



POSUDOK K DIPLOMOVEJ PRACI

“Optimalizace (pro)enzymové terapie rakoviny”

Autorka: Bc. Lucie Kalferstová

V diplomovej práci sa autorka zaobera problematikou enzymovej a proenzymovej terapie s využitím dvoch mysacích nádorových modelov. Ciele diplomovej práce spočívali v charakterizácii proteazových inhibitorov v sere zdravých myši a myši s nádormi, s možnosťou využitia poznatkov pri aplikácii enzymovej terapie, biochemickej analýzy dynamiky aktivovaného $\alpha 2$ -makroglobulinu a štúdiu a optimalizácie aplikácie enzýmov za účelom zlepšenia terapeutického efektu.

Praca má prehľadne spracovanú teoretickú časť, v ktorej autorka postupne a plynule prechádza od definície nádorov a vzniku nádorového ochorenia cez definíciu a historické aspekty vzniku (pro)enzymovej terapie. Rozsah diplomovej práce je značný a využíva veľké množstvo pokusných zvierat, nevyhnutný k objektívnemu zhodnoteniu tak komplexnej problematiky, akou je enzymová terapia. Experimentálna časť a výsledky sú členené prehľadne a jednotlivé medzivýsledky sú vhodne zakončené diskusiou priamo v experimentálnej časti. V záverečnej časti práce a diskusii autorka hodnotí dosiahnuté výsledky a podáva vysvetlenie k možným efektom, ktoré spôsobili odchyľky od pôvodne stanovených vedeckých hypotéz.

Pracu hodnotím veľmi pozitívne zo všetkých hľadísk – vytyčených hypotéz, experimentálnej realizácie samotného projektu a voľby kontrolných skupín. Rovnako pozitívne hodnotím aj fakt, že diplomová práca nebola realizovaná len na úrovni *in vitro* testovania a tážisko práce bolo v *in vivo* sledovaní spomínaných efektov na živých organizmoch. Táto stratégia ide ruka v ruku s problémami, vyplývajúcimi z komplexnosti živého organizmu, na druhej strane však predstavuje lepší modelový systém, bližší skutočnej realite. Ako experimentálny model boli zvolené dve veľmi agresívne formy nádorov – sarkom a melanóm. Skutočnosť, že sa podarilo dokázať priamy vplyv skumaných enzymových terapií na veľkosť nádoru pri takto agresívnych formách len podčiarkuje jej možný potenciál.

Samotný záver a diskusia predstavujú objektívny pohľad na dosiahnuté výsledky. Zaujímavým výsledkom je zistenie maximalnej efektivity intraperitoneálnej aplikácie enzymovej a proenzymovej terapie. Praca svojimi experimentálne overenými závermi môže byť dobrým odrazovým mostikom pre dizertáciu.

K práci nemám nijaké zásadne pripomienky, drobné preklepy (napr. modulárny melanóm namiesto nodulárny, atď.) a nepresnosti nijako neznížia úroveň predkladanej diplomovej práce, ktorú hodnotím ako **vybornu**.

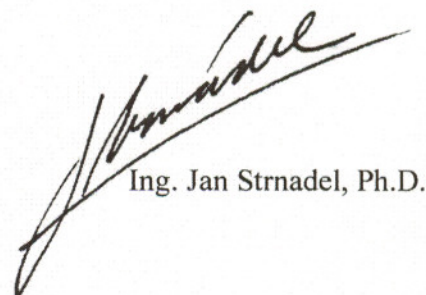
Otázky do diskusie:

- 1.) (Odhládnuť od zlej vstrebateľnosti perorálnou cestou) - existujú prírodné zdroje enzýmov resp. proenzýmov, vyskytujúce sa v potrave človeka, ktoré by mohli hrať významnú úlohu pri prevencii vzniku nádorov v skorých štádiách?
- 2.) V súčasnosti hrajú významnú úlohu v terapii rôznych ochorení humanizované monoklonálne protilátky proti cytokinom, priamo spojených s patologickým procesom (napr. veľmi efektívna protilátka proti TNF- α pri reumatoidnej artritide). Pokúste sa porovnať výhody a nevýhody takejto terapie oproti (pro)enzymovej terapii.
- 3.) Je známe použitie (pro)enzymovej terapie aj pri modulácii hladiny cytokínov s imunostimulačným účinkom napr. pri autoimunitných ochoreniach?

