

Bc. Petra Divoká: Histologická analýza terapie melanomu B16-F10 pomocí agonistů TLRs a fagocytárních receptorů

(75 stran textu, 152 citací, 33 obrázků, 6 histogramů, 6 tabulek v textu, 15 příloh)

Předložená práce má za cíl přispět k objasnění působení agonistů TLR a fagocytárních receptorů na melanom B16-F10 s využitím histologické analýzy. Toto zadání je z vědeckého hlediska optimální- míří na relativně vysoké cíle, výzkum je dostatečně průkopnický (byť navazuje na práci týmu školitele), téma je také dostatečně atraktivní, metody dostupné a především výsledky jsou potenciálně důležité pro medicínu v návaznosti na zdraví člověka. Problematika nádorů (speciálně melanomů) je v současné době víc než aktuální, neboť jejich výskyt v lidské populaci stoupá i přes výrazné pokroky moderní medicíny. Jakýkoliv pokrok v této oblasti má pro člověka velký význam.

Petra Divoká nás v úvodní části komplexně a neváhám použít termínu mohutně (na 41 stranách) uvádí- krok za krokem- do celé problematiky. Celý tento úvod doplnila autorka velkým počtem převzatých obrázků (v počtu 26, často složených ze dvou; zdroj každého obrázku je řádně citován), což je ale podle mého názoru u této práce- pro porozumění náročné problematice- výhodou.

Cíle práce si autorka dala dosti vysoké. Jak se ale ukazuje, tak dosažitelné. Velkou výhodou je zde nasazení klasických histologických technik, které umožnily dostatečné vyhodnocení složitých experimentů.

Kapitola "Materiál and metodika" (k některým lingvistickým lahůdkám se vyjádřím později) podrobně popisuje na 7 stránkách všechny použité techniky (jen podrobnosti ke statistickému zpracování dat jsem tu nenašel) a to jak týkající se pokusných myší, přípravy roztoků aplikovaných při terapii, kultivace buněčné linie melanomu, hodnocení nádorů a histologických studií.

V kapitolách "Výsledky" (na 11 stranách včetně obrázků) a „Diskuse“ (2 strany) Petra Divoká předkládá a komentuje to, čeho se jí podařilo v diplomové práci dosáhnout.

Úsporným jazykem představuje výsledky, vyhodnocuje je a diskutuje. Vysoce hodnotím jak experimentální část práce týkající se nádorů, tak histologické vyhodnocení experimentů (podpořené dobře vybranými 50 originálními histologickými obrázky).

V závěrech práce Petra Divoká konstatuje, že výsledky její práce potvrdily skutečnost, že „dříve pozorovaná silná synergie působení LPS (aktivace TLR4) a aktivace fagocytárních receptorů ligandy kotvenými na nádorové buňky nachází na histologické úrovni vysvětlení v podobě rozsáhlé nekrotizace nádorové masy“. Mohu konstatovat, že se cíle práce podařilo splnit. Hodnotím také aktuálnost tématu a význam výsledků pro směřování dalších výzkumů v oboru imunoterapie nádorů.

Seznam literatury obsahuje 152 citací (odpovídajících mezinárodnímu standardu) pokrývajících aktuální stav oboru. Práce je zakončena přílohou s obrázky.

Musím konstatovat, že jsem v práci nenašel závažné chyby a nedostatky, které by zásadně snižovaly úroveň práce. Přesto bych chtěl upozornit na některé nepřesnosti a diskutabilní skutečnosti především formálního charakteru:

