



RNDr. Vratislav Horák, CSc.

**Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v.v.i.**

**Laboratoř biologie nádorů**

Rumburská 89, 277 21 Liběchov

tel.: 315 639 587

fax: 315 639 510

E-mail: horakv@iapg.cas.cz

URL <http://www.iapg.cas.cz>

## OPONENTSKÝ POSUDEK

### MAGISTERSKÉ DIPLOMOVÉ PRÁCE

**Název:** Použití agonistů FPR receptorů pro terapii nádorových onemocnění

**Autor:** Bc. Veronika Caisová

Imunoterapie nádorových onemocnění představuje v současné době díky cílenému působení buněk imunitního systému na nádorové buňky velmi nadějný směr pro onkologické pacienty. Obvykle je experimentálně sledována nebo již i klinicky využívána aktivace různých typů buněk specifické imunity. Nové experimentální studie, které by přinesly další informace aplikovatelné v imunoterapeutické oblasti, jsou velmi žádoucí. Předložená diplomová práce se zabývá zajímavou možností imunoterapie nádorů cíleným označením nádorových buněk pomocí f-MLF motivů, které jsou rozpoznány membránovými formyl peptidovými receptory buněk nespecifické imunity, což vede následně k jejich aktivaci a reakci proti nádorovým buňkám. V kontextu se výše zmíněným trendem považují předloženou magisterskou diplomovou práci za velmi aktuální a zajímavou.

Práce má klasické členění. Úvodní literární přehled, který představuje zhruba třetinu celé práce, přináší podrobné informace o nádorové problematice, o vztahu buněk imunitního systému k nádorovým buňkám a především o otázkách imunoterapie nádorů v souvislosti s buňkami nespecifické imunity. Přehledné uspořádání a značný rozsah této části práce jasně dokládá velmi dobrou orientaci autorky ve studované problematice. Cíle práce jsou krátce, jasně a srozumitelně definované. Následující část práce uvádí použitý materiál, přípravu obou myších nádorových modelů a různých terapeutických látek a podrobně popisuje provedení jednotlivých pokusů. Dosažené výsledky všech sedmi realizovaných pokusů a analýz jsou prezentované obvykle formou sloupcových grafů (s vyznačením směrodatné odchylky a statistické průkaznosti), které jsou doplněné jejich krátkým vysvětlením. V diskusi autorka probírá podrobněji výsledky pokusů a dává je do souvislosti s publikovanými literárními údaji. V následující části jsou v rozsahu jedné strany shrnuty a jasně formulovány hlavní závěry z jednotlivých pokusů. Na konci diplomové práce je uvedena použitá odborná literatura, která je citována obvyklým způsobem.



RNDr. Vratislav Horák, CSc.

Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v.v.i.

Laboratoř biologie nádorů

Rumburská 89, 277 21 Liběchov

tel.: 315 639 587

fax: 315 639 510

E-mail: horakv@iapg.cas.cz

URL <http://www.iapg.cas.cz>

K posuzované diplomové práci mám následující připomínky a dotazy:

