

Oponentský posudok na magisterskú prácu Pavlíny Kaiserovej: Imunologické aspekty proenzymoterapie maligných onemocnění.

Magisterská práca bakalárky Pavlíny Kaiserovej s názvom "Imunologické aspekty proenzymoterapie maligných onemocnění" sa zaoberá vplyvom enzymoterapie na rast nádorov v imunodeficientných myších kmeňoch. Tématicky je to práca zaujímavá, zameraná na riešenie závislosti proenzymoterapie na imunitnom systéme s potenciálom praktického využitia.

Literárny úvod je prehľadne a jasne spracovaný a spĺňa tak svoj účel uviesť čitateľa do danej problematiky. Práca je obsahovo členená do dvoch častí. Prvá časť je venovaná vplyvu proenzymoterapie na rast nádorov v imunodeficientných myších kmeňoch. Autorka použila tri myšie kmene s roznyh stupňom imunodeficiencie (myši s výraznou deficienciou pre T a B lymfocyty, myši s defektom pre CD8 receptor a myši a defektom pre perforín). Diplomantka experimentálne dokázala, že proenzymoterapia nie je účinná u žiadnych testovaných imunodeficientných myší. Naopak v kontrolných, imunokompetentných zvieratách, terapia s proenzýmami účinne potlačila rast nádorov so štatistickou významnosťou. Z jej výsledkov sa dá usúdiť, že terapeutický účinok proenzýmov je nepriamy a závisí na funkčnom imunitnom systéme. Výsledky tejto práce sú cenným prínosom v objasnení podmienok, za akých je proenzymoterapia účinná. Pozitívne hodnotím prehľadné spracovanie výsledkov a použitie vhodných kontrol. Druhá časť práce je venovaná vplyvu proenzymoterapie na imunologické parametre, konkrétne diplomantka stanovovala zastúpenie jednotlivých typov buniek imunitného systému zo sleziny testovaných zvierat. Analýza tohto experimentu nepriniesla celkom jasný záver v zmysle zvýšeného, prípadne zníženého podielu niektorého z typov slezinových buniek. Je teda obtiažne posúdiť, ktorý typ imunitných buniek by mohol byť dôležitý pre účinok proenzymoterapie. Navyiac, použitá terapia indukovala celkové zvýšenie počtu buniek sleziny a teda vzhľadom na tento imunologický aspekt mala rovnaký efekt ako rast nádorov.

Pripomienky:

1. V experimentoch, kde bola merítkom úspešnosti propenzymoterapie veľkosť nádorov, boli výstupné grafy sprevádzané veľkou štandardnou odchýlkou. Podobne tomu bolo aj v prípade stanovenia IFN γ a IL-10, z ktorého sa následne odvodzoval pomer Th1 a Th2 buniek, čo iste sťažilo interpretáciu výsledkov a neumožnilo štatisticky významné vyhodnotenie. Stanovovať Th1 a Th2 cytokíny z krvi testovaných zvierat by bolo pravdepodobne presnejšie.
2. V experimente, v ktorom bol stanovovaný podiel jednotlivých buniek zo sleziny, by vytvorenie jedného komplexného grafu sprehľadnilo získanú informáciu.

Otázky:

1. Používali ste vo svojich experimentoch dva typy nádorov, melanóm B16-F10 a sarkóm S-180, ktoré sa navzájom líšia v niektorých parametroch. Mohli by ste nejaké uviesť? Je rozdiel v účinnosti proenzymoterapie na rast melanómu B16-F10 a sarkómu S-180? Ak áno, čo môže byť príčinou?
2. Ako miera úspešnosti proenzymoterapie bola stanovená veľkosť nádoru, avšak aj iné parametre ako napr. schopnosť metastazovať môžu byť kritické a ovplyvnené týmto typom terapie. Bola proenzymoterapia niekedy testovaná vo vzťahu k potenciálu metastazovať?
3. Vzhľadom na neúčinnosť proenzymoterapie u imunodeficientných myší by sa javila analýza účinku tejto terapie v závislosti na pohlaví práve u tohto typu myší ako nadbytočná. Napriek tomu ste zaznamenali rozdiel. Ako si vysvetľujete, že opačný (stimulujúci) účinok

proenzymoterapie na rast nádorov u imunodeficientných CD8a- myší bol zreteľnejší práve u samcov? Je nejaký rozdiel v účinku tejto terapie v závislosti na pohlaví u imunokompetentných zvierat?

