

Oponentský posudek na diplomovou práci Bc. Markéty Šimčíkové *Studium metabolismu leukemických buněk ve vztahu k citlivosti na terapii* (Praha, 2015)

Tématem diplomové práce Bc. Markéty Šimčíkové je studium energetického metabolismu leukemických buněčných linií a případný vztah jejich základního energetického metabolického nastavení k citlivosti na L-asparaginázu, která se využívá jako součást protinádorové terapie akutní lymfoblastické leukémie u dětí. Problematika, které se práce věnuje, je relevantní a dlouhodobě silně reflektovaná kvůli svému značnému významu v klinické praxi.

Autorka ve své práci konkrétně zkoumala klíčové parametry glykolýzy a oxidativní fosforylace u 19 leukemických buněčných linií, které zahrnují modelové linie ALL, T-ALL, AML a CML v blastickém zvratu. Zjišťovala rovněž obsah mitochondrií v buňkách a velikost buněk a dále expresi vybraných genů kódujících enzymy účastnící se procesu glykolýzy, membránové transportéry monosacharidů a derivátů karboxylových kyselin a enzym asparagin syntetázu. Naměřená data autorka korelovala mezi sebou a rovněž se změřenou citlivostí buněk vůči L-asparagináze. Autorka zjistila, že citlivost leukemických buněk k L-asparagináze pozitivně koreluje s některými parametry jejich glykolytické aktivity (platí zejména pro ALL buněčné linie).

Diplomová práce se klasicky člení na literární úvod, cíle práce, výčet použitých metod, přehled dosažených výsledků, diskusi, závěr a seznam použité literatury. Celá práce je psána přehledně, srozumitelně, je vybavena seznamem použitých zkratk a splňuje veškeré další formální náležitosti. V práci jsem našel pouze naprosté minimum gramatických chyb nebo jiných nedostatků formálního rázu.

Literární úvod je z větší části věnován popisu leukémií jako onemocnění a jejich léčbě včetně role L-asparaginázy. Menší část pak tvoří teoretické představení problematiky metabolismu leukemických buněk se zaměřením na roli glykolýzy. Tato část by mohla být i obsáhlejší. Jednotlivé části úvodu na sebe logicky navazují, text se čte dobře, po věcné stránce k němu nemám výhrady. Autorce bych si nicméně dovolil vytknout poměrně časté odkazy na review, články v popularizačních časopisech nebo na učebnice na úkor odkazů k původním pracím.

Cíle práce jsou relevantní, zajímavé, jasně stanovené a autorka zároveň ihned představuje způsoby, jak jich dosáhnout.

Kapitola Metody je zpracována kvalitně a způsobem, který prozrazuje jak zaujetí autorky pro práci v laboratoři tak její hlubší pochopení popisovaných metod. Metody jsou popsány tak, že diplomovou práci bude možné používat jako návod. Rejstřík metod, které autorka pro řešení cílů své práce využila, je podle mého soudu na diplomovou práci nadprůměrný. Jedinou malou připomínkou k této kapitole je postrádaný podrobnější popis devatenácti buněčných linií, které tvoří biologický materiál použitý ve všech experimentech.

Kapitola Výsledky představuje rozsáhlou prezentaci (33 obrázků) autorkou získaných dat zakončenou jejich korelačními analýzami. Jde o mimořádně kvalitně zpracovanou kapitolu, která pouze podtrhuje velmi dobrý dojem z autorčina přístupu k vědecké práci v laboratoři, který čtenář získá již při čtení předchozích kapitol. Data jsou prezentována a popsána jasným způsobem, experimenty jsou postaveny robustně a k jejich provedení přistoupila autorka s velkou pečlivostí (např. normalizace expresních dat na průměr exprese pěti host-keeping genů). Množství vykonané práce v laboratoři je opravdu úctyhodné, tím spíše, bereme-li do úvahy i značný rozsah nutné „rutinní“ práce např. při pasážování 19 buněčných linií. Všechny experimenty vycházejí ze stanovených cílů práce a přinášejí pro ně relevantní výsledky.

V kapitole Diskuze se autorka vrací k zjištěným výsledkům a předkládá jejich interpretaci. Zde by práci posloužilo větší srovnání se závěry jiných autorů. Samotná úroveň analýzy získaných dat je dobrá.

Závěr práce je napsán věcně a srozumitelně, autorka zodpověděla otázky, které si v úvodu kladla, a nepochybně splnila vytyčené cíle práce.

Celkově, přes dílčí připomínky týkající se práce s odbornou literaturou, hodnotím předloženou diplomovou práci jako velmi kvalitní, obsahově bohatou a čtenářsky osvěžující. Autorka splnila vytyčené cíle a shromáždila výsledky v rozsahu, který podle mého názoru výrazně překračuje požadavky kladené na diplomové práce a který svědčí o jejím zaujetí vědou a metodami molekulární biologie i biochemie (a jejich hlubšímu porozumění).

Autorce, Bc. Markétě Šimčíkové bych si v diskusi dovolil položit několik otázek:

1) Z metodické kapitoly 3.5.4. qRT-PCR vyplývá, že k stanovní exprese většiny genů byly použity TaqMan eseje. Při amplifikaci několika genů nicméně byla použita dsDNA-vazebná barvička SybrGreen resp. Platinum Taq DNA polymeráza s komerčně dodávanými primery a sondami. Jaký byl důvod rozdílných způsobů provedení qRT-PCR? Byla ověřena kvalita dodaných primerů resp. správný průběh amplifikace?

2) Při měření parametrů glykolýzy bylo napřed stanoveno bazální okyselení média bez substrátů a na konec měření pak hodnota ECAR po kompletní inhibici glykolýzy pomocí 2-DG. Byly tyto hodnoty stejné nebo podobné?

3) Do měření parametrů oxidativní fosforylace nebyla zahrnuta buněčná linie SUP-B15. Šťouravě se dovoluji zeptat, z jakého důvodu?

4) Při korelační analýze dat byly většinou poměřovány parametry shromážděné pro celou skupinu 19 buněčných linií dohromady. Získané výsledky Vaší práce i prací některých dalších autorů naznačují, že by se mohly odhalit zajímavé skutečnosti při posuzování lymfoidních a myeloidních leukemických linií zvláště (zejména se zaměřením na ALL buněčné linie). Co si o tom myslíte?

5) Na straně 15 v Úvodu citujete práci Herst et al., 2011 prokazující vztah mezi glykolytickou aktivitou leukemických buněk a rezistencí pacientů s AML na léčiva (ATRA, ATO). Ačkoliv formálně citujete správně, článek říká, že navzdory vyšší rezistenci na léky u pacientů s vysokým glykolytickým metabolismem dosahují tito pacienti při indukční terapii paradoxně lepších klinických výsledků než pacienti s mírnějším glykolytickým metabolismem. Ví se, jak je tomu u pacientů s ALL? Existují již studie vztahu glykolytického metabolismu u pacientů s ALL k prognóze jejich onemocnění?

6) Ve své práci jste studovala a prokázala vztah citlivosti leukemických buněk na L-asparaginázu k jejich bazálnímu metabolickému nastavení. Prokázal se také nějaký přímý účinek L-asparaginázy na studované metabolické pochody?

RNDr. Nikola Čuřík, Ph.D,

V Praze 11. 9. 2015