

**UNIVERZITA KARLOVA  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

Katedra Farmakognozie a farmaceutické botaniky

Studijní program: Farmacie

**Posudek oponenta diplomové práce**

Rok obhajoby: 2023

Autor/ka práce: **Aneta Maršálková**

Vedoucí práce: PharmDr. Kateřina Hradiská Breiterová, Ph.D.

Konzultant/ka: -

Oponent/ka: Mgr. Petr Jošt, Ph.D

Název práce: **Cytotoxická aktivita vybraných kultivarů rodu Narcissus in vitro**

Rozsah práce: 79 stran, 24 obrázků, 21 tabulek, 83 citací

**Hodnocení práce:**

- |  |             |
|--|-------------|
| a) Odborná úroveň a zpracování teoretické části:               | výborná     |
| b) Náročnost použitých metod:                                  | velmi dobrá |
| c) Zpracování metodické části (přehlednost, srozumitelnost):   | velmi dobré |
| d) Kvalita získaných experimentálních dat:                     | výborná     |
| e) Zpracování výsledků (přehlednost, srozumitelnost):          | velmi dobré |
| f) Hodnocení výsledků včetně statistické analýzy:              | dobré       |
| g) Myšlenková úroveň a rozsah diskuse výsledků:                | velmi dobrá |
| h) Srozumitelnost, výstižnost a adekvátnost závěrů:            | výborná     |
| i) Splnění cílů práce:   | výborné     |
| j) Množství a aktuálnost literárních odkazů:                   | výborné     |
| k) Jazyková úroveň (stylistická a gramatická úroveň):          | výborná     |
| l) Formální úroveň práce (členění textu, grafické zpracování): | výborná     |

Doporučuji diplomovou práci k uznání jako práci rigorózní

Případné poznámky k hodnocení:

Předkládaná diplomová práce studentky Anety Maršálkové se zabývá kvalitativní a kvantitativní instrumentální analýzou extraktů z kultivarů rodu Narcissus a jejich interakcí s jaterní buněčnou linií HepG2. Teoretická část práce je zpracována celkem na 27 stranách textu, doplněného adekvátním množstvím tabulek a obrázků. Autorka zde popisuje rod Narcissus a antineoplastické účinky jednotlivých AmA na pestré škále buněčných linií. Práce obsahuje minimum překlepů, je psána srozumitelným způsobem a objevuje se zde minimum méně vhodných výrazů nebo slovních spojení. V experimentální části studentka použila jednak metody instrumentální analýzy pro identifikaci jednotlivých složek extraktů a rovněž i metody buněčné biologie za účelem zjištění cytotoxicity zkoumaných vzorků. Autorka tak prokázala osvojení hned několika náročných laboratorních postupů. Přínos práce spočívá v analýze 6 nových extraktů a rozšíření poznatků o toxicitě vůči nádorovým jaterním buňkám, kde bylo hodnoceno ještě dalších 6 extraktů, jejichž analýza byla předmětem jiné diplomové práce. K práci mám následující komentáře a otázky:

#### Komentáře:

- 1) str. 8: samotná zkratka MTT neodkazuje přímo na kolorimetrický test, ale je to pouze zkratka užívaná pro látku 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromid, která je jednou z chemikálií použitou v rámci tohoto testu.
- 2) str. 15. pro úplnost přehledu kultivarů a lepší orientaci čtenáře by bylo na tomto místě vhodné alespoň vyjmenovat, kterých 5 kultivarů a 1 varieta bylo konkrétně popsáno v diplomové práci Mgr. Tkáčové a poté navázat s dalšími studovanými kultivary. Tuto informaci se dozvídáme až později.
- 3) str. 30, 32, 35 dále: výraz: 48/72hodinové MTT eseje - lépe použít místo slangového anglicismu esej např. MTT test nebo metoda stanovení buněčné viability za použití MTT atp.
- 4) st. 30: u tabulky 4 není uveden zdroj informací.
- 5) Uvedený časový údaj, např. 24, 48 nebo 72 h nemá nic společného s tím, jak dlouho byl MTT test prováděn, ale odkazuje na délku inkubace buněk s testovanou látkou/extraktem. Samotná inkubace buněk s MTT je v rámci testu pak např. dle metodiky autorky pouze 3 hodiny.
- 6) str. 41: v textu chybí odkaz na tabulku 9
- 7) str. 44: v textu chybí odkaz na tabulku 10
- 8) Pro zjištění selektivity cytotoxického a antineoplastického účinku extraktů by bylo vhodné doplnit testy na nenádorových buňkách.
- 9) Ve výsledkové části postrádám jakýkoliv komentář k výsledkům.
- 10) Ve výsledcích chybí zmínka o statistickém zhodnocení dat a zda je směrodatná odchylka hodnoty IC50 vyjádřena jako  $\pm$  SD či  $\pm$  SEM.
- 11) V rámci analýzy dat získaných screeningem cytotoxické aktivity by bylo vhodné doplnit obrázek 24 o statistické zhodnocení významnosti rozdílu mezi oběma testovanými koncentracemi, popřípadě o významnosti rozdílu viability oproti doxorubicinu v téže koncentraci (tyto hodnoty ale neznáme), popřípadě oproti dalším AmA, kde jsou naopak tyto údaje dostupné.
- 12) Autorka uvádí, že jako standard byl použit doxorubicin HCl. Ve výsledcích je uvedena pouze hodnota IC50 doxorubicinu v  $\mu$ M. Ovšem cytotoxická aktivita extraktů byla vyjádřena jako % viability buněk při koncentraci 10 a 50  $\mu$ g/ml a bylo by tedy na místě uvést hodnoty % viability i pro tyto dvě koncentrace doxorubicinu.

