

Oponentský posudok na magisterskú prácu Ivany Švecovej: Optimalizace immunoterapie melanomu založené na kotvení laminarinu na povrch nádorových buněk

Magisterská práca Bc. Ivany Švecovej sa zaoberá optimalizáciou immunoterapie malanómu založenej na využití kombinácie dvoch ligandov; laminarinu (ligand pre fagocytárny receptor dectin-1) a lipopolysacharidu (ligand pre Toll-like receptor 4). Autorka testovala terapeutický účinok týchto dvoch ligandov: v závislosti na spôsobe aplikácie, v závislosti na spôsobe kotvenia (v prípade laminarinu) a v kombinácii s lipoteichovou kyselinou (ligand pre TLR-2), manánom alebo enzymoterapiou. Ďalej bola analyzovaná infiltrácia leukocytov do nádoru po iniciovaní immunoterapie s už spomenutými ligandami.

Diplomová práca o rozsahu 71 strán je členená na Literárny úvod, Ciele, Material a Metódy, Výsledky, Diskusiu, Záver a Zoznam použitej literatury. V literárnom úvode, ktorý je rozpracovaný na 17 stranách, sa autorka venovala popisu nádorových ochorení, charakteristike melanómov, vzniku a incidencii melanómov. V ďalšej časti sa zmienila o úlohe vrodenej imunity vo vzťahu k nádorovému bujneniu a v tretej časti sa zaoberala imunomodulačnými vlastnosťami β -gukánov a popisom látok, ktoré v práci používala. Pomerové zastúpenie jednotlivých častí je vhodne zvolené. Riešená problematika je jasne rozpracovaná a celkovo ma táto časť práce zaujala po stránke obsahovej aj štylistickej. K tejto časti práce by som mala jedine jednu pripomienku-odporúčala by som doplniť schématické znázornenie popisu signalizačnej dráhy dectinu-1 na str. 13.

Kapitola Materiál a metódy je rozpracovaná na 11 stranách. Postupy, ktoré diplomantka používala pri práci sú popísané tak podrobne, že by mohli slúžiť takmer ako protokol. Je otáznosť, či je potrebné také detaily v diplomovej práci uvádzať. Aplikčné schémy z každého experimentu sú prezentované v tabuľkách.

Výsledky sú prezentované na 23 stranách, v 2 tabuľkách a 26 obrázkoch. Ja by som uvítala, keby ste (jednou vetou, podobnou ako máte na začiatku diskusie) uviedli, prečo používate práve kombináciu daných dvoch ligandov. Zvodnenie akéhokoľvek experimentu zvyšuje jeho zrozumiteľnosť. Najcennejším výsledkom je prepokladám zistenie, že 4-pulzný režim aplikácie ligandov LPS-laminarin je najúčinnjší v redukcii nádorového rastu. Podobne posobivá bola kombinácia LPS-laminarin a LPS-manan. Ostatné výsledky boli skor negatívne, čím ovšem nechcem znížiť ich cenu.

Obsahovo sú grafy správne. Prínosom by bolo zvýšiť ich čitateľnosť. Napr. jednotlivé skupiny sú rozlíšené farebne, v legende je ku každej farbe priradené písmeno a pod obrázkom je vysvetlenie, čo ktoré písmeno znamená. Stačilo by do legendy priamo napísať, čo ktorá farba znamená. Výsledky experimentu č. 5 sú rozťahané na 9 stranách. Použitím menších grafov by ste zprehľadnili informáciu, ktorú chcete prezentovať. Záver tvorí výčet všetkých experimentov. Myslím, že stačí vybrať tie najvýznamnejšie a objemovo ho tak zredukovať na polovicu.

Diskusie je obsiahnutá na 4 a pol stranách. Autorka správne analyzuje výsledky svojich experimentov, porovnáva ich s prácami svojich predchodkýň a cituje niekoľko ďalších publikácií. Počet citácií celkom nezodpovedá dĺžke diskusie (4 dipl.práce + 9 impaktovaných článkov). Napr. pri analýze leukocytárneho infiltrátu po aplikácii ligandov ste mohli citovať, resp. porovnávať Vaše výsledky s výsledkami získanými na SR/CR myšiach.

