



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 BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Název: Studium nádorové terapie pomocí Zymosanu A

Autor: Eva Waldmannová

Předložená bakalářská práce se zabývá sledováním účinků intratumorálně aplikovaného Zymosanu A na růst myšního melanomu B16-F10. Ve čtyřech nezávislých pokusech byl testován vliv samotného Zymosanu A, kotveného Zymosanu A a kotveného Zymosanu A v kombinaci s LPS, flagelinem, myšími makrofágy nebo neurofilními granulocyty. Celkové zpracování práce je velmi kvalitní. V rozsáhlé úvodní části autorka uvádí příčiny vzniku nádorů, jejich klasifikaci a možnosti terapie s důrazem na imunoterapii a různé související aspekty imunitního systému. Dále podrobně specifikuje preparát Zymosan, jeho účinky na imunitní buňky a možnosti jeho využití v protinádorové léčbě. Přehledné zpracování této části jasně dokládá velmi dobrou orientaci autorky v uvedené problematice. Materiál a metody experimentální práce jsou rozvedené v potřebném rozsahu. Dosažené výsledky jednotlivých pokusů jsou krátce slovně popsány a prezentované ve sloupcových grafech s vyznačením směrodatných odchylek a statistické průkaznosti. V následující části autorka diskutuje tyto výsledky ve vztahu k relevantním současným poznatkům a v závěrečné části stručně v bodech shrnuje nejdůležitější získané poznatky. Na závěr pak uvádí odbornou literaturu citovanou v práci. **Za hlavní přínos práce považuji zjištění, že kotvený Zymosan A v kombinaci s LPS nebo s makrofágy vykazoval výrazný supresivní efekt na růst a velikost myšního melanomu.**

K posuzované bakalářské práci mám následující dotazy a připomínky:

1. Formulace na str. 2/řádek 5: „Nádorová onemocnění nejsou sice dědičná,“ je nepřesná. Všechna nádorová onemocnění mají původ v poškození genů. Pokud takovéto poškození postihne zárodečné buňky, může být nádorové onemocnění předáváno na další generace, má tedy dědičný charakter. Týká se to ale jen nízkého počtu nádorových onemocnění (asi 5-10%), jak ostatně autorka uvádí na str. 4/řádek 7: „Dědičného původu je 2-5% melanomů“.
2. Formulace na str. 3/řádek 7-8: „... a na nádory kůže a sliznic (melanocyty)“ – je nepřesná. Melanocyty nemají žádný nádorový charakter. Jedná se o normální pigmentové buňky, které mohou být postupně transformované na benigní nevové buňky a následně na melanomové buňky.



