

**UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

Katedra biochemických věd

Studijní program: Zdravotnická bioanalytika

Posudek oponenta bakalářské práce

Rok obhajoby: 2021

Autor/ka práce: **Ingrid Hlbočanová**

Vedoucí práce: RNDr. Miloslav Macháček, Ph.D.

Konzultant/ka: Mgr. Marie Halašková

Oponent/ka: Mgr. Petra Kollárová

Název práce: **Experimentálne stanovenie fotodynamickej účinnosti derivátov ftalocyanínov a stanovenie bunkovej smrti**

Rozsah práce: 79 stran, 32 obrázků, 0 tabulek, 64 citací

Hodnocení práce:

- | | |
|--|-------------|
| a) Odborná úroveň a zpracování teoretické části: | velmi dobrá |
| b) Náročnost použitých metod: | výborná |
| c) Zpracování metodické části (přehlednost, srozumitelnost): | výborné |
| 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: | velmi dobrá |
| 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:

Tato bakalářská práce je experimentální prací, ve které studentka hodnotila in vitro dva fotosenzitizéry (azaftalocyanin P39 a ftalocyanin P41) připravené skupinou prof. Zimčíka. Určitě bych vyzdvihla to, že tyto látky byly hodnoceny komplexně - byla stanovena fototoxicita látek v různých protokolech (inkubace před ozáření 0, 4 a 12 h) a na několika různých buněčných liniích, zároveň byla na buněčné linii HeLa určena i subcelulární lokalizace látek a způsob buněčné smrti. Oceňuji i množství, kvalitu a grafické zpracování získaných výsledků. Stanovené cíle práce byly beze zbytku splněny. Studentka také na experimentální práci cituje až nadprůměrně velké množství literatury.

Dotazy a připomínky:

Připomínky:

Jelikož je uchazečka Slovenka a bakalářská práce je psána ve slovenštině, nemůžu plně hodnotit gramatickou správnost práce, nicméně i přesto tato práce (zejména v teoretické a diskusní části) obsahuje poměrně velké množství překlepů a chyb (především se často

vyskytovaly chybějící mezery mezi dvěma slovy nebo záměny písmen uprostřed/v koncovkách slov).

Doporučila bych také sjednotit používání zkratk PS/PSs a Pc/Pcs - jejich použití v textu není jednotné a často je u množného čísla použita zkratka pro číslo jednotné. Dále např. zkratka DLI nebyla v abstraktu ani v legendách obrázků vysvětlena.

V teoretické části, v obou verzích abstraktu, a dále pak v diskusi se vyskytovaly věty, které by si rozhodně zasloužily přeformulovat, aby byly srozumitelnější a přesněji vystihovaly svůj význam - např. "V porovnání so študovanou látkou P39, ktorá má hodnoty o niečo vyššími ako P41, sa obe látky ukázali ako účinné porovnaním na bunkových líniiach MCF-7, HCT-116 a EA.hy926.", nebo bylo použito několik slov vyjadřujících totéž - např. "Pre zabezpečenie maximálnej účinnosti, efektivity PDT a maximalizácii výsledku". Překlady několika vět z originálních článků působily i úsměvně - např. "Medzi najbežnejšie úpravy makrocyklu Pc patrí zavedenie skupín rozpúšťajúcich vodu" nebo "dýchania rastlín a iných živočíchov".

Teoretická část byla na první pohled členěna přehledně a srozumitelně, při podrobnějším přečtení se ale informace v některých částech až nadměrně opakovaly (např. 3 hlavní komponenty PDT byly opakovány téměř na začátku každé podkapitoly). Chyběl mi zde i podrobnější popis/vysvětlení obrázků v legendě nebo v textu a u většiny obrázků i odkazy na ně v textu. Dále obrázek 4 a 5 v podstatě ukazují to samé jen trochu jinak, stačilo by tedy použít jen jeden z nich a podrobněji ho vysvětlit.

V experimentální části mě velmi zaujala metoda stanovení typu buněčné smrti pomocí sledování luminiscence (u apoptózy) a fluorescence (u nekrózy) v čase. Jen mi u jejího popisu chyběly uvést látky a koncentrace, které byly použity jako pozitivní kontroly (tato informace se však nacházela později v popisu obrázků). Také jsem nikde nenašla, jestli byla destička ozařována ihned po přidání studovaných látek nebo jak dlouho byly buňky inkubovány s fotosenzitizéry před začátkem stanovení.

