

Oponentský posudok na magisterskú prácu Hany Maršíkovej: Optimalizace proenzymoterapie nádorových onemocnění a studium jejího mechanismu

Magisterská práca bakalárky Hany Maršíkovej sa zaoberá optimalizáciou enzymoterapie na rast nádorov v závislosti od spôsobu podania a štúdiom účasti vrodenej imunity na rast nádorov. Prvá časť práce tematicky navazuje na predchádzajúce diplomové práce Mgr. Keiserovej a Mrg. Kalferstovej, na ktoré sa diplomantka na niekoľkých miestach opakovane odvoláva. Výsledky tejto časti práce dopĺňajú informáciu o najúčinnnejšom spôsobe aplikácie proenzymoterapie a sú prínosom k celkovému objasneniu tejto 'neštandardnej' metódy liečby nádorov. Druhá časť práce je orientovaná na možnosti liečby nádorov s využitím naviazaných PAMPs motívov na nádorové bunky.

Diplomová práca o rozsahu 58 strán je členená na Literárny úvod, ktorý je pomerne rozsiahly, jeho 20 strán tvorí viac ako tretinu celej práce. V niektorých častiach literárneho úvodu chýbajú referencie, a týka sa to hlavne informácií knižného charakteru. Celkovo je však táto časť práce jasne spracovaná a spĺňa tak svoj účel. Kapitola Materiál a metódy je rozpracovaná na 9 stranách. Metódy, s ktorými sa diplomantka oboznámila sú popísané pomerne podrobne a prehľadne. Nasleduje kapitola Výsledky na 14 strán a Diskusia na 3 strany. Samozrejme súčasťou práce sú kapitoly Ciele a Súhrn. Napomocný by bol zoznam skratiek, ktorý postrádam.

Z hľadiska výsledkov sa dá práca členiť na 2 časti. V prvej časti diplomantka porovnávala optimálny spôsob aplikácie proenzymoterapie. Z jej výsledkov je zrejmé, že najúčinnjšia je intraperitoneálna aplikácia proenzymoterapie. Dosiahnuté výsledky prezentujúce dynamiku účinnku proenzymoterapie by mohli byť lepšie popísané, aby bolo zrejmé, čo je vynesené na osi y (str.33, 34). Časť výsledkov zaoberajúca sa dynamikou proenzymoterapie z hľadiska metabolomiky by mala byť doplnená tabuľkou s hodnotami nameraných metabolitov, keďže v texte sa uvádza, že výsledok experimentu poukázal na koreláciu medzi veľkosťou nádorov a hladinou kyseliny mliečnej a kyselín zúčastňujúcich sa Citrátového cyklu. Navyše, v kapitole Materiál a metódy je popísaná štatistická metóda, ktorá bola použitá na vyhodnotenie metabolitov z moču.

Druhá časť diplomovej práce bola zameraná na test hypotézy, ktorej podstatou je terapia nádorov, založená na označení nádorových buniek s motívom PAMP, čo by následne malo vyvolať infiltráciu makrofágov, ktoré budú zodpovedné za ich regresiu. Účinok PAMPs na nádorových bunkách bol testovaný *in vitro* a *in vivo*. Na určenie cytotoxického účinku LPS, fluorescenčnej farby a makrofágov bola použitá metóda prietokovej cytometrie.

Bohužiaľ nebol zaznamenaný atak makrofágov na melanómové bunky s inštalovanými PAMP. Výsledky boli sumarizované v tabuľke a prezentované histogramami. Odporúčala by som použiť prehľadnejší spôsob prezentácie (histogramy v zmenšenej podobe, aby bolo zrejmé, čo sa s čím porovnáva) a taktiež percentuálne vyhodnotenie udalostí jednotlivých kvadrantov by bolo čiteľnejšie ako vyjadrenie absolútneho počtu buniek.

In vivo experimenty preukázali silný negatívny efekt intratumorálne podávaného LPS na rast nádorov. Treba podotknúť, že veľmi posobivá bola kombinovaná terapia LPS s betaglukánom, pri ktorej sa rast nádorov takmer zastavil a objemovo predstavoval iba 2.5% z veľkosti nádorov kontrolnej skupiny.

