

**UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

Katedra biochemických věd

Studijní program: Farmacie

Posudek oponenta diplomové práce

Rok obhajoby: 2022

Autor/ka práce: **Monika Šteigerová**

Vedoucí práce: Doc. PharmDr. Iva Boušová, Ph.D.

Konzultant/ka: RNDr. Veronika Skarková, Ph.D.

Oponent/ka: RNDr. Miloslav Macháček, Ph.D.

Název práce: **Účinek flubendazolu na Glioblastoma multiforme in vitro a in vivo.**

Rozsah práce: 84 stran, 24 obrázků, 9 tabulek, 64 citací

Hodnocení práce:

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

Doporučuji diplomovou práci k uznání jako práci rigorózní

Případné poznámky k hodnocení:

Diplomová práce Moniky Šteigerové se zabývá komplexním hodnocením účinnosti dvou léčiv proti glioblastomu. Zatímco jedno léčivo se používá v klinické praxi, u druhého se tato aplikace dá předpokládat. Studentka prováděla celou řadu experimentů a jejich rozsah je nadprůměrný – zabývala se in vitro hodnocením, PCR, WB a in vivo modelem. Teoretická část je zpracována přehledně, podrobně a velmi čtivě. U části metodiky a výsledků mám drobné výtky a připomínky, a s tím související dotazy na místa, která nejsou zřejmě dostatečně popsána a nemohou tedy vést k dobré reprodukovatelnosti experimentů. I přes množství dotazů, mj. z důvodu nadprůměrného rozsahu a různorodosti experimentů a získaných experimentálních dat, hodnotím práci výborně a doporučuji ji k obhajobě.

Dotazy a připomínky:

Připomínky:

U popisu mechanismu účinku přeměny proléčiva temozolomidu a jeho mechanismu účinku by se hodilo toto uvést i názorně formou obrázku.

V metodice na str. 34 uvádíte, že EA.hy926 vznikly fúzí buněk linie A459 s primárními humánními buňkami pupečnickové venózní krve. Toto tvrzení je chybné ze dvou důvodů - i) jde o linii A549 a ii) jaké krevní buňky by to měly být (navíc aby se nacházely pouze v žilách)? Zřejmě jde o chybu překladu, protože správně jde o HUVEC, tedy lidské primární endotelové buňky získané z pupečnickových cév - proto se používají EA.hy926 jako dobře dostupný model endoteliálních buněk.

U Obr. 9 a 10 bych doporučil uvádět koncentrace od nejnižší k nejvyšší.

U Obr.14 a 15 na str.55 a 56 nedává moc smysl do jednoho grafu dávat vyšší koncentraci TMZ s nižší koncentrací FLU a do druhého nižší koncentraci TMZ a vyšší FLU. Nebylo by lepší toto prohodit, popř. obě podskupiny grafů v obr. 14 resp. 15 spojit do jedné skupiny grafů kde by byly obě koncentrace TMZ a obě koncentrace FLU?

Diplomantka prováděla in vivo experimenty, a výsledky z nich byly použity pro tuto diplomovou práci, z tohoto důvodu by mělo být v diplomové práci uvedeno číslo projektu pokusů.

1) V práci je uvedeno, že E-kadherin je součástí tight junctions. V jaké jiné struktuře/strukturách se v buňce E-kadherin nachází? Jaké jsou jeho funkce v buňce?

2) V práci uvádíte jako hlavní experimentální modely buněčné kultury a in vivo model nádoru. Taktéž jsou korektně uvedeny nevýhody in vitro kultur. Zatímco první bod negativ se v případě nádorových buněk může dít in vivo, druhé dva body jsou neoddiskutovatelným problémem. Existuje způsob, jak tyto dva aspekty v podmínkách in vitro obejít a přiblížit se více k in vivo prostředí i bez použití experimentálních zvířat?