1. Použití zkratky „FPR“ (formyl peptidové receptory) následované výrazem „receptorů“ v názvu práce je poněkud nesmyslné. Pokud je to možné, doporučoval bych vyhnout se používání zkratk v názvu.
2. Literární přehled se důkladně zabývá různými (celkem známými) aspekty nádorové problematiky a možnostmi imunoterapie založenými na specifické a především nespecifické imunitě (PAMPs, PRRs, FPRs). Nikde jsem ale nenašel vysvětleny principy, ze kterých předložená práce vychází (např. z jakého důvodu byly vybrány testované látky, jak se liší jejich vazba na FPRs resp. jak odlišně mají fungovat různě připravené terapeutické látky, jak se liší kotvení f-MLF pomocí BAM nebo DOPE na nádorové buňky a jaký to má mít vliv na růst nádorů apod.).
3. Co je to za zkratky STE a f-MLFG<sub>6</sub>K a za léčebnou látku f-MLF-(G)5-(K)10-STE? Tyto zkratky ani příprava látky nejsou na odpovídajících str. 22-23 a str. 26 (ani nikde jinde) vysvětlené.
4. Str. 24: Jsou skutečně buňky sarkomové linie S-180 neadherentní? Osobně s těmito buňkami nemám žádnou zkušenost, ale podle údajů společností ATCC i ECACC, které tyto buňky distribuují, se má jednat o adherentní buňky.
5. Str. 26: Na základě jakých protokolů byla provedena příprava jednotlivých terapeutických látek?
6. Str. 26: Kam a v jaké dávce byl aplikován 50 mM roztok TCEP v PBS? Je skutečně aplikace tohoto redukčního činidla 1 hod. před injekcí f-MLF KK-SMMC dostatečnou zárukou toho, že dojde k vazbě terapeutické látky na všechny nádorové buňky?
7. Str. 27-30: Na základě čeho byly zvolené dávky jednotlivých terapeutických látek a časový harmonogram jejich aplikace?
8. Proč byla pro léčbu sarkomu použita látka f-MLF-(G)5-(K)10-STE a pro léčbu melanomu látka f-MLF KK-SMMC?
9. Str. 39 a 41 – Pokus 5.2:
  - a. Tab. V. uvádí aplikační režim látky f-MLF KK-SMMC + LPS při léčbě melanomu u skupiny II. do 14. dne terapie. Z Obr. 7 je ale patrné, že některá pokusná zvířata z této skupiny přežívala ještě po 30. - 40. dnu terapie. Znamená to, že se u těchto



RNDr. Vratislav Horák, CSc.

**Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v.v.i.**  
**Laboratoř biologie nádorů**

Rumburská 89, 277 21 Liběchov

tel.: 315 639 587

fax: 315 639 510

E-mail: horakv@iapg.cas.cz

URL <http://www.iapg.cas.cz>

zvířat nádor po 14. dnu terapie již znovu neobjevil a tak nebylo nutné léčebnou látku aplikovat? Co pak bylo příčinou úhynu těchto jedinců?

- b. Aplikační schéma bylo u každého z pěti pokusných zvířat zcela jiné v závislosti na vymizení a znovu objevení nádoru. Jak se dá takováto výrazná individuální dynamika v chování nádoru vysvětlit, když se jedná o myši inbrední linie? Co se dělo s nádorovými buňkami, jak unikaly účinku léčebné látky resp. aktivovaným imunitním buňkám, aby pak byly schopné opakovaně dát vznik rostoucímu nádoru?

10. Str. 49 – Pokus 5.6:

- a. Proč byla v tomto pokusu při sledování přítomnosti jednotlivých subpopulací lymfocytů v melanomu průtokovou cytometrií použita zase jiná látka (f-MLF-BAM), než která byla již úspěšně testována v některém z předchozích pokusů (např. f-MLF-KK-BAM v kombinaci s LPS v pokusu 5.4)?
- b. Jak lze vysvětlit změny v počtu různých subpopulací lymfocytů u skupiny II, které byla aplikována samotná látka f-MLF-BAM, když aplikace f-MLF motivů má vést k aktivaci buněk nespecifické imunity?

11. Str. 53 - Pokus 5.7: Proč byl v tomto pokusu použit jako ligand f-MLF-DOPE, kdežto v předchozím pokusu 5.6, na který by tento měl logicky navazovat, byla použita látka f-MLF-BAM?

12. Str. 58: Když je přežití jedné kontrolní myši v pokusu 5.1. interpretováno jako spontánní regrese nádoru v důsledku unikátní mutace, nemůže se na přežívání některých jedinců z pokusných skupin (nebo na částečné redukci nádoru) uplatnit také tento fenomén? Uvedená skutečnost ukazuje na nutnost užívání výrazně většího počtu zvířat v jednotlivých skupinách, než bylo použito v předložené práci.

13. Jak je možné vysvětlit, že se výrazný efekt různých testovaných látek v kombinaci s LPS (což vedlo k supresi růstu nádorů nebo k jejich úplnému vymizení) nijak pozitivně neprojevil na délce přežívání pokusných zvířat?