Otázky:

1. V grafe na str.32 je porovnávaná dynamika účinku proenzymoterapie a enzymoterapie. Aké bolo zloženie zmesi použitej pri enzymoterapii? Táto informácia nie je nikde uvedená.
2. Ako si vysvetľujete, že absolútny počet buniek reprezentujúci Q4 zo vzorky, kde boli merané melanómové bunky značené s DiO, PI a LPS po pridaní makrofágov, stúpol? Čo znamená P3 vo vašich histogramoch? Aký je princíp vazby DiO na bunky?
3. Pri sledovaní vplyvu LPS a betaglukanu na rast nádorov ste začali s liečbou na 14. deň. Liečba naozaj posobivo zabránila rastu nádoru oproti kontrolnej skupine. Bolo by možné zistiť, či dokáže vyvolať regresiu v zmysle zmenšenia nádoru? Boli vykonané nejaké testy v tomto smere? Prípadne, uvažuje sa o kombinácii enzymoterapie a liečbou s LPS/betaglukan?
4. Bola terapia s LPS a betaglukanom testovaná vo vzťahu k potenciálu metastazovať?
5. *In vitro* test nepreukázal, že by makrofágy mali cytotoxický účinok na melanómové bunky značené LPS alebo FM. Pozitívny výsledok je zásadný na pochopenie mechanizmu tejto terapie. Aké su plány do budúcnosti v tomto smere?

Na záver konštatujem, že diplomantka zvládla experimentálne náročnú prácu, včetně manipulácie so zvieratami, prácu s tkanivovými kultúrami a prácu na prietokovom cytometri. Výsledky tejto práce prinášajú cennú informáciu o podmienkach, za akých je proenzymoterapia pri liečbe nádorov účinná a poukazujú na zaujímavý smer v liečbe nádorov, s využitím PAMP motívov na aktiváciu vrodenej imunity cielenej proti nádorom. Práca Hany Maršíkovej uspokojivo spĺňa nároky kladené na diplomovú prácu a preto ju hodnotím veľmi kladne.

Mgr. Jaroslava Lieskovská, Ph.D.

V Českých Budějoviciach 19. januára 2011





OPONENTSKÝ POSUDEK

MAGISTERSKÉ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Název: **Optimalizace proenzymoterapie nádorových onemocnění
a studium jejího mechanismu**

Autor: **Bc. Hana Maršíková**

V odborné literatuře jsou každoročně prezentovány stovky článků, které se zabývají onkologickou problematikou. Díky nim se rapidně rozšiřují jak naše poznatky o příčinách vzniku nádorových onemocnění, tak také možné postupy jejich léčby. Přes tento neustálý progres vyvstávají stále nové a nové dosud nezodpovězené otázky a nádorová onemocnění zůstávají celosvětově vážným zdravotním problémem. V tomto kontextu považuji předloženou magisterskou diplomovou práci, která se zabývá onkologickou problematikou na experimentální úrovni, za velmi aktuální a žádoucí.

Práce je členěna standardním způsobem. Literární úvod přináší rozsáhlé množství informací o klasifikaci nádorů, o příčinách jejich vzniku, o protinádorové imunitě a funkci různých cytokinů v ní, o principu proenzymové terapie a způsobech její aplikace a o léčbě nádorových onemocnění založené na stimulaci buněk vrozené imunity pomocí PAMPs (pathogen-associated molecular patterns). Značný rozsah literárního úvodu a jeho přehledné členění dokumentují, že se autorka v dané problematice velmi dobře orientuje. Cíle práce jsou krátce a jasně definované. V části „Materiál a metody“ je v potřebném rozsahu uvedeno uspořádání provedených pokusů a další nezbytné údaje (tedy použité chemikálie, pokusná zvířata, nádorové buňky a laboratorní techniky). V části „Výsledky“ autorka uvádí a komentuje dosažené výsledky jednotlivých pokusů. Získané údaje kvantitativního charakteru jsou zpracované převážně formou přehledných grafů. V následující krátké diskusní části jsou prezentované výsledky dávány do souvislostí se současnými poznatky a jsou kriticky hodnoceny úspěchy či neúspěchy provedených pokusů. V „Souhrnu“ jsou v šesti bodech uvedené hlavní přínosy předložené diplomové práce. Nakonec je uveden seznam použitých literárních pramenů.



K posuzované diplomové práci mám následující komentáře:

1. Obecné připomínky:

Diplomová práce mi připadá poněkud nesourodá. To, co ji pojí dohromady, je snaha o terapii nádorů u myšího modelu s inokulovaným melanomem. První část práce se zabývá problematikou proenzymoterapie ve vztahu k růstu melanomů. V druhé části pak autorka směřuje experimentální úsilí na indukci protinádorové reakce na úrovni vrozené imunity pomocí PAMPs (př. lipopolysacharid, β -glukanu, Zymosanu A), které se váží na nádorové buňky.