4. Z analýzy imunologických parametrov, konkrétne stanovenia podielu imunitných buniek zo sleziny nevyplýval jasný zaver. V diskusii uvádzate, že proenzymoterapia posobí lokálne a teda by bolo vhodné analyzovať dané parametre z nádoru. Akú metódu by ste v tom prípade použili?

5. Predpokladaným princípom proenzymoterapie je narušenie imunosupresie a to prostredníctvom alfa-2-makroglobulínu, ktorý sa po aktivácii proenzýmami viaže na TGF-beta. Je vazba alfa-2-makroglobulínu špecifická pre TGF-beta alebo sa viaže aj na iné cytokíny?

Na záver konštatujem, že diplomantka zvládla experimentálne náročnú prácu, včetně často obtiažnej manipulácie so zvieratami, prácu s tkanivovými kultúrami a celý rad moderných imunologických metod. Výsledky tejto práce prinášajú cennú informáciu o podmienkach, za akých je proenzymoterapia účinná.

Práca Pavlíny Kaiserovej uspokojivo splňa nároky kladené na diplomovú prácu a preto ju hodnotím známku

“výborný”.



Mgr. Jaroslava Lieskovská, Ph.D.

V Českých Budějoviciach 26. mája 2010



RNDr. Vratislav Horák, CSc.

Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v.v.i.
Laboratoř biologie nádorů

Rumburská 89, 277 21 Liběchov

tel.: 315 639 587

fax: 315 639 510

E-mail: horakv@iapg.cas.cz

URL <http://www.iapg.cas.cz>

OPONENTSKÝ POSUDEK
MAGISTERSKÉ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Název: Imunologické aspekty proenzymoterapie maligních onemocnění

Autor: Bc. Pavlína Kaiserová

Přes veškeré snahy obrovského množství výzkumných pracovišť zabývajících se onkologickou problematikou představují nádorová onemocnění celosvětově neustále vážný zdravotní problém a jsou druhou nejčastější příčinou úmrtí. Hledání nových účinnějších terapeutických postupů je nezbytným předpokladem pro zvýšení úspěšnosti jejich léčby na klinických pracovištích. V tomto ohledu je zaměření předložené magisterské diplomové práce velmi aktuální. Práce se zabývá sledováním účinků proenzymové terapie na dva typy nádorů u linií myši s různými defekty imunitních buněk. Důraz je přitom kladený na analýzu imunitní odpovědi – zastoupení subpopulací imunitních buněk a kvantifikace dvou klíčových cytokinů.

Práce má klasické členění. V úvodní části podává autorka podrobný literární přehled o problematice studovaných nádorů, o úloze různých typů imunitních buněk v protinádorové reakci a o použitých myších modelech. Přehledné zpracování této části jasně dokládá, že autorka prostudovala k danému tématu rozsáhlý soubor odborné literatury a že se v této problematice velmi dobře orientuje. Cíle práce jsou krátce, jasně a srozumitelně definované. V následující části práce je uvedený veškerý použitý materiál včetně linií myši a nádorových buněk, je popsán plán jednotlivých pokusů a jsou zmíněné metody použité pro detekci účinku proenzymoterapie. Dosažené výsledky jednotlivých pokusů a analýz jsou prezentované srozumitelně formou sloupcových grafů (s vyznačením směrodatné odchylky a statistické průkaznosti), za kterými následuje krátký komentář. V diskusi autorka vysvětluje jednotlivé výsledky, dává je do vzájemné souvislosti, konfrontuje je s literárními údaji a snaží se dedukovat, jaké pochody mohou probíhat v živém organismu po proenzymoterapii a jak v nich participují různé buňky imunitního systému. V následujícím souhrnu jsou uvedené hlavní závěry plynoucí ze sledování účinků proenzymoterapie u různých myších nádorových modelů. Na závěr autorka uvádí odbornou literaturu použitou v diplomové práci, kterou cituje obvyklým způsobem.