#### Nevhodná slovní spojení a výrazy:

- 1) str. 11 rostliny alkaloidní (= rostliny obsahující alkaloidy)
- 2) str. 14: opylován mûramy (= mûra je lidový název pro nočního motýla)

#### Překlepy:

- 1) str. 15, 42, 66: mgr. namísto Mgr.
- 2) str. 31 MOL-4 na místo MOLT-4

#### Dotazy a připomínky:

- 1) Autorka uvádí, že alkaloidy z rodu Amarillidaceae mají velký farmaceutický potenciál. Je znám kultivar, který byl šlechtěn vyloženě za účelem získávání cílených alkaloidů, např. ve vhodném poměru nebo vysoké koncentraci určitých AmA?

Popřípadě byla pozorována nebo je známa nějaká souvislost mezi mírou obsahu alkaloidů a fyzickým vzhledem kultivarů?

- 2) Proč autorka testovala 24 hodinový interval inkubace buněk s testovanými extrakty, když v teoretické části jsou prezentována data z literatury, která pocházejí z intervalů inkubace 48 nebo 72 hodin?
- 3) Jakým způsobem může délka inkubace buněk s testovanou látkou ovlivnit výslednou hodnotu IC<sub>50</sub>?
- 4) Lze odlišit použitím metody MTT cytotoxické a antiproliferační účinky testovaných extraktů? Jaká další metoda by nám tyto informace mohla poskytnout?
- 5) Na str. 45 autorka uvádí, že viabilitu buněk vypočítala podle Lambert-Beerova zákona. Ve výsledkové části je však vyjádřena viabilita buněk v % vztažených ke kontrolním buňkám (ovlivněných pouze DMSO). Jak tedy byla viabilita vypočítána?
- 6) Autorka v metodické části neuvádí, zda byly hodnoty získány opakováním několika nezávislých experimentů. Může autorka vysvětlit, jak byly hodnoty získány a jak byla potvrzena reprodukovatelnost získaných výsledků?
- 7) Jaká je příčina rozdílu procentuálního zastoupení jednotlivých AmA zjištěná metodami GC-MS a GC-FID? Například u extraktu AL-456 byl metodou GC-MS indentifikován galanthamin v podílu 77 % a tazettin v podílu 0 % (tab 17). Naopak metodou GC-FID bylo ve stejném extraktu zjištěno 60,15088 % tazettinu a pouze 5 % galanthaminu (tab. 18), což na druhou stranu lépe odpovídá jeho více než desetinásobně vyšší koncentraci v cibuli oproti galanthaminu (tab. 19).
- 8) U sumárního extraktu AL-456 byla v koncentraci 50 µg/ml zjištěna viabilita buněk 20 %. Dle analýz by tento extrakt měl obsahovat 77 % galanthaminu (GC-MS) anebo 60 % tazettinu (GC-FID), což v diskuzi autorka vysvětluje rozdílnou schopností ionozace jednotlivých alkaloidů během analýzy. Jak Galantamin tak i tazettin snižují viabilitu buněk přibližně o 20 či 10 % v porovnání s kontrolou. Jak si autorka vysvětluje výrazný pokles viability u extraktu AL-456, když obě majoritní složky tohoto extraktu jsou relativně málo toxické?
- 9) AmA mají bohaté spektrum účinků. Jednak se vyznačují inhibičním vlivem v rámci cholinergní transmise, jednak vykazují cytostatické a cytotoxické účinky. Může autorka provést rozdělení AmA, které převládají ve studovaných extraktech podle těchto vlastností?

**hodnocení, práce je: velmi dobrá**

**k obhajobě: doporučuji**

V Hradci Králové

28. srpna 2023

podpis oponenta/ky