

Oponentský posudek disertační práce PharmDr. Barbory Vítovcové

## **Studium vlivu flubendazolu na buňky glioblastoma multiforme in vitro a in vivo.**

Disertační práce Dr. Vítovcové shrnuje výsledky její výzkumné činnosti v oblasti využití anthelmintik, konkrétně flubendazolu v léčbě glioblastomů. Práce byla vypracována pod vedením profesora Emila Rudolfa a dr. Veroniky Skarkové na Katedře lékařské biologie a genetiky LFHK. Podkladem disertační práce je publikace vyšlá v Scientific reports, kde je Dr Vítovcová prvním autorem. Dále se k tématu disertační práce vztahují další dvě publikace (jeden prvoautorský přehledový článek a jedna spoluautorská původní publikace). Dr Vítovcová je rovněž spoluautorkou dalších 4 původních publikací a jednoho přehledového článku s impakt faktorem.

Cílem práce bylo na vybraných GBM buněčných liniích (A172, T98G) a primárních GBM kulturách získaných ze vzorků pacientů otestovat inhibiční účinek FLU in vitro a výsledky porovnat s účinkem TMZ. Studie pokračovala in vivo experimenty, ve kterých byla použita GBM linie U118MG. Sledoval se vliv FLU a TMZ na viabilitu, proliferaci a morfologii GBM buněčných linií A172 a T98G, vliv FLU na mikrotubulární cytoskelet a expresi tubulinů, vliv FLU na expresi a aktivaci molekuly STAT3, distribuci buněčného cyklu a aktivitu kaspáz u GBM buněčných linií A172 a T98G. V podstatě stejné experimenty byly pak provedeny s GBM primárními kulturami. Před in vivo experimentem byl posouzen vliv FLU a TMZ na proliferační schopnosti GBM buněčné linie U118MG in vitro a po její implantaci do atymických myší studován vliv FLU a TMZ na expresi tubulinů a expresi a aktivaci STAT3 u získaných nádorů.

Práce má klasickou strukturu, Po souhrnu v českém a anglickém jazyce následuje literární úvod (30 stran), zpracovávající poznatky o etiologii glioblastomu, jeho charakteristice a klasifikaci. Další část úvodu pak pojednává o struktuře a funkci mikrotubulů v GBM a látkách, které tuto funkci ovlivňují, a to včetně anthelmintik ze skupiny benzimidazolů. Úvod je vhodně doplněn pěti obrázky. Chybí mně schéma STAT3 dráhy, která by názorně ukázala, jaké důsledky může mít zvýšení nebo snížení její exprese. Na literární úvod navazují cíle práce, materiál a popis metodik, ze kterých vyplývá, že se dr. Vítovcová seznámila s izolací primárních kultur, kultivací buněk, zvládla molekulárně biologické techniky (transfekce buněk, WB, PCR), měření proliferace pomocí WST a RTCA, imunocytochemii a imunohistochemii, FACS a chemiluminiscentní analýzu, mikroskopii a obrazovou analýzu.

Výsledky, které navazují na metodiku, prokázaly, že všechny tři testované GBM buněčné linie vykazovaly výrazně vyšší citlivost k FLU než k TMZ, jejich hodnoty IC50 byly podobné dříve zjištěným hodnotám IC50 u rozličných druhů nádorových buněk. Rovněž citlivost primárních GBM kultur k FLU byla výrazně vyšší než citlivost k běžně využívanému TMZ, i když zde byl rozptyl mnohem výraznější (od 0,6 do 9,3uM). Vliv FLU byl mnohem výraznější u GBM linií než u primárních kultur u všech sledovaných parametrů (morfologie, buněk, polymerace mikrotubulů, inhibice STAT3). Pozitivním výsledkem je, že snížení exprese STAT3 bylo také potvrzeno u nádorů získaných z in vivo experimentů. Z této práce však jednoznačně vyplývá potřeba testů na primárních kulturách, která se nedá nahradit klasickými GBM liniemi, zejména pro obrovskou heterogenitu primárních nádorů. Dalším obecným potvrzením je, že

IC50 pro TMZ je u primárních kultur tak vysoké, že se pohybuje v klinicky nedosažitelných koncentracích a je až s podivem, že TMZ jako léčba vůbec funguje.

Dizertační práce je ukončena závěry, po které následuje seznam použité literatury (145). Po formální stránce je disertační práce zpracována pečlivě, výsledky jsou doplněné grafy a obrázky. Jediné, co je možné vytknout, jsou sestříhané WB, které by renomovaných časopisech prošly jen s obtížemi. Rovněž z popisu výsledků vyplývá, že v in vivo experimentech byly velké rozdíly v jednotlivých myších (exprese  $\alpha$  tubulinu, STAT3/pSTAT3), pro tento případ bývá dobré vynést do grafu kromě sloupečků i jednotlivé body, což činí grafy názornějšími.

Na dr. Vítovcovou mám následující otázky:

Neuvažovali jste o nějaké assay zaměřené na senescenci buněk, zejména primárních kultur?

Podle čeho jste vybírali primární kultury (kromě množství a růstu)? Někáká jejich charakteristika by se do metodiky hodila, aby bylo možné porovnat jejich markery se získanými výsledky, případně tam najít nějakou korelaci mezi jejich znaky a účinnosti FLU.

Zkoušeli jste, jestli by mělo společné podání TMZ a FLU nějaký synergický efekt?

Uvažujete do budoucna o „pasážování“ v myši, tj o izolaci nádorů z myši zpět do kultury a podívat se, jak se změnila vlastnosti těchto buněk proti primárnímu nádoru?

Myslíte si, že exprese STAT3 by měla smysl jako další marker v personalizované medicíně (jako je IDH, MGMT, EGFRvIII), nebo je to zatím předčasná úvaha.

Závěrem lze říci, že dizertační práce má význam pro další preklinické studie, které by posunuly využití anthelmintik v „drug repurposing“, výzkumu blíže do klinické praxe. Práci jednoznačně hodnotím kladně, oceňuji její aktuálnost. Dr. Vítovcová prokázala schopnost samostatné vědecké práce a po řádné obhajobě ji doporučuji udělit titul Ph.D. za jménem.

V Praze, dne 18.7. 2023

doc. RNDr. Pavla Jendelová, PhD