

**Posudek na diplomovou práci Bc. Evy Waldmannové:
„Terapie nádorových onemocnění pomocí kotvených agonistů fagocytárních receptorů.
Studium mechanismů pomocí imunodeficientních myší“**

Předložená diplomová práce se zabývá aktuální tematikou protinádorové terapie pomocí cílené stimulace imunitní odpovědi hostitele. Tato problematika je již dlouhodobě řešena na pracovišti školitele a předložená diplomová práce představuje jeden z mnoha výstupů výzkumu.

Diplomová práce je tradičně rozdělena do hlavních kapitol úvod, cíle práce, materiál a metody, výsledky, diskuze, souhrn, seznam zkratk a seznam použité literatury, které obsahují celou řadu podkapitol. Celkový rozsah práce činí 81 stran.

Úvodní část diplomové práce je zpracována precizně a přehledně, přičemž čtenáře postupně uvede do problematiky rakoviny a složek imunitního systému. Je nutno podotknout, že i přes ohromné množství informací je úvodní část velmi čtivá a díky postupnému prohlubování informací není čtenář zahlcen fakty.

Cíle práce jsou jasně formulovány do šesti dílčích bodů, zabývajících se úlohou vrozené imunity hostitele a její stimulace opakovanou aplikací terapeutickou směsí a optimalizací metody měřící aktivitu neutrofilů.

Kapitola materiál a metody obsahuje soupis všech hlavních postupů a metod používaných během experimentů včetně detailních popisů jednotlivých provedených experimentů.

Výsledky jsou podrobně zpracovány, dokumentovány řadou grafů a jsou rozděleny podle jednotlivých experimentů, odpovídajícím popisem v kapitole materiál a metody. Grafy přehledně shrnují slovy psané výsledky a názorně ukazují výsledky statistických analýz.

V diskuzi autorka konfrontuje své výsledky vlivu imunoterapie jak s domácí, tak zahraniční literaturou.

Souhrn je jasně a přehledně formulován a víceméně odpovídá stanoveným cílům práce.

Je nutno zdůraznit, že v předložené diplomové práci obsahuje pouze několik málo formálních chyb ve formě překlepů a formulačních nepřesností a řadí se tímto k nadstandardu.

K autorce mám několik věcných dotazů:

- 1. V kapitole 3.5 autorka uvádí, že bylo aplikováno podkožně 400 000 nádorových buněk. Proč byla použita právě tato dávka?**
- 2. V kapitole 3.8 autorka uvádí, že po určité době konzervace plic ve 4% roztoku formaldehydu byla pod binolupou spočítána metastatická ložiska. Jak dlouhá byla tato doba? Její délka je empiricky odvozena, nebo je striktně dána?**
- 3. V kapitolách MaM a Výsledky jsou uvedeny terapeutické skupiny myší, nicméně při srovnání jednotlivých pokusů se tyto skupiny neshodují. Proč nebyly u všech druhů použitých myší vždy aplikovány všechny kombinace terapeutických látek? (např. v pokusu č. 1 je aplikován pouze manan-BAM+LPS, v pokusu č. 2 je přidána skupina myší s aplikací Zymozan-BAM+LPS, v pokusu č. 3 je přidána skupina se samotným LPS, u všech pokusů chybí použití skupin myší s aplikací samotného Zymozanu)**

4. Proč byly u myši SCID a CD11b-/- použity melanomu, přičemž u BALB/c myši byly použity buňky sarkomu 180?
5. Jak si autorka vysvětluje silný vliv samotného LPS v pokusech č. 3 a 4, přičemž by se dal předpokládat synergický efekt BAM+LPS nebo Zymozan+LPS (navíc zde samotný LPS snížil průměrný počet metastáz)?

Závěr: Přes výše uvedené připomínky považuji předloženou diplomovou práci za velmi zdařilou, splňující vytyčené cíle. Svědčí o schopnosti autorky pracovat s vědeckou literaturou, plánovat, provádět i vyhodnocovat experimenty a ze získaných výsledků vyvozovat závěry. Výsledky diplomové práce Bc. Evy Waldmannové doplňují a rozšiřují výsledky studií a experimentů prováděných v laboratoři školitele.

Předložená diplomová práce Bc. Evy Waldmannové splňuje veškeré požadavky kladené na diplomové práce na Přírodovědecké fakultě Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích a **doporučuji ji k obhajobě**. Po úspěšném obhájení diplomové práce navrhuji hodnocení **výborně**.

V Českých Budějovicích, 19. 5. 2014

RNDr. Bohumil Sak, Ph.D.