Na záver konstatujem, že predkladaná diplomová práca splnila stanovené podmienky kladené na takéto dielo a doporučujem prácu prijať k obhajobe a po úspešnom obhajení autorke udeliť titul „Mgr.“

S pozdravom

V San Diegu, 20.5, 2010



Ing. Jan Strnadel, Ph.D.

Oponentský posudek magisterské diplomové práce Bc. Lucie Kalferstové „Optimalizace (pro)enzymové terapie rakoviny“

(vypracoval Dr. Petr Kopáček, Parazitologický ústav, Biologické centrum AVČR, České Budějovice).

Lucie Kalferstová předkládá k obhajobě poměrně rozsáhlou diplomovou práci (celkem 65 stran), která je po formální stránce zcela v pořádku.

Úvodní literární přehled podává přehled o základních typech rakoviny a imunitní odpovědi proti nádorům s důrazem na úlohu cytokinů, zejména transformačního růstového faktoru beta (TGF-beta). Vzhledem k dalšímu zaměření práce se pak autorka věnuje popisu vlastností a funkce inhibitorů proteáz přítomných v plazmě, zejména α 2-makroglobulinu. V posledním odstavci popisuje Lucie historii a dosud velmi omezenou znalost mechanismu enzymoterapie a (pro)enzymoterapie (terapie neaktivními proenzymy) inspirovaná zatím poněkud osamocenou prací profesora Nováka a budějovického onkologa Dr. Trnky.

K literárnímu přehledu mám tyto připomínky a otázky:

1. Práci by velmi prospělo, kdyby byl uveden názorný obrázek mechanismu inhibice proteáz α 2-makroglobuliny a srovnání s mechanismem působením „active-site“ inhibitorů.
2. Odstavec 1.2.4.2. o sérových serpínech čerpá z velmi starých zdrojů. Autorka se prozradila větou „Nedávno bylo objeveno...“ s odkazem na práci z roku 1982. Pojem serpin se v tomto odstavci vůbec nevyskytuje.
3. Zachycení cytokinů do komplexu s α 2M bylo popsáno v mnoha publikacích (Tabulka I, str. 20). Jedná se podle většiny autorů o specifickou interakci α 2M-cytokin nebo o náhodné zachycení kolemjdoucí molekuly spolu se „zaklapnutou“ proteázou?
4. Ve Web of Sciences jsem našel jen 5 prací, které citují článek Nováka a Trnky v časopise AntiCancer Research z roku 2005. Mezi těmito citacemi je i Erratum zveřejněné samotnými autory dva měsíce později ve stejném časopise. Oč se v této korekci jedná? Jaké jsou podle vašeho názoru důvody, proč je tento článek v tak dynamickém a konkurenčním prostředí jako je onkologický výzkum víceméně ignorován?

Metodická část je popsána podrobně ale v mnoha případech málo přehledně. Např. pipetovací schémata pro titrace séra trypsinem nebo trypsinu sérem by měla být podána v jedné tabulce se všemi komponenty. Pro mě bylo hodně obtížné dopátrat se toho, které komponenty v konkrétní reakci jsou či nejsou.

Lucie se také nevyhnula míchání počestělých anglických pojmů s anglickými termíny (např. v odstavci o ELISA se dočteme že byl použit „koutovací pufr“ a assay diluent).