K posuzované diplomové práci mám následující dotazy a připomínky:

1. Na základě čeho bylo stanoveno použité složení a dávka proenzymové směsi ?
2. V práci byla použita pro detekci imunitních buněk průtoková cytometrie. Musím konstatovat, že tabulka na str. 23 vysvětlující barvení buněk pro průtokovou cytometrií mi není moc srozumitelná. Postrádám podrobnější vysvětlení a grafické znázornění (grafy z průtokové cytometrie ve formě dot plot, gates), jak byl počet a procentické zastoupení jednotlivých subpopulací imunitních buněk stanovený.
3. Souhlasím s tím, že použité techniky (průtoková cytometrie pro sledování subpopulací imunitních buněk, ELISA pro stanovení cytokinů INF- γ a IL-10) jsou adekvátní pro analýzu případného vlivu proenzymoterapie na buňky imunitního systému. **Nechápu ale, proč nebyla věnována vůbec žádná pozornost analýze samotných nádorů !!** Proč se soustředila pozornost pouze na buňky izolované ze sleziny a proč nebyly stejným způsobem analyzovány např. tumor infiltruující lymfocyty z odebraných nádorů, což by mělo ve vztahu k růstu nebo regresi nádorů podstatně vyšší vypovídající hodnotu? Proč nebyla provedena imunohistochemická detekce subpopulací jednotlivých typů imunitních buněk v nádorech nebo alespoň klasická histologie? Pouhé měření nádorů a z něho – a z dat průtokové cytometrie buněk sleziny – dedukování, co se v organismu asi děje je velmi spekulativní.
4. Vliv proenzymoterapie na růst nádorů byl sledován u tří linií myší s různým defektem imunitního systému a u dvou typů nádorů (melanom B16-F10 a sarkomS-180). Naproti tomu změny v imunologických parametrech byly analyzované u imunologicky zdravých myší C57BL/6 (s melanomem B16-F10). Tato koncepce pokusu představuje značný rozsah experimentální práce, která však nakonec nepřináší očekávaný profit. Je pochopitelné, že např. u myší s mutací genu pro CD8 nebylo možné stanovovat cytotoxické T-lymfocyty. Určitě by zde ale šlo detekovat další imunitní buňky, které byly také předmětem sledování. Domnívám se, že komplexnější analýza třeba i nižšího počtu modelů by byla jistě přínosná. Takto jsou výsledky získané na značně heterogenním materiálu myších linií a tak jsou vzájemně jen těžko porovnatelné. K jaké velikosti nádorů jsou např. vztahovány změny ve sledovaných parametrech na str.31, str.32, str.34 ?
5. Proč byla při utracení zvířat 21., 28. a 34. den pokusu odebírána krev z cév ramenního pletence (str. 22), když už dále nikde nebyla k analýzám použita ?



6. Proč chybí při stanovení NK a NKT buněk ve slezině průtokovou cytometrií termín odběru 21.den (str. 37 a 38) ?
7. Změny ve sledovaných parametrech (mezi jednotlivými skupinami zvířat, v různých dnech pokusů) autorka komentuje jako snížení nebo zvýšení (obr. 12-15 aj.). Tato interpretace je s ohledem na často značné směrodatné odchylky a tím statistickou neprůkaznost změn poněkud nekorektní.
8. Přehled použité literatury je rozsáhlý (str. 45-51). Přitom je trochu zarážející, že nejčerstvější citací, pominu-li práci autorky uváděnou jako „in prep. 2010“, je její bakalářská práce z roku 2008. Pohled do historie je často jistě zajímavý, ale nevím, zda autorka články publikované začátkem 20.století mohla pro studium vůbec získat. Každopádně by základní zásadou mělo být vycházet co nejvíce z informací posledních let. Vadí mi rovněž nejednotnost v citování prací (název časopisů někde v plné někde ve zkrácené formě, s tečkami za zkratkami nebo bez teček, někde s uvedením čísla časopisu, někde jen první stránka článku).

ZÁVĚR:

Přes výše uvedené připomínky se domnívám, že předložená diplomová práce splňuje podmínky, které jsou na ni zákonem kladené. Autorka prokázala, že je schopná pracovat s odbornou literaturou, umí si vytyčit cíl práce, realizovat náročný pokus na zvířecích modelech, zpracovat rozsáhlý soubor získaných výsledků, interpretovat je a začlenit je do současné úrovně poznání. Výsledky by bylo vhodné – po doplnění a úpravě v souladu s výše uvedenými připomínkami – prezentovat v impaktovaném odborném časopisu.

Diplomovou práci Bc. Pavlína Kaiserové doporučuji přijmout k obhajobě a po úspěšném obhájení udělit autorce akademický titul „magistr“ (ve zkratce Mgr.).

V Liběchově 24.5. 2010

RNDr. Vratislav Horák, CSc.