14. V práci je řada drobnější nepřesností (např. str.20 – ř.12-13: „... uvolnění granulocytů z neutrofilů ...“ - má být: ... uvolnění granúl z neutrofilů...) nebo překlepů (str. 8 – TAA: ř.5 – „... PSA je serinová proteáza.“ – má být proteáza – způsobeno automatickou opravou), které žádným způsobem nesnižují kvalitu předložené práce.



RNDr. Vratislav Horák, CSc.

**Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v.v.i.**

**Laboratoř biologie nádorů**

Rumburská 89, 277 21 Liběchov

tel.: 315 639 587

fax: 315 639 510

E-mail: horakv@iapg.cas.cz

URL <http://www.iapg.cas.cz>

## ZÁVĚR:

Magisterská diplomová práce Bc. Veroniky Caisové představuje počtem realizovaných pokusů značně rozsáhlý objem experimentální práce, která přinesla spektrum informací o účinku řady testovaných f-MLF, jejich kombinaci s LPS, MPL nebo proenzymoterapií a různým způsobem jejich kotvení (BAM, DOPE) na nádorových buňkách. Takovéto rozsáhlé monitorování bych považoval za přínosné v případě, že by byly jednotlivé pokusy dělané na dostatečně velkých souborech pokusných zvířat. V předložené diplomové práci toto úsilí naopak považuji za její hlavní nedostatek. Skupiny pokusných zvířat se rozpadly na velmi malé soubory tvořené pouze 3-5 jedinci! Přestože se při testování rozdílů mezi skupinami v některých případech podařilo dosáhnout statistické průkaznosti, často byly rozdíly neprůkazné díky výrazné individuální variabilitě v odpovědi na jednotlivé testované látky (viz velké směrodatné odchylky) a malému počtu jedinců ve skupinách. Při pohledu na dosažené výsledky - např. na obrázky dokumentující přežití zvířat nebo výskyt metastáz - sice upoutají pozornost rozdíly mezi skupinami. Když si ale představím, že 20% je jedno jediné zvíře, tak je průkaznost rozdílů značně zavádějící a validita dosažených výsledků jen velmi nízká.

Za další výrazný nedostatek práce považuji metody použité pro sledování účinku testovaných látek na nádory. Zatímco na jedné straně je aktivace buněk nespecifické imunity pomocí f-MLF motivů ukotvených na nádorové buňky značně sofistikovaným přístupem, je na druhé straně monitorování výsledného efektu založené převážně na sledování změny velikosti nádorů a na přežívání pokusných zvířat značně archaické. Domnívám se, že v současné době existuje přinejmenším celá řada jednoduchých histologických a imunohistochemických postupů, které by mohly na buněčné úrovni objasnit, co se v nádorech děje. Snížení počtu různých testovaných látek, zvýšení počtu pokusných zvířat ve skupinách a využití dalších analýz nádorů by bylo jistě přínosné a přispělo by k lepší publikovatelnosti dosažených výsledků v odborných časopisech.

Přes výše uvedené výhrady a připomínky se domnívám, že předložená diplomová práce splňuje všechny podmínky, které jsou na ni zákonem kladené. Autorka prokázala schopnost samostatné experimentální práce, interpretace dosažených výsledků a jejich začlenění do kontextu současných poznatků.

**Diplomovou práci Bc. Veroniky Caisové doporučuji přijmout k obhajobě a po úspěšném obhájení udělit autorce akademický titul „magistr“ (ve zkratce Mgr.).**

V Liběchově 20. 1. 2014

RNDr. Vratislav Horák, CSc.

