

OPONENTSKÝ POSUDEK NA MAGISTERSKOU DIPLOMOVOU PRÁCI

Název práce: **Protinádorová terapie založená na instalaci manózy na povrch nádorových buněk**

Autorka práce: **Bc. Veronika Maierová**

Oponent: *Ing. Eva Pokorná, CSc.*

Tato práce měla za cíl optimalizovat použití manózy kotvené na nádorové buňky myšího melanomu B16-F10 a tak označit tyto buňky složkám imunitního systému jako buňky určené k likvidaci. Protože se jedná o dosud nepříliš používaný přístup, bylo třeba zkoušet různé kombinace s dalšími látkami a způsoby kotvení. K tomu přispěly čtyři dílčí studie, které práce obsahuje. V páté dílčí studii pak autorka navazuje na empirické sledování růstu nádoru pomocí metodiky analýzy jednotlivých buněčných složek přítomných v nádoru průtokovou cytometrií. Hlavním cílem práce tedy bylo najít nejvhodnější způsob, jak pomocí imunoterapie brzdit nebo dokonce zastavit růst nádoru.

Magisterská práce má členění typické pro odbornou vědeckou práci. Stejně jako u bakalářské práce této autorky, kterou jsem také oponovala, musím vyzdvihnout velmi dobře zpracovaný „Úvod“, který je napsaný srozumitelně, jasně, dostatečně podrobně a velmi dobře se čte. Tato kapitola čtenáři rovněž dobře vysvětlí souvislosti mezi následujícími metodikami a proč a za jakým účelem byly prováděny. Ke kapitole Úvod nemám v podstatě žádné ani drobné připomínky. Další kapitoly tj. „Materiál a metody“, „Výsledky“ a „Diskuze“ jsou provedeny podle všech pravidel vědeckých prací. Přehled použité literatury je rozsahem i kvalitou velmi dobrý.

K práci mám následující připomínky řazené podle závažnosti od více k méně důležitým:

1. I když znám příčinu, proč tomu tak bylo, musím připomenout, že počet zvířat v pokusné skupině 5 nebo 6ks je malý a pro důvěryhodné statistické vyhodnocení nedostatečný.
2. Na obrázku č. 10 na str. 44 je modře znázorněn počet myší po aplikaci LPS, u kterých se objevily plicní metastázy. Není mi jasné a nikde není v práci popsáno, jak se mohlo stát, že právě 1,2 myši měly plicní metastázy. Jinými slovy, jak může, pokud vycházíme z celkového počtu myší 6 ve skupině, jak je uvedeno v Metodikách, mít 20% myší metastázy.
3. Myslím, že studie by měly být pro vyšší věrohodnost doplněny užitím stejných kombinací imunoterapeutických metodik ještě u jiných typů nádorů, např. u myšího karcinomu mléčné žlázy, nebo i lidských nádorových buněčných linií.
4. Obecně se mi nezdá úplně nejpřehlednější spojení křivek doby přežívání do jednoho grafu, protože např. na str. 48, obr. 14 se všechny barvy často překrývají, program je nedokáže ukázat vedle sebe a tak je vždy vidět jen jedna. Ostatní můžeme jen tušit a velmi těžko se v nich orientuje. Je to tak u všech grafů sledujících dobu přežití v práci,

ale výše zmíněný se mi nepodařilo dešifrovat vůbec, protože jsem nepoznala, kudy vede červená křivka znázorňující kombinaci manan-SMCC/R.

5. V kapitole Diskuze na str. 61 v odstavci, který začíná „Dosavadní výsledky... na 5. řádku je věta „Tak jsme se ... až po závěr odstavce ... toxická (Glaserová, 2012). Jedná se jen o drobnou připomínku z mé strany. Tato jediná část z celého textu se mi nezdá úplně srozumitelně formulovaná.