Diplomová práce přináší zajímavé výsledky, které ukazují, že některé použité způsoby ošetření myší s melanomem B16-F10 mohou inhibovat růst nádorů (především kombinace LPS a β -glukanu) v porovnání s kontrolní neošetřenou skupinou zvířat. Žádný ze sledovaných postupů však nevedl k úplnému vymizení nádorů. **Za výrazný nedostatek práce považuji skutečnost, že u pokusů s proenzymoterapií nádorů byla jediným sledovaným parametrem velikost resp. objem nádorů.** (Autorka sice v kapitole 4.4. ještě slovně zmiňuje určité výsledky z GC/MS analýzy moči z jednoho experimentu, ale bez jakýchkoliv konkrétních údajů). Proč např. nebyl kromě růstu nádorů sledován alespoň vliv použitých terapií také na rozsah metastáz, když je v literárním úvodu zmíněno (str. 11, Novák and Trnka 2005), že právě použité myší melanomové buňky B16-F10 mají vysokou schopnost metastazovat do plic? Pokud tedy nebude jasně prokázáno některými běžnými laboratorními technikami (např. imunohistochemie, histologie, ELISA, průtoková cytometrie), jak aplikace testovaných látek ovlivňuje strukturu nádorů a úroveň destrukce nádorových buněk, jak se mění cytokinové prostředí v nádorech a zda dochází ke změnám v zastoupení různých subpopulací imunokompetentních buněk, pak budou tyto postupy představovat pouze zajímavou modulaci růstu nádorů, ale nic víc.

Za pozitivum předložené práce považuji rozšíření experimentálních terapií nádorů na sledování účinku různých PAMPs, které mohou aktivovat buňky vrozené imunity. Značným přínosem této části práce je také zavedení a optimalizace fluorescenčního cytotoxického testu (namísto konvenčního testu s radioaktivním chromem ^{51}Cr). Tento test představuje pro analýzu účinků terapií jeden z vhodných nástrojů, kterých jsem se dožadoval v předchozím textu.

2. Specifické připomínky a dotazy

Str. 2 Jaké části populace se týkají údaje o incidenci melanomů a mortalitě, z jakého zdroje jsou uvedené údaje citované?

Str. 6 (5.odst) – „Mají nádorový antigen na genu *MART-1/MelanA*,.....“

Špatná formulace – nádorový antigen MART-1/Melan A je kódovaný genem *Mart1*.

Str. 7 (1.odst.) – „*Diferenciací granulocytů vzniká eosinofilní, neutrofilní a bazofilní větve*“.

Špatná formulace – diferenciací granulocytů už nic nevzniká, jsou to finální, plně diferencované buňky. Různé „větve“ granulocytů vznikají diferenciací myeloidní progenitorové buňky.

Str. 8 (1.odst.) - „*Dendritické buňky mohou být aktivovány mikroorganismy, virovými partikulami, ale také molekulovými vzory apoptických buněk.*“

Pro upřesnění: Jak prokazuje řada prací prof. Pramod Srivastavy (University of Connecticut Health Center, Farmington, USA) a jeho následovníků, dendritické buňky mohou být aktivované daleko



účinněji nekrotickými buňkami resp. komplexy proteinů teplotního šoku s navázanými nádorově specifickými peptidy, které se uvolňují z nekrotických buněk do extracelulárních prostorů. Tyto nálezy vedly k vývoji komerčně dostupné vakcíny Oncophage (fy Antigenics, MA, USA), která je připravována z autologní nádorové tkáně pacienta.

Str. 22 (poslední odstavec) – doporučoval bych uvést koncentrace jednotlivých doplňků kultivačního média (glutaminu, merkaptoethanolu, antibiotik).

Str. 23 (1.odst.) - „Kontrola životnosti...“ – termín životnost se vztahuje k technické oblasti (př. životnost přístrojů); zde by bylo správněji „Kontrola viability...“, což je běžně užívaný termín při studiích *in vitro*)

Str. 23 a 23 - ve vzorcích by mělo být znaménko „*“ nahrazeno znaménkem pro násobení „x“

Str. 24 (1.odst.) – Autorka uvádí, že melanomové buňky B16-F10 byly aplikované v médiu RPMI 1640 bez séra. Nemůže samotné kultivační médium vyvolat nějakou lokální reakci, nebylo by vhodnější používat při resuspendování buněk před aplikací fyziologický roztok nebo PBS?

Str. 34 – Je konstatováno, že po proenzymoterapii byly prokázány změny v hladině některých metabolitů a korelace mezi velikostí nádorů a koncentrací metabolitů. Proč zde nejsou uvedené nějaké konkrétní výsledky?