Pripomienky:

1. Na str. 20 uvádzate, že bunky B16F10 sú v RPMI bez séra. Z postupu, ktorý popisujete, to však tak nevypadá.
2. Str.10 β -glukan je rozpoznávaný TLR-2 receptorem a nie TLR-4
3. Citácia: Marta a kol. str. 12 je nesprávna, nesúvisí s tematikou

4. Je vhodné uvádět citácie, ktoré sú v anglickom jazyku, alebo českom. (Montant a kol. (1977) – francúzsky; Warburg a kol. (1924)- nemecky)
5. V exp.č. 5 uvádzate včasný nástup infiltrácie granulocytov do nádoru. Bolo by dobré zmieniť fakt, že to nebolo štatisticky významné aspoň v závere (alebo doplniť hviezdu??)
6. Reference na Kaiserová z roku 2012 je v tisku. Je rok 2014. Nezabudli ste túto ref. doplniť?

Otázky:

1. LPS je zodpovedné za infiltráciu granulocytov a cieleň útok je zabezpečený laminárnym ukotveným na nádorové bunky. Ako si vysvetľujete včasnú infiltráciu granulocytov po aplikácii LPS a laminarinu? Može nejakú úlohu zohrávať fakt, že β -glukan aktivuje LTR-2? Aktivuje laminarin TLR-2?
2. Granulocyty sú bunky, ktoré zohrávajú pravdepodobne kľúčovú úlohu v regresii nádorov za vašich exp. podmienok. Neuvažujete o podrobnejšej charakterizácii tejto bunkovej populácie? Aké parametre by ste v nich mohli merať? Boli hodnoty MFI zrovnateľné v kontrolných a liečených myšiach?

Celkové hodnotenie:

Diplomantka odviedla prácu, ktorej výsledky sú významným prínosom v riešení projektu imunoterapie nádorov a sú publikované v impaktovanom časopise, čím sa nemože pyšniť každý študent. Diplomová práca je obsahovo, štylisticky aj gramaticky kvalitne vypracovaná, spĺňa požadovanú odbornú úroveň a preto ju odporúčam k obhajobe.

V Českých Budějoviciach dňa 17. januára 2014

Mgr. Jaroslava Lieskovská, Ph.D



OPONENTSKÝ POSUDEK NA DIPLOMOVOU PRÁCI

Název práce: *Optimalizace imunoterapie melanomu založené na kotvení laminarinem na povrch nádorových buněk*

Autor práce: *Bc. Ivana Švecová*

Oponent: *Ing. Eva Pokorná, CSc.*

Předložená práce navazuje na další práce vedené školitelem RNDr. Janem Ženkou, CSc. v minulých letech i letos. Jejich společným cílem je hledat a sestavit co nejučinnější mechanismus protinádorového působení spojením fagocytárního a signálního motivu s co nejstabilnějším kotvením. Autorka využívá poznatků svých kolegyně a testuje další dosud neprozkoumané kombinace, které by vedly k co největší redukci nádorů u myši a k jejich nejdelší době přežívání. Účinek na proces metastazování je zde testován jen okrajově.

Jedná se o možné budoucí využití imunoterapie pro klinickou léčbu nádorů, proto je tematika práce velmi aktuální a potřebná. Získané poznatky o jednotlivých kombinacích jsou vesměs zcela nové a mohou tak sloužit jako pilotní zkušenosti pro další výzkum.

Soubor použité odborné literatury i její využití v úvodu či diskuzi je vyčerpávající a dostatečný. Část Úvod je dobře zpracovaná. Obzvláště bych vyzvedla Diskuzi, která je velmi kvalitně provedená.

Po formální stránce splňuje autorka všechny požadavky kladené na odbornou práci, tj. práce obsahuje ve správném pořadí i rozsahu všechny části, které obsahovat má.

K práci mám následující připomínky:

- Skupiny o pěti nebo ještě hůře o čtyřech myších jsou pro jakékoli vyhodnocování příliš malé. Statisticky se takové skupiny téměř nedají vyhodnotit a pro některé výsledky je to škoda, protože by se tam u větších skupin možná statistická významnost objevila.
- Grafy růstu nádorů v čase (obr. 6,8,10,12,14,16) by měly být ve stejném měřítku, aby byly vzájemně porovnatelné (když neuvádíte číselné výsledky), protože jedna kombinace terapie navazuje na druhou a porovnání je tedy na místě.
- Vzhledem k malým počtům zvířat ve skupinách by bylo dobré uvést i číselná data výsledků jednotlivých zvířat (ne jen grafické vyhodnocení průměru a směrodatných odchylek). Bylo by to mnohem přesnější a mnohdy zajímavější.
- V tabulce 14 a 15, které jsou velmi přehledné, chybí výsledky kontrolní skupiny, které by byly pro porovnání testovaných skupin užitečné (např. průměrná doba přežití atd.).
- Podobná přehledná tabulka by měla být i u ostatních studií (4.3.1, 4.3.2, 4.3.3, 4.3.4. a 4.3.5).
- Připadá mi, že pokusy 4.3.4 a 4.3.5 spolu tak úzce souvisejí, že by bylo lepší je sloučit do jednoho pokusu a jedné tabulky a grafu nebo alespoň provést výsledné dva grafy ve stejném měřítku, aby se data dala porovnat.
- Nejzajímavější z pokusů z hlediska případného praktického využití se mi zdá pokus č. 4. Vzhledem k významu MPL (není toxický pro člověka) by mi připadalo důležité v budoucnu více rozvinout tuto studii a zjistit např. dobu přežívání takto léčených myši a zvýšit počty myši

ve všech skupinách tak, aby se dala lépe vyhodnotit statistická významnost. Rovněž by bylo dobré zkusit jiné typy nádorů, hlavně karcinom, který je ze všech nádorů nejrozšířenější. Protože pokud by se našla kombinace léčby, která by dokázala inhibovat metastazování, bylo by to velmi významné. Z výsledku, kdy se např. incidence metastáz liší o jednu myš a ono to je 20% (Obr. 22) se závěry dají dělat špatně. Přesto by bylo zajímavé je znát.

K práci mám následující otázky:

- Proč jsou všechny grafy vyhodnocovány a data zobrazována jen do 14.dne léčby, když léčba pokračovala nejméně vždy do 26.dne (obr. 6,8,10,12,14,16)?
- Není mi úplně jasné, co znamená v tab. 1 u skupiny myši E dávkování podle potřeby (ani z tabulky č. 13). Můžete to, prosím, lépe vysvětlit?
- Proč jste v kapitole 3.8.5.1. použili intervaly odběru nádorů 12, 24 a 48 hodin po aplikované terapii? Připadají mi krátké a bylo by zajímavé zjistit, jestli se infiltrace leukocytů do nádoru nezmění po delší době, např. v době, kdy nádor rychle roste (tj. někdy okolo 14.dne).
- Zajímalo by mě, jak vypadaly Vámi popisované „léze bez kůže“, které se u myši objevovaly na místech původních nádorů (str. 30 a 54).
- Čím to, že se průměrný objem nádoru u kontrolní skupiny po 48 hodinách zmenšil, když by se spíše dalo čekat, že se zvětší?
- Proč jste ze všech (1,3)- β -D-glukanů použili právě laminarin? Použila některá z Vašich kolegyně např. lentinan nebo skleroglukan? Alternativní medicína totiž doporučuje všem onkologickým pacientům především houbu shiitake, ze které je lentinan izolovaný.

Připomínky formální a k češtině:

- Není vhodné psát odbornou práci v 1. osobě jednotného čísla, lépe v 1. osobě množného čísla nebo „bylo uděláno“.
- Na začátku věty by nikdy neměla být číslice ani zkratka.
- Na str. 19 v seznamu chemikálií je drobná chyba u Fluorescenčně značených MoAbs proti specifickým receptorům leukocytárních – zbytek věty je až za SMCC.

Pochvala za:

- Velmi dobře zpracovanou diskuzi.
- Srozumitelnou češtinu a dobře čitelný sloh.
- Malé množství chyb v češtině.
- Dobrý způsob prezentace, tj. že autorka dovede čtenáři problematiku dobře vysvětlit tak, aby i nové informace ihned dobře pochopil přímo z práce (toto považuji za velmi důležité pro každého budoucího vědeckého pracovníka)

Závěr:

Jedná se o velmi zajímavou, dobře zpracovanou diplomovou práci. Množství otázek a připomínek spíše odrážejí diskuzi, která z výsledků vyplývá, než nějaké velké nedostatky. Autorka prokázala, že je schopna samostatně řešit zadanou problematiku po stránce teoretické i praktické. Proto doporučuji, aby předložená práce byla přijata k obhajobě.



Ing. Eva Pokorná, CSc.

V Praze dne 17.1.2014