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>

3. **Cíle práce na str. 20 jsou formulované až příliš stručně!** Z uvedených metodik a schémat pokusů je přinejmenším zřejmé, že nebyl studován jen vliv samotného Zymosanu A.
4. Pro uvádění počtů buněk (např. str. 22/řádek 8 a 13) doporučuji místo „4 mil buněk/ml“ nebo „400 000 buněk“ používat běžné vyjádření „ 4×10^6 buněk/ml“ nebo „ 4×10^5 buněk“ apod.
5. V části 3.5 (str. 22) se uvádí, že subkutánně injikované melanomové buňky byly v RPMI 1640 bez séra. **Nemůže RPMI svým složením nějakým způsobem ovlivnit růst nádorů? Nebylo by vhodnější použít PBS nebo fyziologický roztok?**
6. V části 3.8 (str. 22) autorka uvádí, že odběr krve byl realizovaný napíchnutím žíly u kořene ocasu, vzniklá kapka krve odsáta injekční stříkačkou a po uložení přes noc v lednici bylo izolováno sérum pro stanovení CRP. Jak velké množství séra se tak získalo? Bylo to dostatečné pro individuální kvantifikaci CRP ELISA kitem nebo bylo nutné použít směsný vzorek od celé skupiny pokusných zvířat?
7. **Proč nebyla kvantifikace CRP prováděna po celé trvání pokusu?** V použitém schématu byla podrobně podchycena dynamika po první intratumorální aplikaci terapeutika. **Jak se ale měnila koncentrace CRP po dalších pěti dávkách terapeutika?**
8. Postupy pro izolaci makrofágů (3.10) a neutrofilů (3.11; str. 23) z peritoneální dutiny jsou originální postupy autorky? V případě, že tomu tak není, chybí citace prací.
9. Při izolaci makrofágů (3.10, str.23/řádek 19-20) se uvádí, že „...Použitím průtokové cytometrie byla určena kvalita buněčné směsi.“ Jaké reagentie resp. jaká kombinace protilátek proti myším CD znakům byla použita? Stejný dotaz mám také, pokud jde o izolaci neutrofilů (3.11) a čistotu získaných buněk (str. 24/řádek 6).
10. Proč nebylo u všech pokusů použité stejné časové schéma terapie? U Pokusu č. 1 byla zahájena 20. den po inokulaci melanomových buněk a u ostatních třech pokusů již 12. den.
11. Zkratku „i.t.“ (str.24/řádek 27) by bylo vhodné při první použití rozepsat. Nejedná se o žádnou běžně užívanou zkratku pro injekční aplikaci, jako např. „i.v.“ nebo „i.m.“, které již není nutné vysvětlovat.
12. V Pokusu č. 3 (3.17, str. 26) byl použitý kotvený Zymosan A v kombinaci s makrofágy nebo neutrofilů. **Čistota získaných makrofágů byla 71,5%, čistota neutrofilů byla 67,7%.** Byla odlišná čistota suspenzí příčinou použité odlišné koncentrace obou typů imunitních buněk (5×10^7 makrofágů/ml versus 8×10^7 neutrofilů)? **Jaké další typy imunitních buněk byly v získaných buněčných suspenzích přítomné a jakým způsobem by mohly ovlivnit**



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>

sledovaný růst nádorů? Proč nebyly získané buněčné suspenze přečištěné např. pomocí MACS techniky?

13. Pokus č. 4 měl potvrdit velmi silný inhibiční účinek kotveného Zymosanu A v kombinaci s makrofágy na růst nádorů zalezený v Pokusu č. 3, ale očekávaný výsledek přinesl jen částečně (inhibiční efekt byl nižší). Má pro to autorka nějaké vysvětlení? Vzhledem k vyšší čistotě makrofágů v Pokusu č. 4 bych naopak očekával vyšší efekt v tomto pokusu.
14. Proč byly sledovány plicní metastázy pouze v Pokusu č. 1 a ne u všech pokusů? Jaká byla lokalizace metastáz (pouze povrchová nebo i uvnitř plicního parenchymu)?
- 15. Proč nebyly dělány další analýzy (př. histologie, imunohistochemie nádorů pro detekci imunitních buněk, kvantifikace cytokinů apod.), které by odhalily změny probíhající v nádorech? Je třeba si uvědomit, že jsme na začátku 21. století, s obrovskými detekčními možnostmi pomocí rozsáhlého spektra technik a tak výsledky založené pouze na sledování růstu nádorů jsou fakticky v mezinárodních časopisech nepublikovatelné!!!**
16. V práci jsou citované publikace z 1. poloviny 20. století (některé staré více jak sto let!). Četla autorka skutečně tyto publikace v originálu, nebo je přejala z novějších prací? V druhém případě je nutné citace v textu uvádět jiným způsobem (př. Cotanyi 1905–cit. Marshal 1988).
17. V Seznamu použité literatury nejsou uváděny citace stejnou formou – u některých prací je uveden jen svazek časopisu, jinde je navíc i číslo časopisu v závorce (obvykle se nepoužívá).

ZÁVĚR:

Před výše uvedené připomínky je předložená bakalářská práce je velmi kvalitní a svým rozsahem výrazně překračuje nároky kladené na takovýto typ práce. Autorka jasně prokázala, že je schopná přehledně zpracovat rozsáhlý soubor odborné literatury, samostatně realizovat náročné pokusy na zvířecím nádorovém modelu a vhodně interpretovat získané výsledky. S ohledem na uvedené skutečnosti hodnotím práci stupněm „VÝBORNÝ“.

Bakalářskou práci Evy Waldmannové doporučuji přijmout k obhajobě a po úspěšném obhájení udělit autorce akademický titul „bakalář“ (ve zkratce Bc.).

V Liběchově 22.5. 2012

RNDr. Vratislav Horák, CSc.