

Oponentní posudek na diplomovou práci Bc. Magdy Čechové: Studium možnosti ovlivnění metastázování pomocí proenzymoterapie.

Předložená diplomová práce se zabývá studiem vlivu proenzymoterapie na četnost a velikost metastáz u melanomu B16-F10 u laboratorních myši kmene C57Bl/6. Kromě toho byl u daných myši studován vliv LPS, TGM, BG a bakterie *Stenotrophomonas maltophilia* na redukci růstu nádoru a potlačení jeho metastázování. Proenzymoterapie představuje zajímavou problematiku, které je v onkologickém výzkumu věnována neprávem jen malá pozornost. Jako obzvláště zajímavou vnímám část pojednávající o protinádorovém účinku bakterie *S. maltophilia*. Možnost využití bakterií v protinádorové léčbě je známa již přes sto let. Je zaznamenán nespočet případů, kdy bakteriální terapie vedla k regresi maligních nádorů v pokročilém stadiu, i k jejich vyléčení. Bakterie byly s úspěchem užívány k terapii sarkomů, karcinomů, lymfomů, myelomů, i melanomů. Přesto v této oblasti, jak ostatně dokumentuje i předložená magisterská práce, je stále co objevovat.

Práci tvoří 83 stran textu a obrázků. Práce je standardně členěna na následující kapitoly: Úvod, Literární přehled, Materiál a metody, Výsledky, Diskuse, Závěr, Seznam použité literatury a Přílohy.

Úvod a literární přehled je psán dobrou češtinou s minimem pravopisných chyb a překlepů. V této části je presentován přehledný souhrn o rakovině, nádorové imunologii a možnostech terapie nádorů pomocí proenzymoterapie.

Kapitola **Materiál a metody** je bohužel místy až příliš infiltrována „laboratorní hantýrkou“ a někdy připomíná spíše poznámky z laboratorního deníku, nežli odborný text. Jako příklad uvádím výrazy typu „binolupa“, „mikrovlknka“, „stočit na centrifuze“ atd. Místo výrazu „pravá zadní část zad“ bych doporučil užít termínu „pravá krajina hýžd'ová“ (regio glutea dextra).

Kapitola **Výsledky** sumarizuje data získaná z celkem šesti experimentů, které zahrnují ovlivnění četnosti a velikosti melanomových metastáz proenzymoterapií, LPS, TGM, BG, bakterií *Stenotrophomonas maltophilia* a cytotoxický test. Výsledky jsou povětšinou presentovány přehledně a srozumitelně v podobě sloupcových grafů.

Kapitola **Diskuse** shrnuje a komentuje dosažené výsledky. Bohužel jen malý prostor je věnován srovnání autorčiných výsledků se zahraniční literaturou. Například na téma využití bakterií v protinádorové léčbě existují stovky prací, autorka z nich však nediskutuje ani jednu. Kapitola **Závěr** odrážkovým systémem přehledně a srozumitelně shrnuje hlavní zjištění autorčiny práce.

Seznam literatury zahrnuje úctyhodných 125 literárních odkazů. Citace jsou úplné a mají jednotnou formu. V některých případech anglicky psaných názvů prací se ale vloudily drobné chyby a překlepy („unike“ místo „unique“; „komplete“ místo „complete“; „resistence“ místo „resistance“; „aktivity“ místo „activity“; „hibrid“ místo „hybrid“ apod.). V případě citace Brandarchi et al. 2010 by se nemělo uvádět stránkování, ale identifikátor článku pii: 583748.

Kromě již uvedeného bych měl k práci následující připomínky:

1. Na straně 4 autorka presentuje tabulku shrnující lidské onkogenní viry, která je převzata z učebnice onkologie pro lékařské fakulty. Tabulka ale obsahuje řadu nepřesností – nesprávně jsou uvedeny virové čeledi, některé názvy virů, i některá onemocnění (např. Kaposiho sarkom, nikoliv Kaposiho).
2. Slovo „viz“ není zkratka, nýbrž imperativ od slovesa „vidět“, tudíž jej nepíšeme s tečkou.
3. Některé zkratky jsou v textu vysvětlovány zbytečně opakovaně (s.c., i.m., i.p., i.t.).

4. U obrázků 5, 7, 8, 10 a 18 postrádám vyznačení směrodatných odchylek a výsledky statistické analýzy.
5. V případě experimentu č. 4 nelze mluvit o skupinách, neboť každá „skupina“ zahrnovala jen jednu myš.