## Oponentský posudek na magisterskou diplomovou práci Veroniky Caisové „Použití agonistů FPR receptorů pro terapii nádorových onemocnění“

Veronika Caisová předložila diplomovou práci řešící problematiku léčby dvou typů nádorů u myši pomocí řízené aktivace formylpeptidových receptorů přímo v nádoru. Výsledkem stimulace těchto receptorů má být aktivace nespecifické imunitní odpovědi *in situ* namířené proti nádorovým buňkám. Autorka k tématu přistupuje z mnoha různých úhlů: srovnává chování melanomu a sarkomu, ligand f-MLF aplikuje v různých formách, kombinacích s TLR-4 agonisty a v různých terapeutických schématech a doplňuje o fenotypovou analýzu nádorového infiltrátu. V závěru práce dojde i na *in vitro* cytotoxický test založený na schopnosti aktivovaných makrofágů linie PMJ2-R zabít melanomové buňky. Je zřejmé, že práce je součástí rozsáhlého projektu školitele a že je třeba některé otázky tzv. „dorešit“, na druhou stranu by působilo lépe, kdyby práce jedné studentky řešila méně otázek, zato však více do hloubky.

Po formální stránce je práce dosti zdařilá, s minimem překlepů a únosným množstvím gramatických chyb, z nichž zde zmíním jen ty, které asi nejsou náhodné: sialylace a katalyzovat se píše s **y**; v českém textu píšeme fosfolipáza, nikoliv **phospholipáza**; zkratka PI znamená propidium iodid, ne proprium. Dále se v textu vyskytlo několik pozůstatků překladu z angličtiny, např. je správnější psát odolnější místo více odolné, receptory pro lektiny typu C místo C-typ lektin receptory, myši byly usmrceny, ne umrtveny apod. Také je lépe se vystříhat dvěma po sobě jdoucím výrazům v samostatných závorkách, při čtení to působí rušivě, např. na str. 6: ...paměťové buňky (jsou součástí imunologické paměti), (Jerne 1955).

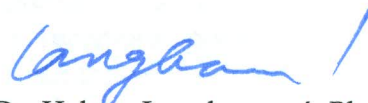
Jednotlivé části magisterské práce jsou celkem čtivé a hlavně rozsahově vyvážené. Literární přehled se obešel bez citování učebnic (děkuji!), metodika je pečlivě zpracovaná a výsledková část poměrně přehledná. Diskuze je adekvátní, seznam literatury čítá úctyhodných 143 pramenů, avšak chybí seznam zkratk.

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

1. str. 24: Balb/c a C57BL/6N jsou **kmeny** myši, nikoliv typy.
2. str. 24: Ve složení kultivačního média chybí jednak informace o konkrétních druzích antibiotik a hlavně finální koncentrace ATB, glutaminu a ME v médiu. Prosím doplňte.
3. str. 25: Domnívám se, že použití dvouvýběrového studentova t-testu pro porovnání tří a více experimentálních skupin (pokusy 5.1, 5.4, 5.5 a 5.6) je statisticky nesprávné. Vhodným testem pro toto uspořádání pokusů je jednocestná ANOVA doplněná příslušným post-hoc testem.
4. str. 31: „...třetí jamka zůstávala bez značení a sloužila jako kontrola pro vyloučení možnosti nespecifického navázání MoAbs na povrch buněk...“ Takováto neznačená kontrola může sloužit a) pro počáteční nastavení přístroje, b) pro vyloučení autofluorescence buněk. Pro ověření specifity vazby použitých protilátek je nutno použít tzv. isotypové kontroly.
5. str. 46: Ve žluté skupině léčené LPS se prakticky nepodařilo redukovat primární nádor, ale metastázy nebyly nalezeny. Jak to bylo s dobou přežití těchto myši?
6. str. 56: V rámci vyhodnocení cytotoxického testu by bylo vhodné porovnat také příslušné skupiny s fMLF-DOPE a bez něj (sloupce 1+4, 2+5 a 3+6) tak, aby bylo možné říci, zda označení nádorových buněk ligandem zvýší cytotoxicitu makrofágů.

Celkový dojem: Na experimentální části oceňuji zejména snahu o samostatnou práci a vlastní měření na průtokovém cytometru. Práce byla psána s pečlivostí a plně vyhovuje požadavkům Přírodovědecké fakulty Jihočeské univerzity. Proto **doporučuji** magisterskou diplomovou práci Veroniky Caisové k obhajobě.

V Českých Budějovicích 17. ledna 2014



RNDr. Helena Langhansová, Ph.D.