Str. 35-40 – Kapitola 4.5 popisující výsledky průtokové cytometrie při optimalizaci cytotoxického testu a terapii nádorů pomocí PAMPs (LPS a FM) je psána z mého pohledu méně srozumitelně.

- Trochu mě překvapuje, že při optimalizaci cytotoxického testu zůstává patrně část melanomových (cílových) buněk po aplikaci DiO neoznačena (obr.6-kvadrant Q3). Je skutečně navržené snížení DiO (oproti doporučené koncentraci výrobcem) dostatečné na označení všech cílových buněk?
- Při porovnání Tab. III a Tab.IV jsou u jednotlivých kategorií buněk (T, TD, M, TDM) v některých kvadrantech značné rozdíly, přestože by si tyto části tabulek měly odpovídat. Co je toho příčinou?
- Grafy na obr.10-19 nepředstavují histogramy, jak se opakovaně zmiňuje v textu, ale jedná se o znázornění ve formě bodového grafu (dot plot). Co v grafech představuje gate P3?

Str. 37 - Autorka uvádí, že „U lypopolysacharidu se předpokládalo, že se integruje do membrán melanomových buněk“ a že FM „...se díky kladnému náboji lysinů váže k záporně nabitému povrchu nádorových buněk“. Z dosažených neuspokojivých výsledků uzavírá, že se nepodařilo prokázat atak makrofágů na melanomové buňky s navázanými PAMPs (str. 40). Není výsledný neúspěch daný tím, že k předpokládané vazbě LPS a FM na melanomové buňky z nějakých důvodů vůbec nedošlo? Nebylo by možné prokázat (např imunocytochemicky s použitím LPS označených nějakým fluorochromem), zda k vazbě skutečně dochází a v jakém rozsahu?

Str. 41 (2.odst.) – Opakovaně se zde (i na dalších místech) uvádí, že terapie snižovaly nebo zpomalovaly proliferaci nádorů. Tato formulace je nepřesná – proliferaci mohou vykazovat nádorové buňky, ale ne nádory. Navíc autorka žádný test na proliferaci neprováděla, takže je možné získané výsledky interpretovat pouze jako pomalejší zvětšování objemu nádorů. Ten sice může



odrážet změnu proliferace nádorových buněk, ale může být také způsobený např. zvýšenou destrukcí nádorových buněk vlivem aplikované látky.

Str. 43 (2.odst.) – Je konstatováno, že „*Sonikovaný volný Zymosan A měl na léčbu pouze minimální vliv, poměrně brzy přestal být účinný*“. Domnívám se, že autorka by měla přistupovat k dosaženým výsledkům (zde i na jiných místech práce) více kriticky. Na základě grafu na Obr. 22 lze (s ohledem na směrodatné odchytky) konstatovat, že Zymosan A neměl efekt na objem nádorů žádný.

Str. 45 (4.odst.) - Autorka uvádí, že „*Bylo získáno 180 000 údajů a v současné době stále probíhá jejich zpracování.*“ a dále (odst. 5) „*Věříme, že zpracování výsledků analýz, které zdaleka není ukončeno, přinese ještě další poznatky ...*“. Zmíněný rozsah práce je jistě úctihodný. Domnívám se ale, že pokud uvedené analýzy byly předmětem předložené práce, měly být provedené tak, aby byly včas ukončené a jejich výsledky do práce zahrnuté.

Str. 49-58 - V Seznamu použité literatury je nutné používat jednotný způsob citace odborných časopisů. Zde jsou někde použity plné názvy, někde zkratky časopisů (s tečkou ve zkratkách nebo bez ní), někde navíc za ročníkem časopisu v závorce ještě číslo časopisu.

Doporučoval bych rovněž vyvarovat se slangových laboratorních výrazů nebo počestlých anglických termínů (např. str. 23, 1.odst. – „*Médium z falkonek ...*“; str. 35 a jinde „*targetové buňky*“ lze nahradit českým ekvivalentem „*cílové buňky*“).

ZÁVĚR:

Přes všechny výše uvedené připomínky předložená diplomová práce nesporně splňuje podmínky, které jsou na takovýto typ práce kladené. Autorka prokázala velmi dobrou schopnost zpracovat rozsáhlý soubor odborné literatury, realizovala náročné pokusy na zvířatech, prakticky zvládla řadu laboratorních technik a přehledně zpracovala a interpretovala rozsáhlý soubor získaných výsledků.

Doporučuji proto přijmout diplomovou práci Bc. Hany Maršíkové k obhajobě a po úspěšném obhájení udělit autorce akademický titul „magistr“ (ve zkratce Mgr.).