Na autorku bych měl následující otázky:

1. Na straně 26 a dále autorka uvádí, že „Bakterie *Stenotrophomonas maltophilia* je jedinou bakterií s výrazně pozitivním povrchovým nábojem“. Jakým způsobem povrchový náboj bakterií závisí na pH prostředí, růstovém médiu a stáří bakteriální kolonie? Jaký povrchový náboj při neutrálním pH má např. bakterie *Streptococcus thermophilus* v draselno-fosfátovém pufu?
2. Lze předpokládat, že kladný povrchový náboj bakterií *S. maltophilia* bude zachován i po smrti bakterie či po sonikaci?
3. V případě pokusu 5 postrádám ještě jednu skupinu, které by bylo aplikováno LPS. Vzhledem k tomu, že *S. maltophilia* je Gram-negativní bakterie, nelze z daného pokusu říci, zda byl pozorovaný protinádorový účinek výsledkem specifického působení daného bakteriálního druhu, či jen LPS obsaženého v bakteriální stěně.
4. Bakterie *S. maltophilia* často kolonizuje pacienty s onkologickým onemocněním a způsobuje jim leckdy vážné komplikace. U některých pacientů byla pozorována i bakterémie způsobená touto bakterií. Existují nějaká data, která by poukazovala na vazbu bakterií k nádoru u těchto pacientů, či dokonce redukci jeho velikosti?
5. Na str. 60 autorka poukazuje na to, že intravenózní aplikace nádorových buněk nepředstavuje vhodný model pro přirozený způsob metastázování. Z jakého důvodu je pak tento model tak často používán?

Práce bezpochyby splňuje požadavky kladené Přírodovědeckou fakultou Jihočeské univerzity na magisterskou diplomovou práci, doporučuji ji tedy bez váhání k obhajobě. Objem experimentálních dat je dostatečný, byť by si mnohé z provedených experimentů zasloužily obsáhlejší a detailnější studium. Některé z předkládaných výsledků jsou založeny jen na velmi malých počtech experimentálních subjektů, bude tedy nutné v budoucnu experimenty zopakovat s větším počtem pokusných jedinců. Velmi zajímavý výsledek byl dosažen po aplikaci bakterií *S. maltophilia* do nádoru, zde ale chybí kontrola s LPS. V Diskusi bych uvítal důkladnější rozbor autorčiných výsledků ve světle údajů ze zahraniční literatury.

Vzhledem k výše uvedeným výtkám navrhuji předloženou magisterskou práci Bc. Magdy Čechové klasifikovat stupněm

velmi dobře.



RNDr. Daniel Růžek, Ph.D.

V Českých Budějovicích 16. ledna 2011

OPONENTSKÝ POSUDEK NA DIPLOMOVOU PRÁCI

Název práce: **Studium možnosti ovlivnění metastázování pomocí proenzymoterapie**

Autor práce: **Bc. Magda Čechová**

Oponent: **Ing. Eva Pokorná, CSc.**

Předložená práce se zabývá testováním vlivu působení směsi proenzymů na průběh nádorového onemocnění u myši se zaměřením především na problematiku metastázování. Cílem práce bylo studovat možnosti ovlivňování metastázování pomocí proenzymů na melanomovém modelu myši C57BL/6. Dalším cílem pak bylo orientačně zjistit možnosti různých metodik využívajících přirozené imunity pro cílenou protinádorovou léčbu. Studie probíhaly zejména na úrovni *in vivo*, cytotoxický test pak na buněčné *in vitro* úrovni. Práce své cíle splnila.

Diplomová práce je rozdělena do kapitol tak, jak jsme u odborných vědeckých prací zvyklí. Velmi se mi líbila kapitola „Úvod“, která je opravdu dobře a podrobně propracována a ze které je patrné, že autorka přečetla rozsáhlý soubor české i anglické odborné literatury a načerpala tak mnoho nových poznatků. Tato kapitola čtenáři rovněž dobře vysvětlí souvislosti mezi následujícími metodikami a proč a za jakým účelem byly použity. Po přečtení kapitoly Úvod jsem byla jasně přesvědčená, že autorka téma dobře pochopila a našla maximum vědecké odborné literatury s informacemi o dané problematice. I ostatní kapitoly tj. „Materiál a metody“, „Výsledky“ a „Diskuze“ jsou provedeny podle všech pravidel vědeckých prací. Přehled použité literatury je rozsahem i kvalitou velmi dobrý. Líbil se mi nápad použít danou metodiku cytotoxického testu v kombinaci s vyhodnocováním pomocí průtokové cytometrie.

