

Oponentský posudek diplomové práce Bc. Tomáše Hubky

Název práce: Verifikace testovacího zařízení pro *in vitro* test kožní penetrace jako alternativní test toxicity

Autor práce: Bc. Tomáš Hubka

Akademický rok: 2018-2019

Oponent: MUDr. Lenka Kotingová, Ph.D., Univerzita Karlova, Lékařská fakulta v Hradci Králové, Šimkova 870, 500 03 Hradec Králové

Předmětem diplomové práce bylo nejprve zpracovat krátkou literární rešerši na oblast analýzy látek s různou schopností penetrovat kůži, pozornost věnovat i možným biologickým materiálům vhodným pro tyto testy. V praktické části práce měly být porovnány dva typy difúzních komůrek za použití vhodných penetračních membrán z hlediska přesnosti metody. Výsledky měly být vhodným způsobem zpracovány, diskutovány a měl být navržen vhodný biologický model pro ověření testovacího zařízení pro *in vitro* test kožní penetrace.

Teoretická část diplomové práce představuje důvody pro využití testování kožní absorpce *in vitro*, shrnuje základní legislativu týkající se dané oblasti. Podává přehled o principu testování, používaných zařízeních, přípravě scénáře testů, možných testovacích membránách a kontrole jejich integrity, podmínkách testu a uvádí pokyny k základnímu matematickému zpracování výsledků. Bližší pozornost je následně věnována přehledu různých metod stanovení testovaných látek a validaci analytických metod.

V praktické části diplomové práce jsou nejprve představeny přístroje a zařízení potřebná pro provedení testů, uvedeny použité chemikálie s popisem přípravy roztoků a je popsána validace analytické metody HPLC. Poté jsou popsány testy penetrace kůže – kontrola těsnosti difúzních komor, příprava kožních preparátů, stručně popsán princip experimentů a hodnocené proměnné v testech (porovnání dávkování testované látky, vliv obsluhy, přítlačného systému, přesnosti dávkování testovací látky a přesnosti odběru vzorků).

Výsledky a diskuse jsou sloučeny do jedné kapitoly. Nejprve jsou uvedeny výsledky validace HPLC analýzy (linearita, opakovatelnost nástřiku, správnost metody, limit detekce a stanovitelnosti) s použitými matematickými vzorci. Potom jsou uvedeny výsledky testování typu difúzních komor, použití různých typů membrán (Strat-M, prasečí a lidská kůže), vlivu dávkování testovací látky, vlivu obsluhy, vlivu přítlačného systému, stanovení přesnosti dávkování testovací látky, přesnosti odběru vzorků, těsnosti difúzních komor.

Závěr shrnuje provedené práce a jejich výsledky a konstatuje, že vzhledem k problému s netěsností difúzních komor nelze splnit požadavek na navržení vhodného biologického modelu pro *in vitro* testování.

V diplomové práci je použito 53 literárních zdrojů. Citace jsou vhodně zpracované, počet literárních zdrojů je dostatečný, zdroje jsou aktuální.

K předložené práci mám následující námitky, dotazy a náměty k diskusi:

- Nedostatečná kontrola gramatiky – např. organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj, Transepithetal (v Seznamu zkratk a značek), ... se testovali difúzní komory..., ...komory se ověřovali... (str. 54)
- Str. 21 – jaký je rozdíl mezi „rozdělenou“ a „dermatomovanou“ kůží? Dle uvedeného popisu (a mého názoru) se jedná o totéž.
- Str. 22 – mezi náhradami kůže je zmíněna pouze Strat-M (použitá v experimentální části práce) a Xederma (určena ke krytí kožních defektů, nikoliv pro in vitro testování; ani nebyla použita v experimentální části, což by případně mohlo být důvodem jejího uvedení zde). Možných náhrad však existuje v současné době více, např. jsou zcela opomenuty uměle vytvořené modely lidské kůže (např. EpiSkin, EpiDerm, SkinEthic, Holoderm apod.), které se již mohou používat pro hodnocení kožní iritace a koroze in vitro (OECD Guideline 431, 435, 439) a jejichž uvedení v rešerši bych předpokládala.
- Str. 29 – Aplikace testované látky – popsána je pouze „konečná dávka“, i když v experimentální části práce byla též použita „nekonečná dávka“.
- Str. 29 – Odběry vzorků – v práci je psáno, že „frekvence odběrů by měla dovolit grafické prezentování naměřených výsledků“. Frekvence odběrů by ale měla ukázat průběh absorpce, umožnit výpočty parametrů absorpce a zachovat tzv. sink condition – udržet koncentraci testované látky v akceptorové tekutině pod 10 % (dle různých autorů až 30 %) její možné maximální rozpustnosti v daném médiu.
- Str. 31 – Testovací látky – v zadání diplomové práce je požadavek na „krátkou literární rešerši na oblast analýzy látek s různou schopností penetrovat kůži“. Chybí popis, proč byly vybrány právě tyto látky a pouze zde uvedené metody (HPLC a spektrofotometrie)? Proč není v rešerši zmíněno použití radiačně značených látek?
- str. 39 – mezi uvedenými roztoky je „testovací roztok kofeinu o koncentraci 4 g/l“ a „zásobní roztok kofeinu o koncentraci 1 g/l“ – proč má zásobní roztok nižší koncentraci než testovací?
- Str. 40 – „Kalibrační roztoky CS4 a CS3 byly připraveny rozředěním zásobního roztoku do ...“ – o roztok jaké látky se jedná? Autor ví, že používal kofein, ale popis metodiky má umožnit nezúčastněné osobě zopakovat v odborném textu publikovaný experiment. Stejnou námitku mám i proti popisům ostatních provedených testů – není zde uvedeno, která látka byla testována, metodiky postupu provedení experimentů jsou nejasné, nepřesné.
- Str. 41 – „...Tímto postupem byly připraveny tři zásobní roztoky. Každý z těchto roztoků byl rozředěn do odměrné baňky o objemu 100 ml na požadované koncentrace.“ – Proč tři zásobní roztoky? Rozředěny na jaké požadované koncentrace?
- Str. 41 - „připraven ze zásobního roztoku“ – kterého? Jedná se roztok popsáný v předchozím odstavci, nebo jde o zásobní roztok uvedený v kap. 2.3
- Str. 43 – „Každá difúzní komora byla naplněna akceptorovou kapalinou“ – Jakou? Kde je specifikováno její složení? Totéž platí k popisům dalších testů dermální absorpce – i když lze předpokládat stejnou akceptorovou tekutinu, opět nikde není popsáno její složení. V předložené diplomové práci je pouze v kap. 1.3.9 napsáno, že jako akceptorová tekutina je převážně používán fyziologický roztok, jsou popsány i jiné roztoky, ale nikde se nevyskytuje informace o složení akceptorové tekutiny používané v experimentech prováděných autorem diplomové práce.
- Str. 44 – „Porovnání vlivu obsluhy na výsledek experimentu“ – Jaký experiment? S kofeinem? S metylenovou modří? S přesností dávkování nebo odběrů? Nikde není popsán.