Ve výsledkové části mi u subcelulární lokalizace látek chybělo okomentování získaných výsledků - na začátku byl popsán mikroskop (což by patřilo spíš do metodické části) a následovaly pouze obrázky s legendami, které popisovaly, co zobrazují jednotlivé fluorescenční sondy. Avšak to, kde se studované látky v buňce nacházely nebylo ve výsledcích nikde zmíněno. U legend obrázků 26 a 27 ještě vznikla chyba při kopírování, kdy tam zůstalo uvedeno, že se jedná o vlastní fluorescenci látky P39, přičemž se jedná o látku P41 a ještě zde mohlo být pro upřesnění připsáno, že se jedná o 12 h inkubaci s fotosenzitizérem.

Drobnou připomínku bych měla i k popisu os grafů - je zde totiž použit anglický způsob zápisu čísel s tečkou (např. 0.01) místo českého s čárkou (0,01) a u obrázků 28-31 jsou ponechány i popisy os y v angličtině (např. "normalized luminiscence").

V diskusi bych ještě upozornila, že u látky P39, DLI = 0 h, u linie EA.hy926 je u EC50 = 16,37 μM řečeno, že se jedná o koncentrace neúčinné, přitom o několik vět dříve je u linie HeLa u podobné EC50 = 13,99 μM uvedeno, že má nízký účinek - tyto věty si tedy protirečí.

A mou poslední připomínkou je, že u citací v textu např. "Vo svojej štúdii sa Makhseed et al., 2012 venoval" by měl být rok uveden v závorce.

Dotazy:

1) V obrázcích 12, 15 a 16 byla testována fototoxicita látky P39 na buněčné linii HeLa a EA.hy926. Z obrázků plyne, že limit rozpustnosti (v SCM) byl 1 μM . Jak jste tedy docílili toho, že bylo dle obrázků 12 a 16 možné testovat koncentrace až do 20 μM ? A byla zkoumána u obrázku 15 i koncentrace 5 μM , jak vyplývá z grafu? V textu nad obrázkem je totiž uvedeno pouze rozmezí 0,01 - 1 μM .

2) U metody na stanovení způsobu buněčné smrti není přesně uvedeno, jestli a jak dlouho byly fotosenzitizéry inkubovány s buňkami před ozáření - způsob ozařování ze spoda naznačuje spíše, že k ozáření došlo ihned po přidání látek, prosím tedy o upřesnění.

3) V obrázcích 31 a 32 je pro stanovení způsobu buněčné smrti použita u látky P39 koncentrace 0,2 μM a u látky P41 koncentrace 0,1 μM - chybí mi zde vysvětlení proč byly zvoleny právě tyto koncentrace? A nemohly být tyto koncentrace pro sledování případné apoptózy příliš vysoké?

4) Studentku bych také poprosila, zda by mohla lépe okomentovat následující tvrzení z diskuse: "Študované amfifilné kationické deriváty 9 a 10 v práci Kollar et al., 2020 preukázali pri PDT na HeLa bunkách $\text{EC}_{50} = 38 \text{ nM}$, s podobnými hodnotami stanovenými na bunkách MCF-7 a HCT-116 v čase 12 h. V porovnaní s našimi derivátmi sa ukázala látka P41 ako účinnejšia, aj keď dosahovala hodnoty vyššie." - Skutečně měly obě látky EC_{50} přesně 38 nM, jak naznačuje znak rovnosti? A bylo by možné lépe formulovat tu poslední větu, aby bylo jasné, co si z ní má čtenář odnést?

5) V závěrech práce studentka uvádí, že nejlepších výsledků bylo dosaženo při inkubační době buněk se studovanými fotosenzitizéry po dobu 4 hodin před ozáření. Většina látek, které byly zmíněny v diskusní části byla s buňkami inkubována 12 h, co Vás tedy vedlo k použití intervalu 4 h (kromě klasických 12 h)? Bylo to na základě hodnocení uptake látek do buněk?

hodnocení, práce je: výborná

k obhajobě: doporučuji

V Hradci Králové

28. května 2021

podpis oponenta/ky