K práci mám následující připomínky seřazené podle jejich závažnosti:

1. Obecně k výsledkům: chybí mi u všech tří studií tabulky skutečných naměřených číselných hodnot, protože z grafů můžeme vidět jen průměrné hodnoty a mnohdy by byly jednotlivé naměřené hodnoty pro představu čtenáře velmi zajímavé. Jako příklad uvedu myši skupiny E z pokusu č. 2 obr. 8, kdy by mě opravdu zajímalo, jestli průměrný počet metastáz u této skupiny výrazně zvyšovala jen jedna nebo dvě myši nebo jestli byly v této hodnotě pozorovány metastázy u všech 10 myší.
2. Strana 43, kap. 4.3 výsledky – u pokusu č. 3 uvádíte, že velikosti nádorů jsou rozpracovány v práci Maršíkové (v přípravě), ale konkrétně se o nich čtenář mnoho nedoví. Myslím si, že alespoň jednoduchý graf dosažených velikostí nádorů by měl být uveden i zde, protože jedině tak by čtenář měl možnost vyhodnotit souvislosti mezi velikostí nádorů a metastázováním, což je důležité pro vyhodnocení efektivnosti metody léčby. Často se stává, že sice léčba způsobí, že nádory jsou ve výsledku menší, ale metastázy jsou četnější a pak se nedá o její úspěšnosti hovořit, proto si myslím, že pokud chceme vyhodnocovat úspěšnost proenzymoterapie, musíme jí vyhodnotit komplexně.
3. Graf na str. 47 obr. 14 mi připadá trochu zavádějící, když např. skupina IV. má 100% případů výskytu metastáz proto, že tamnější jedna myš ve skupině měla 2 metastázy.
4. Souhlasím s odstavcem 2 str. 47 a jako připomínku uvádím velkou skupinu kontrolní A srovnávanou s malými I, II, III a IV.

5. I když beru v úvahu, že pokus byl technicky náročný a že šlo pouze o orientační zjištění, zdá se mi počet myší ve skupině (2) malý. Např. výsledek léčby pomocí TGM u myší Ia a Ib je tak rozporuplný, že z něj lze těžko udělat nějaký závěr. Rozhodně se mi zdá, že výsledky těchto dvou myší nelze průměrovat.
6. Výsledky cytotoxického testu str. 54 a 55 mi připadají tak složitě popsané, že je čtenář musí číst několikrát a velmi obtížně se v nich vyzná.
7. Str. 41 obr. 6 mi nepřipadá příliš přehledný.
8. Str. 36 – zřejmě jen omylem chybí u skupiny A pokus 5 uvést, že suspenze bakterií byla zářená, tedy mrtvá.
9. Nepoužívala bych výraz „na metastázy nebo na nádory zabrala léčba“, ale např. „léčba měla pozitivní vliv na snížení výskytu metastáz“.
10. V citacích v „Seznamu použité literatury“ by měly být všechny údaje uváděny jednotným systémem (nikoli např. jednou název časopisu zkratkou a jindy celý název).
11. V seznamu literatury jsou špatně datovány práce Maierové a Živné (2008), ačkoli v textu jsou v pořádku (2010), což náhodně vím, protože jsem je obě oponovala.
12. Našla jsem jen několik velmi drobných chyb v textu, které byly všechny překlepy.
13. Pro lepší srozumitelnost by mi připadalo dobré zavést jednu stranu s vysvětlením všech použitých zkratk, protože jich je v práci hodně a uvést i číslo stránky, kde byla zkratka poprvé zavedena.

K práci mám následující otázky:

1. Proč se u pokusů č. 3, 4 a 5 začínalo s léčbou vždy jiný den od aplikace nádorových buněk (11, 15 a 13tý)? Nebylo by lepší začít u všech stejně (např. 15tý), aby šlo pokusy srovnávat i mezi sebou?
2. Probíhaly některé pokusy paralelně nebo všechny jeden po druhém?
3. Sledovali jste souvislost mezi velikostí nádoru a výskytem a počtem metastáz u jednotlivých metodik?
4. Byla u pokusu č. 2 – výskyt a četnost metastáz, obr. 7 a 8 sledována statistická významnost?
5. Máte nějakou hypotézu, proč proenzymy podávané i.p. mají negativní vliv na výskyt a počet metastáz (pokus č. 3)?
6. Léčba pomocí LPS se zdá zajímavá, protože inhibuje růst nádorů i výskyt a počet metastáz. Bude se ve studiích s jejím použitím pokračovat?

Závěr:

I přes výše uvedené drobné připomínky jsem přesvědčena, že předložená práce je kvalitní a splňuje veškeré požadavky kladené na diplomovou práci. Autorka prokázala, že je schopná zpracovat zadanou problematiku v teoretické i praktické rovině. Proto jednoznačně doporučuji, aby předložená práce byla přijata k obhajobě. Navrhuji známku 1.

V Praze dne 18.1. 2011


Ing. Eva Pokorná, CSc.