



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Děkanát, Hněvotínská 3, 779 00 Olomouc

V Olomouci 4.března 2022

Zápis o konání obhajoby disertační práce v oboru Lékařská biologie

Mgr. Zlata Hušková, odborná pracovnice v laboratorních metodách Ústavu klinické mikrobiologie FN Hradec Králové, studentka kombinované formy doktorského studijního programu *Lékařská biologie* na LF UP v Olomouci

Téma práce: „**Biomarkery, tekutá biopsie a studium steroidních derivátů u karcinomu prostaty**“

Obhajoba se konala v Olomouci dne 4. března 2022 v 13:30 hod.

Komise:

předseda: doc. RNDr. Vladimír Divoký, Ph.D. ✓
místopředsedkyně: doc. Mgr. Monika Horváthová, Ph.D. ✓
členové: prof. Mgr. Martin Modrianský, Ph.D. ✓
doc. RNDr. Sabina Ševčíková, Ph.D. ✓
Mgr. Zuzana Chyra, Ph.D. ✓
doc. Mgr. Pavel Bouchal, Ph.D. *omluven*
MUDr. Michal Grepl, Ph.D. ✓

Oponenti:

MUDr. Michal Grepl, Ph.D. ✓
Urologická klinika FN Ostrava
prof. MUDr. Jiří Drábek, Ph.D. ✓
Laborař experimentální medicíny ÚMTM LF UP v Olomouci

Školitel: Mgr. Jana Steigerová, Ph.D. ✓

Předseda komise přednesl stručnou charakteristiku uchazeče, hodnocení školitele a vedoucího školicího pracoviště. Poté uchazeč vyložil podstatný obsah své disertace. Oponenti přednesli své posudky. Ve vědecké rozpravě vystoupili: viz příloha – zápis o diskusi.

Hlasování se účastnilo 6 členů komise. Kladně hlasovalo 6 členů, záporně 0 členů, neplatných lístků bylo odevzdáno 0.

Usnesení:

Přítomní členové komise tajným hlasováním rozhodli, že **Mgr. Zlata Hušková** obhájila/neobhájila* disertační práci a doporučili/nedoporučili* udělení akademického titulu doktor ve zkratce Ph.D. dle § 47 Zákona o vysokých školách č. 111/98 Sb.

.....
doc. RNDr. Vladimír Divoký, Ph.D.
předseda komise

*nehodící se škrtněte

5. Použila jste pro měření cytotoxicity MTT test. Jak vidíte zpětně výhody/nevýhody MTT testu ve srovnání s jinými testy cytotoxicity, například s CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay nebo RealTime-Glo™ MT Cell Viability Assay?

Odpověď: **MTT test** je cenově a časově dostupný, spolehlivý, měření absorbance probíhá na Elisa readeru. Test byl hlavně zvolen z důvodu použití stejné metody, kterou byla skupina látek testována i u prof. Wichy v Polsku, se kterým píšeme společnou publikaci.

CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay je detekce je založená na využití reakce luciferasy pro měření počtu ATP ze životaschopných buněk. CellTiter-Glo® Reagent lyzuje membrány buněk a uvolňuje ATP; inhibuje endogenní ATPasy; zajišťuje luciferin, luciferasu a jiná činidla nutná pro měření ATP s využitím bioluminiscenční reakce.

RealTime-Glo MT Cell Viability Assay - Reagent obsahuje NanoLuc luciferázu a upravený substrát, který difunduje přes membránu do buňky. Pokud je buňka metabolicky aktivní, substrát je v cytoplazmě redukován na NanoLuc substrát a po uvolnění zpět do média je ihned zpracován a generuje se bioluminiscence úměrná počtu viabilních buněk v daný moment.

MUDr. Michal Grepl, Ph.D.

1. Zajímalo by mě, jde-li číselně vyjádřit počet pacientů „ušetřených“ od biopsie prostaty a naopak počet „uniklých“ karcinomů při použití kombinace AMARC, PCA3 a % volného PSA, jak je zmiňováno v závěru práce, proti běžným indikačním pravidlům diagnostiky karcinomu prostaty. Jaká by byla vhodná cut off hodnota, kdo by byl indikován k biopsii a komu by byla biopsie odsunuta.

Odpověď: Model založený na PCA3, AMACR a procentu volného PSA významně odlišoval karcinom prostaty od benigní hyperplazie ($p < 0,001$). Důležité je, že identifikoval 65 % potenciálně agresivních karcinomů prostaty, zatímco pouze 10 % mužů s BPH bylo špatně klasifikováno. Na druhou stranu 51 % mužů s BPH se může podle tohoto modelu vyhnout biopsii, přičemž pouze 6 % potenciálně agresivních CaP by bylo vynecháno. Tyto výsledky však musí být ověřeny na větší kohortě, protože % volného PSA bylo k dispozici pouze u poloviny pacientů v této studii. Hraniční hodnoty (cut-off) byly vybrány podle nejlepšího rozdělení rizikových skupin BPH a CaP a stanoveny na 37 % (mezi slabými a indiferentními skupinami) a 18 % (mezi indiferentními a silnými skupinami) pravděpodobnosti diagnózy rakoviny.

Otázky vědecké rozpravy:

Doc. RNDr. Sabina Ševčíková, Ph.D.: Na jakém principu jste zachytávali CTC buňky? Měřili jste čistotu těchto buněk? Jaká byla výtěžnost a jaký byl objem periferní krve od pacientů? Proč jste nezvedli objem krve od pacientů?

Odpověď: Buňky CTC jsme izolovali pomocí kitu RosetteSep (STEMCELL) na principu negativní selekce. Měřili jsme pouze koncentraci vyizolované RNA na Nanodropu. Záchyt CTC buněk byl velmi nízký, pravděpodobně kvůli jejich nízkému počtu v krvi. Pacientům byla odebrána jedna zkumavka krve (7,5 ml). Odběr většího objemu krve by mohl být pro onkologické pacienty komplikovanější.

Doc. RNDr. Sabina Ševčíková, Ph.D.: Můžete vysvětlit, co znamená senzitivita a specificita u grafu kombinovaného modelu?

Odpověď: Senzitivita je úspěšnost, s níž test zachytí přítomnost sledovaného stavu. Specificita vyjadřuje schopnost testu vybrat případy, u nichž zkoumaný znak nenastává.

Doc. RNDr. Sabina Ševčíková, Ph.D.: Jakou endogenní kontrolu PCR jste používali a na co to bylo normalizováno?

Odpověď: Geny byly normalizovány na housekeeping gen KLK3.

Doc. RNDr. Sabina Ševčíková, Ph.D.: Našli jste ve svém souboru moč zdravého muže s nízkou hladinou PSA?

Odpověď: Moč od zdravého jedince jsme neměli k dispozici.

Prof. Mgr. M. Modrianský, Ph.D.: Mohou být u tekuté biopsie přítomny i normální buňky, kromě krevních buněk a buněk cirkulujících nádorových?

Odpověď: Normální buňky po uvolnění ze svého okolí podléhají buněčné smrti – anoikis a v krevním řečišti, kde jsou navíc imunitní buňky, by dlouho nepřežily.

Prof. Mgr. M. Modrianský, Ph.D.: Nedocházelo k vysrážení testovaných látek kardenolidů v mediu při testování cytotoxicity na buněčné nádorové linie?

Odpověď: My jsme nic podobného nezaznamenali. To by byla otázka vhodná pro organické chemiky.