

Tel: +420549496985 Fax: +420549491327 Web: <http://biology.med.muni.cz/> Email: [ipokorna@med.muni.cz](mailto:ipokorna@med.muni.cz)

**Věc: Posudek disertační práce Mgr. Kristýny Čáňové „Analýza růstově inhibičních mechanismů flubendazolu u buněk maligního melanomu“.**

Práce se zabývá vysoce aktuálním tématem využití již schválených léčiv k nové indikaci („repurposing therapy“). Tento postup významně zkracuje dobu schválení využití léčiva pro novou indikaci. Imidazolové deriváty, včetně flubendazolu, které jsou schváleny pro léčbu především parazitóz, patří mezi léky, jejichž přehodnocení by mohlo vést k vývoji nových cytostatik. Jejich antiproliferační aktivita, způsobená především vlivem na mikrotubuly a tím na dělení buňky, je známá a je možné očekávat účinek podobný, jako mají komerční cytostatika (vinblastin, vinkristin). Práce je zaměřena na efekt flubendazolu na buňky maligního melanomu, nádoru, který je v pokročilých stádiích rezistentní k dosud dostupné terapii. Hledání nových terapeutik na léčbu melanomu je velmi žádoucí. Experimenty byly provedeny na buněčných liniích maligního melanomu nesoucích mutace v různých genech a byly také získány linie z 5 pacientů s diagnózou melanomu a provedeny pilotní experimenty na jedné z těchto linií. Jako kontrolní nenádorové buňky byla použita linie melanocytů.

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. Za podstatnou považují skutečnost, že ve většině případů bylo použito více alternativních metod pro potvrzení daného účinku, např. při testování buněčné viability, metody WST metabolická assay, xCELLigance, časosběrná mikroskopie. Trochu mi chybí použití nějaké metody rozlišující živé a mrtvé buňky např. propidium iodid exclusion assay nebo značení trypanovou modří, což v práci částečně nahrazuje mikroskopie. Pro studium mechanismů účinku byly použity metody využívající western blot (WB) analýzu, studium aktivity kaspáz, mikroskopická vizualizace morfologie mikrotubulů, mitochondrií a lysozomů. Výsledky dokumentují skutečnost, že se autorce podařilo dosáhnout vytyčených cílů a prokázat cytotoxický účinek flubendazolu nejen na buňky melanomových linií, ale i na nádorové buňky pacientů s maligním melanomem.

K práci mám několik dotazů:

- 1) Po kolika hodinách inkubace s flubendazolem (FLU) byly stanoveny hodnoty  $IC_{50}$  (Str. 47)? Čemu autorka přičítá to, že buňky RPMI- 7951 jsou citlivější, dá se odvodit nějaký závěr z mutací, které obsahují?
- 2) Melanocyty vykazovaly pomalejší růst a nižší frekvenci dělení což mohlo ovlivnit jejich odpověď na FLU. Vypadá to, že buňky jsou spíš zastavené, než že by odumíraly (Str. 49 – 50 obr. 16,17). Zajímavé je, že se po 72-96 h se měnily zpět do původní podoby, znamená to, že FLU přestal účinkovat? Jak po této době reagovaly buňky melanomových linií? Dá se z toho vyvodit informace o dynamice účinku FLU?
- 3) Proč se autorka zaměřila na detekci S-fáze, když analýza buněčného cyklu ukazovala na zástavu v G2/M fázi? Jaké indikátory by použila pro průkaz zastavení v G2/M fázi?
- 4) Zajímavá je reakce p21, který autorka detekovala imunofluorescencí a který se choval podobně u všech linií. p21 je většinou regulován proteinem p53 a ten byl aktivován pouze u buněk A375. Může autorka zdůvodnit sledovanou reakci, jaké jsou možnosti regulace p21?
- 5) Má specifická subcelulární lokalizace p21 (cytoplazma vs. jádro) význam pro posouzení účinku FLU? Proč autorka nezvolila i detekci p21 WB analýzou?

6) V případě studia toxicity FLU na explantát z melanomu byly už buňky rostoucí v kultuře pouze melanocyty nebo kultura obsahovala i fibroblasty, pak by výsledek WST mohl být zkreslený vyšší odolností fibroblastů. Pokud byla stanovena  $IC_{50}$  u těchto buněk 1.42  $\mu M$ , nebylo by pro testování vhodné použít tuto nebo vyšší koncentraci FLU?

Z výsledků práce a z publikační aktivity Mgr. Kristýny Čánové (4 publikace v časopisech s IF, z nichž v jedné je první autorkou a 1 prvoautorská publikace v mezinárodním časopise bez IF) je zřejmé, že cíle a požadavky na disertační práci byly splněny a výsledky, prokazující efekt flubendazolu na buňky melanomu mohou být základem pro studie na úrovni zvířecích modelů a následně pro klinické studie.

Předloženou disertační práci navrhuji k obhajobě a doporučuji, aby byl na základě úspěšné obhajoby Mgr. Kristýně Čánové dle § 47 Zákona o vysokých školách č. 111/98 Sb. udělen akademický titul doktor, ve zkratce Ph.D.

V Brně 14.5. 2018

Doc. MUDr. Iva Slaninová, Ph.D.