobratnost, plynoucí snad z nezkušenosti či nepozornosti autorky.

Závěr:

Práce byla naplánována, provedena a sepsána vědecky odpovídajícím způsobem a přinesla nové vědecké poznatky týkající se protinádorového působení vybraných isochinolinových alkaloidů izolovaných z rostlin čeledi Papaveraceae a Fumariaceae. Zadání DP bylo splněno. Byly použity moderní metodiky v souladu se současnými světovými trendy. Předložená práce

v y h o v u j e

všem předpisům stanoveným pro diplomové práce. Proto ji navrhuji **přijmout** a hodnotím ji známkou

v e l m i d o b ř e .

K autorce mám pak následující dotazy:

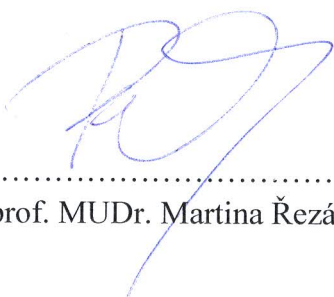
- 1) Na straně 17 uvádíte, že „*Chelidonin (obr. 3) je terciární.*“ **Terciární co? Vysvětlete pojmy primární, sekundární a terciární alkaloid a jejich vztah k primárním, sekundárním a terciárním aminům.**
- 2) Na straně 28 uvádíte při popisu vnější dráhy indukce apoptózy, že „*Touto vazbou vzniká ... DISC, který přes adaptorové molekuly aktivuje kaspázu 8 a kaspázu 10. ...*“



Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové

Adaptorové molekuly uvolňují s mitochondrií cytochrom c, který dále amplifikuje kaspázovou kaskádu a transkripční faktory“. **Vysvětlete lépe, jakým způsobem dochází ke komunikaci mezi vnější drahou (DISC → adaptorové molekuly → aktivace kaspázy 8 → aktivace kaspázy 3) a vnitřní drahou (permeabilizace mitochondriální membrány → uvolnění cyt c → aktivace kaspasy 9 v apoptosomu → aktivace kaspázy 3) indukce apoptózy.**

- 3) Na s. 34 v popisu izolace alkaloidů chybí část věty – „*Testované látky byly izolovány z rostlin čeledi.*“ **Z jakých rostlin byly tedy studované alkaloidy izolovány?**
- 4) **Čím si vysvětlujete vzestup cell indexu mezi 24-72 hodinou po přidání chelidoninu (s. 49), homochelidoninu (s. 50) či nocodazolu (s. 58) v účinných koncentracích, který následuje po razantním poklesu na hodnoty pozitivní kontroly?**
- 5) **Proč není v grafu na obr. 25 (s. 54) znázorněn vliv 50 umol/l kryptopinu?** V textu uvádíte, že jako u ostatních testovaných alkaloidů byly studovány koncentrace 1 - 50 umol/l, nejvyšší znázorněná koncentrace v případě kryptopinu je však 20 umol/l.



.....
prof. MUDr. Martina Řezáčová, PhD.

v Hradci Králové dne 22. května 2015