- Celá práce je v češtině. Přesto obsahuje na mnoha místech anglické termíny, což by mi zase tak nevadilo, kdyby nebyly z hlediska české gramatiky nevhodně použity. Uvedu jen pár markantních příkladů: „Barveno toluidine blue metodou“, „Histologicky objasnil maligní melanom Wallace Clark a kolegové na superficial spreading type (SSMs), lentigo malignant type, and nodular type.42“, „K této infekci je vysoce suscibilní“, už zmíněný "Materiál and metodika" a další.
- Občas se zde nacházejí termíny vzniklé chybným nebo nešikovným překladem jako například „poprašky zbytků jader granulocytů“, „kulatobuněčnou zanětlivou celulizací“, „nález kulatobuněčných buněk“, „porovnání monosložkových látek atd.
- Dobré by bylo také odstranit nepřesnosti typu: „Nacházejí se u mikrobů jako jsou viry, bakterie, paraziti a plísňe“.
- Škoda, že v příloze 11 je absence kontroly; vysvětleno je nedostatkem materiálu.
- Autorkou bylo navrženo několik zdokonalení pro obdobné následující studie. Petra píše, cituji: „Pro následující studium bych velice doporučovala při histologických studiích aplikovat imunologické značení infiltrovaných imunitních buněk příslušnými antigeny. Pak by již potřeba odborné konzultace s patologickým oddělením nemocnice nebyla nutná. Pro studium z histologických preparátů bych poté doporučila histologickou analýzu barevných fází v programu QuickPhoto Micro. Tím by se toto zpracování velice urychlilo. Navíc by se dal vcestovalý infiltrát (nabuzené buňky imunitního systému) přesně kvantifikovat a případně lokalizovat v rámci melanomu

(jestli se vyskytují pouze v blízkosti cév nebo přímo atakují ligandy fagocytárních receptorů značené nádorové buňky). Takto zpracované histologické vzorky by se staly hlavním jasně prokazatelným důkazem účinku léčby“. Dovolil bych si také jedno doporučení: K parafinovým řezům by nebylo tak těžké paralelně zalít vzorky i do pryskyřic pro EM a zhotovit poloténkové řezy (o tloušťce 0,5 nebo 1 μm); histologická úroveň práce by se zvýšila a bylo by možné ji doplnit i o některé cytologické detaily. Navíc by byly tkáně připraveny pro pozdější elektronově mikroskopické studie, které logicky navážou- a nejen pro studie deskriptivní, ale i pro imunoelektronově mikroskopické studie.

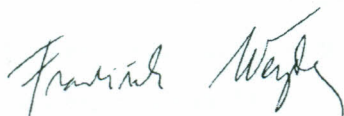
- Pro případnou publikaci by bylo vhodné doplnit výsledky statistickou analýzou- zde to není moc zdůrazněno.

Nicméně jde zde především o formální nedostatky, které nesnižují vysokou úroveň této diplomové práce. Upozorňuji na ně především pro případ publikování například vědecko populární práce. Samozřejmě doporučuji práci k opublikování ve vědeckém časopise (nejspíš po upřesnění některých partií).

Závěr

V celkovém hodnocení předložené magisterské práce mohu konstatovat, že Petra Divoká problematiku zvládla a splnila všechna kritéria PřF JU na magisterskou práci. Studentka zde prokázala schopnost samostatné vědecké práce i na obtížné tématice.

Práci Bc. Petry Divoké: „: Histologická analýza terapie melanomu B16-F10 pomocí agonistů TLRs a fagocytárních receptorů“ doporučuji přijmout jako magisterskou diplomovou práci.



Doc.RNDr.František Weyda,CSc.

Přírodovědecká fakulta JČU (katedra medicínské biologie)

České Budějovice, 26. května 2014

OPONENTSKÝ POSUDEK NA DIPLOMOVOU PRÁCI

Název práce: **Histologická analýza terapie melanomu B16-F10 pomocí agonistů TLRs a fagocytárních receptorů**

Autor práce: Bc. Petra Divoká

Oponent: Ing. Eva Pokorná, CSc.

Předložená práce přináší další poznatky přispívající k objasnění působení ligandů TLR a fagocytárních receptorů v léčbě myšího melanomu B16-F10. Mechanismus těchto účinků byl studován pomocí histologických analýz. Tyto analýzy pomohly potvrdit a vysvětlit proces rozsáhlé nekrotizace nádorové masy a tím i prokázat vysokou účinnost působení výše uvedené imunoterapie.

Tato tematika je velmi aktuální, protože by mohla v budoucnu pomáhat v klinické léčbě nádorů, která, jak všichni víme, má stále ještě své velké rezervy.

