

**UNIVERZITA KARLOVA  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

Katedra farmakologie a toxikologie

Studijní program: Farmacie

**Posudek oponenta diplomové práce**

Rok obhajoby: 2024

Autor/ka práce: **Andrea Hotáryová**

Vedoucí práce: doc. PharmDr. Martina Čečková, Ph.D.

Konzultant/ka: PharmDr. Darina Muthná, Ph.D.

Oponent/ka: RNDr. Bc. Eva Novotná, Ph.D.

Název práce: **Vliv nového FLT3 inhibitoru na indukci buněčné smrti u leukemických buněk**

Rozsah práce: 55 stran, 19 obrázků, 10 tabulek, 49 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:              | výborné     |
| g) Myšlenková úroveň a rozsah diskuse výsledků:                | výborná     |
| h) Srozumitelnost, výstižnost a adekvátnost závěrů:            | výborná     |
| i) Splnění cílů práce:   | výborné     |
| j) Množství a aktuálnost literárních odkazů:                   | výborné     |
| k) Jazyková úroveň (stylistická a gramatická úroveň):          | výborná     |
| l) Formální úroveň práce (členění textu, grafické zpracování): | velmi dobrá |

Doporučuji diplomovou práci k uznání jako práci rigorózní

Případné poznámky k hodnocení:

Tématem diplomové práce je studium účinku nově syntetizovaného inhibitoru Flt3 kinázy s označením K1872 na leukemické buňky. Je známo, že akutní myeloidní leukémie patří mezi častá onkologická onemocnění u dospělých i u dětí. Téma práce je tedy velice aktuální. Teoretická část je zpracovaná přehledně a logicky. Obsahuje důležité informace potvrzující významnost diplomové práce. Ke splnění cíle bylo použito několik experimentálně odlišných metod. Autorka tak pracovala se třemi různými liniemi leukemických buněk lišícími se v expresi mutované či nemutované formy Flt3 kinázy, naučila se stanovit aktivitu kaspáz, mikroskopické techniky i techniku western blot. Výsledky práce jsou diskutovány a dány do souvislostí s informacemi již známými z odborné literatury, zejména těmi, které se týkají v klinické praxi používaného inhibitoru Flt3 kinázy midostaurinu. Lze předpokládat, že získané výsledky pomohou v dalším výzkumu nejen sloučeniny s označením K1872, ale i dalších inhibitorů Flt3 kinázy.

Dotazy a připomínky:

Připomínky:

- 1) Práce obsahuje některé typografické chyby. Jedná se např. o psaní rozsahu mezi čísly (místo spojovníku by měla být použita pomlčka bez mezer mezi čísly), jednoznakové předložky a spojky na konci řádků a nesprávné rozdělování slov na koncích řádků (r+elabující na str. 24, 100  $\mu$ +l na str. 28). Citace by bylo vhodnější vkládat za jednotlivé odstavce, nikoliv až za delší části textu. Názvy vědeckých časopisů v seznamu použité literatury jsou uváděny někdy ve zkráceném tvaru, jindy je jejich název celý.
- 2) Buňky byly kultivovány, nikoliv uchovávány v kultivačním médiu RPMI-1640 (str. 26). Elektroforéza slouží k rozdělení proteinů, nikoliv ke stanovení jejich exprese (str. 32).
- 3) V případě techniky western blot by bylo vhodné uvést katalogová/objednávací čísla nebo jinak více specifikovat také sekundární protilátky. V práci je uveden pouze jejich výrobce (DAKO). Pokud v případě stanovení  $\beta$ -aktinu byla následně použita sekundární protilátka, bylo by dobré tuto informaci také zmínit. Dále by bylo vhodné uvést o který konkrétní kit se jednalo v případě roztoku ECL (Roche). Je uvedeno, že byl připraven roztok smícháním složek 1:100. Z popsaného postupu není jasné, která složka byla 1 a která 100.
- 4) Metodika přípravy roztoků není zcela jednoznačně popsána. Je uvedeno, že z 1 mM roztoku testovaného inhibitoru K1872 byly připraveny roztoky o koncentracích 1–50  $\mu$ M. Dle postupu se ale jedná o koncentrace finální (tedy koncentrace K1872 v jednotlivých jamkách kultivační destičky případně v kultivační lahvičce, nikoliv koncentrace získané smícháním inhibitoru s kultivačním médiem dle tabulek 1, 3 a 5).

Dotazy:

- 1) V úvodu je uvedena informace, že doba přežití pěti let je pouze u 30 % nemocných AML (NCI 2023). V dalším odstavci ale následuje informace, že pětileté přežití se týká pouze 20 % pacientů (Park et al., 2010). Vysvětlíte prosím tuto nesrovnalost.
- 2) Uvádíte, že v případě gilteritinibu mají z léčby větší benefit pacienti, kteří v minulosti užívali jiný Flt3 inhibitor. Dle mého názoru by si tato informace zaslouhovala větší vysvětlení. O jakou klinickou studii se jednalo (případně číslo studie)? Kteří pacienti byli do studie přijímáni? Která konkrétní léčiva byla kromě gilteritinibu v rámci studie testována?
- 3) Které pacienty je možné označit za „křehké (frail)“? Je zde vždy souvislost s věkem? Které další faktory mohou být významné, abychom pacienta označili jako „křehkého“?
- 4) Dle postupu uvedeného v bodě 5.3.1 by koncentrace DMSO v případě 50  $\mu$ M finální koncentrace inhibitoru měla být 0,5 %. Testovali jste vliv 0,5% DMSO na leukemické buňky? 50  $\mu$ M koncentrace K1872 byla v jednotlivých experimentech vyhodnocena jako statisticky signifikantní. Mohl by 0,5% DMSO ovlivňovat experimenty prováděné v rámci diplomové práce?
- 5) Je 24hodinová kultivace dostačující pro stanovení exprese na úrovni proteinu?
- 6) Na obrázku 12 je kalibrační křivka pro výpočet obsahu proteinů ve vzorku pomocí BCA metody. Jaká byla nejvyšší koncentrace standardu používaná pro toto měření? Ověřte prosím, zda jsou hodnoty a případně i jednotky na ose X skutečně uvedeny správně.
- 7) 50  $\mu$ M koncentrace inhibitoru K1872 je relativně vysoká. Na základě čeho byly pro testování vybrány koncentrace inhibitoru 1–50  $\mu$ M? Existují nějaké predikce či pilotní studie týkající se koncentrace tohoto inhibitoru v plazmě, případně přímo hodnoty  $c_{max}$ ?

**hodnocení, práce je: výborná**

**k obhajobě: doporučuji**

V Hradci Králové

27. května 2024

podpis oponenta/ky