3) i) Jako kultivační médium pro HCT-8 a EA-hy926 používáte DMEM suplementované mj. hydrogenuhličitanem sodným. Proč není použit také u linie U118MG (a zřejmě i GBM69)? Proč jste jej do média přidávali, a jaké jsou alternativy k jeho použití?

ii) proč u média pro linii U118MG není pyruvát a navíc obsahuje jen poloviční množství L-glutaminu v porovnání s médiem pro další immortalizované linie (HCT-8 a EA.hy926)?

iii) proč médium pro linii EA.hy926 neobsahoval HAT suplement (hypoxanthin, aminopterin a thymidin)?

iv) V jakém médiu byly kultivovány buňky GBM69? Šlo o stejné médium, jaké bylo použito k jejich oplachu? Pokud ano: Bylo RPMI médium pro linii GBM69 opravdu suplementováno pouze 15 obj.% FBS?

4) i) V postupu pro izolaci RNA uvádíte, že byly buňky kultivovány "ve sterilních kultivačních plochých kulatých miskách." Jak velké byly tyto Petriho misky a jaké byly počáteční koncentrace buněčné suspenze při nasazování experimentu?

ii) Bylo opravdu nutné lyzovat buňky TRIZOLEm 2 min? Proč jste následně TRIZOL slili?

iii) Uvádíte, že následně byl ke vzorku přidáno "stejně množství ethanolu, jaký byl objem vzorku" - jaký tedy byl objem vzorku?

5) Na straně 46 uvádíte: "V případě, že došlo k výraznému zhoršení zdravotního stavu, byla myš neodkladně usmrcena." Jak často se stávalo, že bylo z tohoto důvodu nutné myš usmrtit během růstu nádoru? Jaký byl důvod zhoršení zdravotního stavu?

6) Čeho jste chtěli dosáhnout kokultivací buněk HCT-8 a EA.hy926 pro s.c. aplikaci? Šlo o buňky kokultivované před s.c. aplikací v in vitro podmínkách s následnou aplikací, nebo jste míchali suspenze obou linií, kterou jste aplikovali a pak probíhala "kultivace" in vivo?

7) Proč jste pro "p.o." podání léčiv používali k ředění roztok methylcelulózy?

8) i) Jak je možné, že vám u experimentu s použitím U118MG linie a FLU vyšla statistická významnost pouze u koncentrace 2 a 1, zatímco u 3 a 0,5 ne?

- ii) V textu dále uvádíte, že nejúčinnější je koncentrace FLU 2, lze toto opravdu tvrdit?
- iii) Na Str.51 uvádíte, že byly stanoveny hodnoty IC50 – jak jste tyto hodnoty stanovili?
- 9) Na Obr.11 jsou vidět morfologické změny a snížení počtu buněk ve vzorku se stoupající koncentrací TMZ, což však nekoreluje s výsledky stanovení WST-1 na Obr.9. Jak si toto vysvětlujete?
- 10) Proč bylo pro stanovení morfologických změn použita koncentrace 500 u TMZ a 0,5 u FLU? (Následně použito i pro stanovení množství mRNA).
- 11) Na Obr. 20 na Str.60 uvádíte tři tumory vyrostlé na jedné straně myši. Toto byl záměr? Proč tomu došlo, když byla na každou stranu myši aplikována jedna dávka buněčné suspenze v jednom s.c. vpichu?
- 12) Na Str.62 Uvádíte úhyn jedné myši ze skupiny C Cituji: "Myš ze skupiny C, které byl podán FLU nepřežila, nejednalo se ale o úhyn z důvodu aplikace FLU." Jak víte, že nešlo o úhyn způsobený FLU?
- 13) Proč se tak významně liší velikost jednotlivých skupin (n=0 (??) až n=6)? - Tab. 6 a 7.
- 14) Proč jste zvolili pro porovnání "velikosti" nádorů hmotnost a ne objem? Navíc pokud je rozsah měřen v gramech s přesností na dvě desetinná místa a hmotnosti nádorů se pohybují v desítkách mg – nepřesnost měření.

hodnocení, práce je: výborná

k obhajobě: doporučuji

V Hradci Králové

28. května 2022

podpis oponenta/ky