- Str. 45 – bod 2.5.8 popisuje problém s netěsností difúzních komor, kvůli čemuž byla vyrobena „experimentální“ klema. V čem byl problém s původní klemou, jak vypadala? Jak vypadá experimentální klema? Bylo by vhodné sem vložit jejich obrázky a popsat rozdíly...
- Str. 46 – opět chybí informace o kalibrační roztok čeho se jedná
- Kapitola 3 má název VÝSLEDKY A DISKUZE – podkapitola 3.1 Validace (není uvedeno o jakou validaci se jedná, z následujícího textu se nechá usuzovat na validaci použité HPLC metody) uvádí pouze výsledky, žádný z uvedených bodů není diskutován, tzn. porovnán s tím, co uvádí dosavadní vědecká teorie a praxe, diskuse by měla končit potvrzením nebo nepotvrzením původní hypotézy.
- Str. 48 a 50 – Použité vzorce jsou součástí metodiky experimentální práce, v kapitole VÝSLEDKY A DISKUZE by měly být prezentovány výsledky získané při jejich použití.
- Str. 51 – bod 3.2.2 Souhrnné výsledky – čeho? Zcela zde chybí text. V tabulce, která by měla mít doprovodný charakter k textu, není specifikováno, o co se jedná – jaké testy, dávka čeho, co vyjadřují flux a lag time (průměry získaných výsledků?)
- Str. 53 – na celé stránce je pouze jeden graf zaujímající cca třetinu stránky.
- Str. 52 - 69 – jsou zde opět prezentovány pouze výsledky, případně popsány problémy, které se při provádění experimentů vyskytly. Dané výsledky nejsou diskutovány, tj. porovnány se stávajícími známými informacemi (prováděl někdo jiný tyto nebo podobné experimenty?; měl nějaký jiný autor podobné problémy?).
- Str. 68 – Zde publikované obrázky nepovažuji za vhodně zvolené. Difúzní komůrky jsou schované za potiskem kádinek (zejména na obr. 13, kde není vůbec vidět použité klemy). Na netěsnosti by měla ukazovat změna barvy tekutiny v kádinkách, což vzhledem k nejednotné barvě pozadí za jednotlivými kádinkami je velmi těžko hodnotitelné. Homogenní bílé pozadí by bylo mnohem vhodnější.
- Str. 74 – zdroj č. 22 – literární zdroje mají být veřejně dohledatelné, což tento zdroj nespĺňuje
- Str. 80 - Poslední kapitolou diplomové práce jsou přílohy. Bohužel ani jedna z nich není zmiňována v textu diplomové práce, čímž ztrácí důvod svého uvedení zde. Tyto přílohy však uvádí důležité výsledky experimentů – jedná se o hodnoty absorpce testované látky v různých typech experimentů s vypočtenými parametry absorpce (flux, lag time) spolu se statistickým hodnocením a je velká škoda, že tyto informace nejsou zpracovány v textu.

Shrnutí

Diplomová práce je celkem srozumitelně a přehledně sepsána, vykazuje však výše zmíněné formální nedostatky. Použité přístupy řešení problémů jsou odpovídající a nelze nic namítat proti interpretaci výsledků. Bohužel chybí jejich porovnání s výsledky dosavadní vědecké teorie a praxe.

Dle mého názoru Bc. Tomáš Hubka splnil předpoklady pro úspěšné přijetí diplomové práce.

Diplomovou práci doporučuji k obhajobě a hodnotím známkou C.

V Hradci Králové 17. května 2019

MUDr. Lenka Kotingová, Ph.D.