

Oponentský posudek

Dizertační práce:

Možnosti průtokové cytometrie v analýze reakce buněk na genotoxický stress.

Autor práce: **Mgr. Radim Havelek**, Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Hradci Králové

Oponent: prof. RNDr. Rudolf Štětina, CSc., Fakulta vojenského zdravotnictví, Hradec Králové.

Předložená práce má celkem 130 stran textu včetně 43 obrázků a je doplněna o kopie 10 článků publikovaných ve vědeckých časopisech. Ve třech případech článků je autor této práce také prvním autorem článků.

Práce je zaměřena na metodické přístupy sledování poškození DNA, především dvouvláknových zlomů pomocí stanovení histonu γ H2AX a na sledování indukce apoptózy u buněk po ozáření, či ovlivnění vybranými genotoxickými látkami.

Cílem práce bylo stanovit dávkovou a časovou závislost indukce γ H2AX a stanovit ovlivnění této závislosti inhibitory ATM kinázy. Dalším cílem bylo zjistit vliv ATM kinázy a její inhibice na distribuce kmenových buněk v buněčném cyklu. Konečně, jedním z hlavních cílů bylo porovnat také indukci apoptózy u maligně transformovaných T- lymfocytů line MOLT-4 a zdravých lidských lymfocytů, a to jednak po působení vanadocen dichloridu a jednak po působení cisplatin.

V úvodní části práce autor udává velmi detailně zpracovaný přehled problematiky a současných znalostí o mechanismech buněčné odezvy na genotoxický stres. Zaměřuje se především na histon H2AX a jeho úlohu a význam v těchto procesech, především v opravě dvouvláknových zlomů DNA. Tato část práce jasně dokladuje hloubku autorových znalostí problematiky, s jakými k řešení problému přistupoval.

V další části je uveden podrobný popis použitých metod, použitých materiálů, biologických modelů, zvířat a buněčných linií.

Postup prací byl jasně směřován k využití γ H2AX jako markeru radiačního poškození. Nejdříve byla provedena základní studie, zda tento ukazatel vykazuje závislost na dávce záření. To bylo jednoznačně prokázáno u potkanů po celotělovém ozáření. Jak se ukázalo, podobnou závislost vykazoval tento marker rovněž při ozáření oblasti hrudníku.

Za velmi přínosné z praktického hlediska považují porovnání stanovení γ H2AX u buněk bezprostředně po ozáření a dále za 23 hodin. Takováto měření mají velký praktický význam především z hlediska možného praktického klinického využití metody.

Ukázalo se, použité metody jsou velmi přínosné též pro oblast studia radiační odezvy u definovaných biologických buněčných modelů, tj. leukemických buněk deficientních

v určitých funkcích, např. v případě genu pro protein p53. U těchto modelů tak bylo možno porovnávat např. indukci apoptózy a její ovlivnění pomocí specifických inhibitorů.

U mezenchymálních kmenových buněk zubní pulpy a periodontálního ligamenta byl za 1 h po ozáření dávkami nad 20 Gy zjištěn vzestup hladiny γ H2AX. Inhibice ATM kinázy vybranými inhibitory u MKB vedla k potlačení indukce γ H2AX. Inhibice ATM kinázy vedla u MKB periodontálního ligamenta k akumulaci buněk v G1 fázi, zatímco u MKB zubní pulpy k akumulaci v G2 fázi.

Důležité je porovnání indukce γ H2AX a indukce apoptózy u relativně radiosensitivních lymfocytů v porovnání s mezenchymálními kmenovými buňkami. U MKB byla pozorována tzv. oddálená apoptóza, a to až po určitém setrvání poškozených buněk v G2 fázi. Dalším významným zjištěním je, že u buněk které neumírají procesem oddálené apoptózy dochází k procesu senescence.

Velmi zajímavé je zjištění, že kofein aplikovaný před ovlivněním leukemických buněk mitoxantronem snižoval procento apoptotických buněk ve srovnání s ovlivněním samotným mitoxantronem.

Jako velký přínos použité metody se ukázalo porovnání indukce apoptotických buněk lidské leukémie MOLT-4 po jejich ovlivnění cisplatinou a vanadocen dichloridem. Zatímco vanadocen dichlorid vykazoval větší cytotoxicitu u normálních lidských lymfocytů oproti leukemickým buňkám, v případě cisplatinu tomu bylo naopak, lymfocyty k cisplatině nebyly citlivější, než leukemické buňky. Tyto zajímavé výsledky jasně ukazují přínos výzkumného zaměření práce a jeho potenciální využití v klinické praxi.

Výsledky práce jsou publikovány v časopisech s tvrdým recenzním řízením, takže na práci lze jen těžko hledat nějaké nedostatky. Vědecká úroveň práce je vysoká a bohatě převyšuje nároky předepsané pro udělení hodnosti PhD. Práce má dobrou formální úroveň, přesto se zde vyskytují některé výrazy patřící spíše do laboratorního slangu, jako :

kroslinky (strana 17)

γ H2AX je multifaktoriální hráč (strana 27)

Nebo se vyskytují některé nepřesnosti jako:

látky skupiny topoizomeráz II (mitoxantron) - strana 107 - mělo by být látky skupiny inhibitorů topoizomeráz II

Rád bych autorovi práce položil následující otázky:

- 1) V práci postrádám srovnání citlivosti použité metody detekce dvouvláknových zlomů DNA s některými jinými metodami, jako je např. dříve používaná neutrální filtrová eluce, neutrální kometový test apod. Mohl by se autor pokusit o určitá srovnání
- 2) Ovlivnění buněk MOLT-4 vanadocen- dichloridem vedlo k akumulaci buněk v G2 fázi, ovlivnění cisplatinou spíše v S a později v G1 fázi. Vanadocen dichlorid byl toxičtější pro zdravé lymfocyty, než pro MOLT-4. U cisplatinu to bylo naopak. Do jaké míry může být tento rozdíl dán tím, že cisplatinu indukuje křížové vazby v DNA, zatímco vanadocen dichlorid spíše inhibuje syntézu DNA a je antimitotický ?

Předložená disertační práce obsahuje výsledky publikované v prestižních mezinárodních vědeckých časopisech, což jasně dokládá jejich kvalitu a význam pro obor lékařské chemie a biochemie. Autor zvládl velice náročné experimentální metody průtokové cytometrie stanovení apoptózy a enzymatických aktivit a stanovení poškození DNA. Prokázal schopnost kritického hodnocení svých výsledků v kontextu s nejnovějšími poznatky o struktuře a funkci studovaných genů a jimi kódovaných proteinů. Prokázal také schopnost samostatně řešit náročné vědecké problémy a zároveň cíleně spolupracovat v rámci řešení širšího významného projektu. Proto doporučuji předložit uvedenou práci Mgr. Radima Haveleka jako podklad pro řízení k udělení titulu Ph.D. podle platných předpisů.

V Hradci Králové dne 24.5.2012

prof. RNDr. Rudolf Štětina, CSc.