Soubor prostudované literatury je vyčerpávající a dostatečně využitý v úvodu i v diskuzi. Všechny části práce jsou dobře zpracované, seřazené ve správném pořadí a splňují všechny formální požadavky kladené na odbornou práci.

Kladně hodnotím nápad pozorovat procesy, které se odehrávají v nádoru po podání terapeutické látky formou histologické analýzy. Po stránce odborné je tedy práce velmi zajímavá a přínosná.

K práci mám následující připomínky:

- 1) Na str. 34, kapitola 3.5.10. není potřeba znovu zavádět zkratky PRRs a TLR, které už byly zavedeny dříve na str. 25 a několikrát byly v textu použity.
- 2) Na str. 55 je špatně uvedeno číslo kapitoly, není to kapitola 6.2, jak je uvedeno, ale 7.2.
- 3) Na str. 57 došlo k záměně popisu obrázku č. 31.
- 4) Na str. 58 – popis obrázku č. 32 – chybí popis skupiny LAM (který rovněž chybí u předchozího obrázku), takže se vysvětlení zkratky LAM špatně v práci hledá.
- 5) Na stranu 55 do kapitoly 6.2 bych přidala graf objemu nádorů, tak, jak je uveden u předchozího pokusu na str. 51 u kapitoly 7.1, protože by přispěl k lepšímu popisu a tím i pochopení účinků jednotlivých látek.
- 6) V příloze 2 je část popisu tabulky česky a část anglicky. Popis by měl být jednotný, v tomto případě český, protože celá práce je v češtině.
- 7) Práce obsahuje velké množství překlepů a chyb v češtině, které v jiných pracích vždy považuji za drobnou běžnou formalitu a nepřikládám jim žádný význam. Tato práce jich ale obsahuje takové množství, že bych ráda upozornila autorku na to, aby příště věnovala větší pozornost kontrole, protože po odborné stránce je práce velmi pěkná a zajímavá a toto jí trochu kazí.

K práci mám následující otázky:

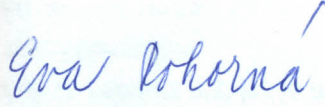
- 1) Umíte (např. z literatury) vysvětlit mechanismus, který při progresi nádoru spouští dilataci cév a neovaskularizaci?

- 2) Jaký je rozdíl v příloze 8 (str. 88) v obrázku LAM5 a LAM6? Popis je téměř stejný, obsah a výsledek naprosto odlišný. Není mi jasný popis LAM5 – melanom 72hod 24hod po terapii 0,2mM laminarinem-BAM v LPS.
- 3) Jak si vysvětlujete, proč je ložisko na str. 59 prokrváčené?
- 4) Jak by se dalo vysvětlit, proč se změnil při použití LAM poměr infiltrátu ve prospěch neutrofilů?
- 5) V diskuzi na str. 62 popisujete, že „jsme prokázali pomocí histologie a průtokové cytometrie účinky LPS“ (odstavec 4, řádek 4). Kdo zde prováděl průtokovou cytometrii? Měl by zde být uveden odkaz na autora, protože podle předložené práce jste to Vy nebyla.
- 6) Můžete říci více o rozsáhlých mokvajících ložiscích v místech původního nádoru u myši? Máte pro tento úkaz vysvětlení?
- 7) Tato otázka směřuje k diskuzi na str. 62 ke čtvrtému odstavci: zabývá se podobným zacílením ataku na úrovni vrozené imunity v současné době ještě nějaká jiná vědecká skupina ve světě?
- 8) Můžete shrnout z výsledků Vašich kolegyň, jestli se už podařilo účinně nahradit LPS nějakou jinou, pro člověka netoxickou látkou (jak navrhuje v závěru diskuze)?

Závěr:

Jedná se o velmi zajímavou a dobře zpracovanou diplomovou práci (až na chyby a překlepy v češtině). Autorka prokázala, že je schopná samostatně řešit zadanou problematiku po stránce teoretické i praktické. Proto doporučuji, aby předložená práce byla přijata k obhajobě.

V Praze dne 22.5.2014


Ing. Eva Pokorná, CSc.