K metodické části mám tyto otázky:

1. Klasický postup stanovení α 2M v séru používá preinkubaci trypsinu se sérem (inhibitorem) a pak vyblokování nezachyceného trypsinu nadbytkem makromolekulárního inhibitoru (např. STI). Proč jste se zvolili způsob presentovaný na obr. 1. Považoval bych za velmi vhodné během obhajoby vysvětlit váš způsob stanovení s ohledem na „entrapping“ mechanismus inhibice trypsinu α 2M. Lze jej nějak oddělit od účinku ostatních „active-site“ inhibitorů přítomných v plasmě?
2. Jaký by byl průběh křivky na obr. 1 při použití vysokomolekulárního substrátu (např. azokaseinu) namísto BAPNA?
3. Proč jste se nepokusili optimalizovat end-point metodu i pro měření v mikrotitračních destičkách? Stejná otázka platí i pro měření trypsinové aktivity fluorescenčním substrátem.
4. Nikde nebylo popsáno složení tzv. pro-enzymové směsi – To je chráněný údaj?

Výsledků autorka předkládá hodně, málo z nich však má nějakou vypovídající hodnotu. Navíc jsou poměrně zašifrované pod pojmy jako parametr A, B, C, D a čtenář se musí neustále vracet k jejich definici podané na Obr. 1. U obrázků mi citelně chyběly samovysvětlující legendy, takže jsem se musel vždy znovu a znovu vnořit do metodické části, abych byl schopen zjistit, oč v daném konkrétním pokusu šlo. K výsledkům mám další otázky a připomínky:

1. U některých grafů (jako např. na obrázku 9 mě zarazilo), proč tak odlišné rozdíly hodnot s malým rozptylem nejsou statisticky významné.

2. Ve výsledcích tvrdíte (např. obr. 3), že v myším séru byla výrazná proteolytická aktivita. Nikde jsem však nenalezl závislost proteolytické aktivity na množství přidaného séra bez trypsinu

3. Jak si vysvětlujete na obr. 3 výrazný pokles aktivity trypsinu s minimálním množstvím přidaného séra. Jste si jistá, že byl použit optimální poměr koncentrace trypsinu vs. koncentrace séra?

Jedním z hlavních výsledků autorky je, že podání poměrně vysoké dávky trypsinu myším se v jejich séru projeví pouze při intraperitoneální aplikaci, ostatní podání se nijak neprojevila. Z tohoto pohledu se mi líbila interpretace, že polykání přípravků typu Wobenzymu asi nemá valný smysl. Největší dojem na mě udělaly výsledky měření velikosti nádoru při i.p. aplikaci proenzymové směsi (obr.11 a 12), které naznačují, že pro(enzymová) terapie možná skutečně funguje. Na druhou stranu si nedovedu příliš představit, že by tento způsob podání pro-enzymové směsi byl aplikovatelný u skutečných pacientů.

Některá získaná data byla diskutována spolu s výsledky, v navazující části Diskuzi se pak autorka nesnaží přehnaným způsobem nadinterpretovat svá data. Některým odstavcům, jako např. předposlední odstavec diskuse (str. 57) jsem nerozuměl ani po opakovaném čtení.

Seznam použité literatury jsem kontroloval namátkově u odkazů, které mě zajímaly. Chyby jsem zde nenašel.

Můj celkový dojem z této diplomové práce je, že pro vysvětlení molekulárních a imunologických mechanismů, které jsou za pozitivními efekty jakýchkoli empirických a alternativních terapií, je třeba používat co nejstandardnější, zavedené a všeobecně uznávané postupy, které přinesou jednoznačná a neotřesitelná data. Jedině tak mají šanci být postupně přijaty širokou odbornou veřejností.

Přes uvedené připomínky a otázky jsem přesvědčen, že Lucie Kalferstová udělala poměrně hodně experimentální práce a zvládla širokou škálu metod na rozhraní experimentální biologie a imunologie. Z diplomové práce je poznat snaha, pracovitost a pečlivost autorky.

Magisterskou diplomovou práci Lucie Kalferstové doporučuji k obhajobě před příslušnou komisí. Diplomovou práci zatím kvalifikuji známkou 1 až 2, definitivně se rozhodnu se až po její prezentaci při obhajobě.

V Českých Budějovicích, 21.5. 2010

Petr Kopáček