K práci mám následující otázky:

1. Ke kapitole 3.10.4. – Proč nebyla testována také skupina manan-BAM in flagelin + beta glukan? Myslíte, že by to mohlo přinést nějakou další zajímavou informaci? Proč nebyl beta glukan podáván rovněž i.t., ale perorálně? Můžete mi, prosím, více vysvětlit, proč jste použili právě beta glukan jako doplněk ke kombinaci manan-BAM in LPS.
2. Ke kapitole 4.1 – Vysvětlete prosím více, proč je možné, že působí samotné LPS nebo samostatná manóza lépe než jejich kombinace? Proč tedy pro terapii není výhodnější použít samostatné LPS (u myši), když jeho použití vykazuje nejlepší výsledky?
3. Nepodařilo se mi přesně pochopit rozdíly mezi pulzní a nepulzní terapií. Mohla byste je, prosím, stručně a jasně shrnout?
4. Jak probíhal princip navázání jednotlivých látek v daných kombinacích? Měli jste nějakou kontrolu, že opravdu k jejich navázání došlo nebo se jednalo o smíchání roztoků?
5. Můžete podrobněji pohovořit o závěrech průtokové cytometrie, než bylo popsáno v diskuzi? Např. jestli výsledky přinesly nějaké odlišnosti od běžné imunitní reakce a jestli po aplikaci imunoterapie došlo oproti očekávání k navýšení některých buněčných frakcí?
6. Proč jste alespoň v jedné dílčí studii nezkusili začít terapii u zvířat s již pokročilejším stadiem onemocnění, tak aby to simulovalo více situací, která je v současné medicíně ještě nevládnutá.
7. Plánujete v ověřování některých hypotéz vyplývajících z výsledků, uvedených v diskuzi, v budoucnu pokračovat nebo touto prací danou problematiku uzavřete?

Pochvala:

Za dobře zvládnuté pochopení nelehké metodiky průtokové cytometrie a hlavně vyhodnocování výsledků z ní plynoucích.

Za velmi dobře zpracovaný Úvod.


Práce je napsaná velmi hezkou a srozumitelnou češtinou, což nebývá zvykem. Čtenář se nemusí nikde ani jednou zastavit a číst větu dvakrát či třikrát, než jí pochopí. To bych chtěla vyzdvihnout, protože je to dle mého názoru základem profesionálního psaní nejen odborných prací. (několik hrubých chyb např. str. 5 – všemy typy, nebo str. 28 – vyplívá, nebo str. 29 – vykazovali, považují za překlepy).

Závěr:

Jednalo se zatím o nejlepší práci, jakou jsem měla u vás možnost oponovat, proto jednoznačně doporučuji, aby byla přijata k obhajobě. Práce i přes výše uvedené drobné

připomínky splňuje veškeré požadavky kladené na magisterskou práci a odráží velký pokrok ve zpracování tématu, který autorka udělala od doby obhajoby bakalářské práce. Autorka prokázala, že je schopná samostatně zpracovat zadanou problematiku v teoretické i praktické rovině.

V Praze dne 21.1.2013


Ing. Eva Pokorná, CSc.

Oponentský posudek na magisterskou diplomovou práci Veroniky Maierové „Protinádorová imunoterapie založená na instalaci manózy na povrch nádorových buněk“

Veronika Maierová předložila diplomovou práci řešící problematiku léčby myšího melanomu pomocí intratumorální aplikace různých derivátů manózy. Tyto molekuly mají sloužit jako agonisté fagocytárních receptorů a spolu s vybranými TLR ligandy mají aktivovat protinádorovou imunitu in situ. Autorka se snažila najít optimální kombinaci chemické úpravy manózy a časového schématu léčby tak, aby u myší s rozvinutým melanomem došlo k vymizení primárního nádoru, zabránění metastáz a významného prodloužení doby přežití. Práce je součástí širšího výzkumu terapie nádorů, který pod vedením Dr. Ženky probíhá už několik let. Uzavírá některé otázky řešené v předchozích diplomových pracích a zároveň otevírá další kapitoly výzkumu.

