

## Posudek disertační práce PharmDr. Barbory Vítovcové

Disertační práce „**Studium vlivu flubendazolu na buňky glioblastoma multiforme *in vitro* a *in vivo***“ zpracovává aktuální téma využití zavedeného léčiva pro jinou terapeutickou indikaci (drug repurposing). Studuje efekt anthelmintika Flubendazolu na buněčné linie a primární buněčné kultury odvozené z nádoru glioblastoma multiforme, nádoru mozku který je špatně léčitelný a prognóza pacientů je velmi nejistá.

„Drug repurposing“ významně zkracuje dobu schválení využití léčiva pro novou indikaci, proto je v současnosti častým nástrojem hledání nových terapeutických přístupů. Flubendazol patří do skupiny imidazolových derivátů, které jsou schváleny pro léčbu především parazitóz. Jejich mechanismus účinku, ovlivnění polymerace mikrotubulů, přímo vybízí ke studiu jejich vlivu na nádorové buňky.

Z formálního hlediska práce odpovídá požadavkům, je klasicky členěná, obsahuje pouze drobné formální nepřesnosti a minimum překlepů. Metody, které byly pro studium využity, považují za vhodně zvolené. Umožnily nejen základní screening cytotoxicity na jednotlivé buněčné linie, ale byly zaměřeny i na odhalení mechanismu účinku. *In vitro* experimenty na buněčných liniích byly doplněny i experimenty *in vivo* provedenými na myších. Výsledky dokumentují skutečnost, že se autorce podařilo dosáhnout vytyčených cílů a prokázat cytotoxický účinek flubendazolu nejen na buňky linií glioblastomu, ale i na primární kultury nádorových buněk pacientů a nádory u myší.

K práci mám několik formálních připomínek a dotazů:

Z formálního hlediska by bylo vhodnější psát 6jamkové (96jamkové) destičky jako 6-jamkové (96-jamkové).

Autorka v kapitole Materiál a metody uvádí „*Všechny experimenty na takto získaných primárních kulturách byly provedeny u buněk v nižším stupni subkultivací*“. Které pasáže kultur z nádorů pacientů byly v experimentech použity?

Obr. 9, 11, 12, 15 a 16 ukazují buňky po značení imunofluorescencí, obraz není typický, je to černobílý negativ?

Co přesně vyjadřují číselné hodnoty u jednotlivých bandů v obrázcích výsledků western blot analýzy – obr. 13, 14, 19-21?

Autorka v Úvodu zmiňuje špatnou biodostupnost a nerozpustnost Flubendazolu ve vodě, ale i možnost tuto dostupnost zvýšit. Mohla by uvést nějaké možnosti, jak biodostupnost a tím efektivitu léčby zvýšit? Jak je to s přestupem přes hematoencefalickou bariéru?

Je známo, že Flubendazol působí na nádorové buňky inhibicí polymerace mikrotubulů a také inhibicí progresu buněčného cyklu, což vede k zástavě buněčného cyklu na přechodu z G2 do M fáze. Autorka toto ve své práci potvrdila, navíc prokázala i vliv na expresi a na posttranslační modifikace, tyronizaci a acetylaci  $\alpha$ -tubulinu. Ovlivnění cyklinu B a CDK1. Jsou tyto efekty působeny Flubendazolem přímo, nebo jsou důsledkem jeho interakce s tubulinem? Můžete podrobněji vysvětlit mechanismus účinku Flubendazolu na nádorové buňky?

Zajímavé jsou výsledky ovlivnění transkripčního faktoru STAT3. Proč v průběhu kultivace roste exprese STAT3 i u neovlivněných kontrolních buněk a čím si autorka vysvětluje v podstatě opačnou reakci u buněk A172, kde hladina mRNA po účinku Flubendazolu roste a buněk T98G, kde klesá (obr. 18 a 19)?

Dvě studované buněčné linie, ale i linie z pacientů, reagovaly na Flubendazol rozdílně. Jsou alespoň u stabilních linií známé mutace, kterými by se rozdílnost reakce dala vysvětlit? Je obecně rozdíl v reakci kultur a primárních vzorků?

Na str. 18 je uvedeno: „*sekundární GBM je typický svou mutací genu TP53, což vede k ovlivnění jím kontrolované signální dráhy*“. P53 reguluje spoustu buněčných odpovědí, kterou dráhu má autorka na mysli. Jakým mechanismem předpokládá, že Flubendazol ovlivňuje p53?

Z výsledků práce PharmDr. Barbory Vítovcové je zřejmé, že vytyčené cíle i požadavky na disertační práci byly splněny. Předloženou disertační práci navrhuji k obhajobě a doporučuji, aby byl na základě úspěšné obhajoby PharmDr. Barboře Vítovcové dle § 47 Zákona o vysokých školách č. 111/98 Sb. udělen akademický titul doktor, ve zkratce Ph.D.

V Brně 8.8. 2023

prof. MUDr. Iva Slaninová, Ph.D.  
Biologický ústav Lékařské fakulty Masarykovy univerzity