**Oponentský posudek na magisterskou diplomovou práci Evy Waldmannové
„Terapie nádorových onemocnění pomocí kotvených agonistů fagocytárních receptorů.
Studium mechanismů pomocí imunodeficientních myší“**

Eva Waldmannová předložila diplomovou práci snažící se primárně o vysvětlení a nalezení mechanismu účinku protimelanomové terapie založené nejčastěji na intratumorální aplikaci mananu s BAM kotvou v kombinaci s LPS. Účinnost takovéto terapie *in vivo* byla v minulosti ve skupině Dr. Ženky pozorována opakovaně a pokusy o objasnění mechanismu tohoto účinku na buněčné, event. molekulární úrovni jsou více než chvályhodné. Na druhou stranu předložená diplomová práce působí poněkud roztržštěně a vytyčené cíle jsou tématicky nesourodé.

Formálně se jedná o klasicky členěnou diplomovou práci sestávající z literárního úvodu, vytyčených cílů, popisu použité metodiky, prezentace výsledků a relativně zdařilé diskuze ukončené stručným souhrnem dosažených poznatků. Práci zakončuje pečlivě sestavený seznam zkratek a soupis použité literatury. Z výše uvedeného mám vážné výhrady pouze k rozsahu úvodu psanému na 32 (!) stranách. Ačkoliv je úvod psán, stejně jako celá práce, vesměs dobrou češtinou s minimem překlepů, gramatických a stylistických chyb, informace relevantní k tématu se začínají objevovat cca od strany 12. Jedním z účelů psaní diplomové práce přitom je naučit se v záplavě informací rozpoznat to nejdůležitější a toto dále rozvinout. Ve výsledkové části je pak nadbytečné uvádět u detekce cytokinů grafy znázorňující kalibrační přímky, zvláště když se jedná o komerčně dostupné ELISA kity a optimalizace metody nebyla předmětem této práce.

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

1. str. 14: „...Ještě donedávna byla přirozená imunita považována za téměř bezvýznamnou primitivní složku imunitního systému...“ Osobně bych byla v této formulaci opatrnější. Uveďte příklad vrozeného deficitu přirozené imunity se závažným klinickým obrazem.
2. V pokusu č. 1a 2 jste transplantovali buňky melanomu odvozeného z myši C57BL/6J do SCID myši s genetickým pozadím C.B17/ICR. Jaká je vzájemná histokompatibilita těchto dvou kmenů a nemohla tato skutečnost ovlivnit výsledky experimentů?
3. kap. 3.18.1 na str. 41 – nejedná se o sérum, ale o nebuněčný extrakt z nádoru.
4. V názvu kapitoly 3.19.3 je poněkud nešťastně použit obrat „množství **uvolněné** MPO po aplikaci LPS“. Během homogenizace a sonikace nádoru se totiž uvolní i dosud neuvolněná MPO a čtenáři nemusí být hned zřejmé, že to vlastně nevadí, neboť MPO zde slouží pouze jako marker přítomnosti neutrofilů, nikoliv jejich aktivity.
5. Ad pokusy na imunodeficientních myších: Domnívám se, že pokud chcete kvalitně ověřit hypotézu a srovnat odpovídavost na léčbu v závislosti na genetickém pozadí (např. CD11b KO vs. wild type), je třeba oba tyto kmeny myši zařadit do jednoho experimentu tak, aby bylo možno udělat přímé srovnání. Čtenář, který nezná předchozí práce z dílny Vašeho školitele, neví, jak se chová tato léčba u WT (i když je to později v diskuzi zmíněno), nehledě k tomu, že konkrétní šarže terapeutika na konkrétních myších v konkrétní čas se může chovat jinak než v minulosti.
6. Ad Pokus č. 6: Které buňky jsou podle Vás zdrojem sledovaných cytokinů (melanom, zánětlivý infiltrát, jiné)? Jakou metodou by se to dalo zjistit?

7. Jaké hladiny cytokinů byly řádově detekovány v ELISA testu před přepočtem na objem nádoru (v pg/ml)?

8. str. 64: Dle ústního sdělení dr. Ženky rostou nádory na imunodeficientních myších obecně dvakrát rychleji než na myších s plně rozvinutou imunitou. Pokud je to opravdu tak, neměla být léčba knockoutů započata dříve než obvyklých 12 dní od transplantace melanomu? Kolikátý den neléčená myš SCID umírá ve srovnání s běžnou WT myší?

Celkový dojem: Domnívám se, že magisterská diplomová práce Evy Waldmannové byla sepsána s pečlivostí a přes uvedené nedostatky a připomínky považuji tuto práci za plně vyhovující požadavkům Přírodovědecké fakulty Jihočeské univerzity a **doporučuji** ji proto k obhajobě.

V Českých Budějovicích 20. května 2014


RNDr. Helena Langhansová, Ph.D.