Práce je psána dobrou češtinou s únosným množstvím překlepů a gramatických chyb, na tomto místě zmíním jen ty, které se vyskytují opakovaně:

- a) MHC I/II se píše bez tečky
- b) místo slova „předpokus“ doporučuji užívat spíš termín „pilotní pokus/experiment“
- c) pravidla českého pravopisu vyžadují skloňování, event. přechylování cizích jmen a příjmení. Je třeba tedy psát např. „aminace metodou dle Trosantuccia/ové“
- d) pravidla psaní čárek, zejména před „který“, „a to“ atd.

Literární úvod do problematiky je velmi obširný a čítá 28 stran textu. Dlužno dodat, že zejména vzhledem k délce diskuze je takto podrobný úvod spíše na škodu, práce pak působí nevyváženě. Přitom k jádru Vašeho projektu, tj. imunoterapii nádorů, se dostáváte až na str. 22. Cíle práce jsou dobře formulované, metodika pečlivě zpracovaná a výsledková část poměrně přehledná. Naopak diskuzi na necelých 3 stránkách považuji za poněkud úspornou a bývalo by stálo za to věnovat jí více pozornosti (na úkor úvodu). Práci zakončuje seznam literatury čítající slušných 87 pramenů.

Tolik k formální stránce. Na autorku mám následující dotazy a faktické připomínky:

1. str. 24: Uveďte příklad tumor-specifického antigenu, který vznikl jako vedlejší produkt genomické nestability nádorových buněk.
2. str. 25: Tvzení „Vytvářejí se nádorové vakcíny a zkouší se adoptivní imunoterapie geneticky modifikovanými T lymfocyty“ doložte citací původních publikací.
3. str. 25: Nesouhlasím s tvrzením, že existují pouze 2 fenotypy Th lymfocytů. Uveďte prosím toto na pravou míru. Jsou známy asociace dalších subtypů Th buněk s nádory?
4. str. 38: Vysvětlíte prosím větu „...bylo provedeno srovnání s negativní kontrolou, a to pro každý vzorek nádoru, aby byla vyloučena možnost nespecifického navázání MoAbs na povrch buněk.“ Co sloužilo jako negativní kontrola?
5. str. 43, Obr. 8: Jak si vysvětlujete klesající trend teploty myší pozorovaný ve všech skupinách myší včetně kontrol?
6. V pokusu popsáném v kapitole 4.4 jste dosáhla velmi výrazného účinku po šesti dávkách manan-BAM. V pokusu pro fenotypizaci pomocí FACC však byla aplikována pouze 1

dávka v čase 0 h. Proč nebyly vzhledem k designu pokusu aplikovány alespoň 3 terapeutické dávky v časech 0-1-2 h?

7. Ve skupině léčené LPS 48 h po aplikaci jste naměřila cca 20 tis. CD3+ pozitivních buněk, tj. T lymfocytů na 1 mm³ nádorové tkáně. Z toho je cca 4900 CD4+ buněk a 1400 CD8+ buněk. Co představuje zbylých více jak 13 tis. dvojitě negativních (CD4-CD8-) T lymfocytů?
8. str. 62: Domnívám se, že buňky nesoucí CD4 glykoprotein nemusí být nutně jenom pomocné T lymfocyty. Které další buňky mohou nést tento znak? Jak jste došla k závěru, že Tc lymfocytů bylo dvakrát méně než Th lymfocytů?

Celkový dojem: Přes uvedené nedostatky a připomínky považuji předloženou magisterskou diplomovou práci Veroniky Maierové za celkem zdařilou a plně vyhovující požadavkům Přírodovědecké fakulty Jihočeské univerzity a **doporučuji** ji proto k obhajobě.

V Českých Budějovicích 15. ledna 2013


RNDr. Helena Langhansová, Ph.D.