

Posudek magisterské práce Bc. Zuzany Kumžákové

Název: Hledání agonistů Toll-like receptorů použitelných synergicky s ligandy fagocytárních receptorů pro imunoterapii nádorových onemocnění v humánní medicíně

Školitel: RNDr. Jan Ženka, CSc.

Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity, České Budějovice, 2015

Téma práce vychází z dlouhodobého zaměření laboratoře dr. Ženky na katedře medicínské biologie na studium imunitních nástrojů při léčbě nádorů. Cílem této diplomové práce bylo zhodnotit vlivy vybraných látek na aktivaci imunitní protinádorové reakce. Zvolené téma je velmi aktuální a ve výsledku práce může přinést řadu nových důležitých poznatků do mozaiky současných znalostí, které mohou přispět k onkologické léčbě těchto závažných onemocnění.

Práce o celkovém rozsahu 93 stránek je napsána v českém jazyce a autorka ji rozdělila do devíti kapitol standardním způsobem. V teoretickém úvodu, který zabírá 19 stran, autorka utřídila poznatky z více než 120 citovaných zdrojů, které jsou zaměřeny na všechny důležité součásti imunoterapie nádorových onemocnění. Oceňuji, že převážná většina citovaných zdrojů jsou články z impaktovaných časopisů zaměřených na danou problematiku. Teoretický úvod je napsán svěže, informace jsou seřazeny logicky. Na tuto část navazují cíle práce, které jsou jasně a srozumitelně definovány. Následuje na 13 stranách experimentální část, kde jsou nejprve představeny použité metody, dále metodika in vivo a in vitro experimentů a jejich vlastní popis. Na dalších 22 stránkách jsou pak uvedeny výsledky těchto experimentů spolu s řadou grafů. Tato pasáž je pro orientaci čtenáře poněkud složitější, uvítala bych, pokud by výsledky jednotlivých experimentů byly uváděny ihned po jejich popisu a více bylo využíváno přehledných tabulek např. místo popisu, jak byly aplikována terapeutika jednotlivým skupinám myší. Diskuzi autorka věnovala dalších 10 stran textu. Poctivě v nich diskutuje výsledky všech provedených experimentů a srovnává je s výsledky převážně svých předchůdců v laboratoři dr. Ženky. Následuje stručné shrnutí výsledků v závěrečném souhrnu. Práce je napsána srozumitelně s minimem gramatických chyb a překlepů. Jedinou výtkou týkající se formální stránky je, že autorka užívá velmi často v celé práci u sloves tvaru první osoby množného čísla, což vzbuzuje dojem, že práce je kolektivním dílem. Nicméně věřím, že popsané experimenty autorka prováděla a vyhodnocovala sama.

Experimentální část práce je rozdělena na pokusy prováděné in vivo a in vitro. 7 experimentů in vivo bylo prováděno na samicích myšního kmene C57BL/6, kterým byly transplantovány buňky myšního melanomu B16-F10. V jednotlivých experimentech bylo použito 24 až 30 jedinců, kteří byli

randomizováni do 4 až 6 skupin a následně jim byla podávána terapeutika podle uvedených rozpisů. V diskuzi např. k výsledkům čtvrtého pokusu in vivo autorka uvádí procentuální úspěšnost vyléčení experimentálních zvířat ošetřených terapeutickou směsí kovalentně kotvených bakterií *Listeria monocytogenes* s mananem 16,7%, což mi přijde lehce zavádějící. V souvislosti s tím bych se ráda zeptala, jakým způsobem byl určen počet jedinců v pokusných skupinách, aby získané výsledky byly statisticky významné?

U sedmého experimentu in vivo se nepodařilo prokázat význam oxidativního vzplanutí neutrofilů na zabíjení nádorových buněk, i když v případě in vitro testů byl tento účinek jasně prokázán. Příčinou bylo, jak uvádí autorka v diskuzi, že nízkomolekulární epicatechin se rychle vyplavil z místa nádoru. Má autorka nějakou představu či nápad, jak experiment ke stanovení vlivu oxidativního vzplanutí neutrofilů in vivo provést?

Z experimentálních výsledků plyne, že největší účinek vedoucí k významnému prodloužení doby přežití experimentálních zvířat měla směs obsahující R848 s kotveným mananem, do níž byly přidány bakterie *Listeria monocytogenes*. Konstatování autorky v závěru diskuze, že její práce v mnohém navazuje na práce předešlé a v mnohém je doplňuje, mě vede k otázce: Nakolik je tento výsledek nový a plánuje jej autorka publikovat?

Závěrem je možno konstatovat, že Bc. Zuzana Kumžáková splnila všechny cíle vytčené v magisterské práci a získala řadu důležitých a zajímavých poznatků týkající se vlivu některých látek na průběh nádorové imunoterapie. Tuto práci doporučuji k obhajobě s hodnocením výborně.



V Č. Budějovicích, 25.5.2015

Ing. Jana Nebesářová, CSc

Oponentský posudok diplomovej práce Zuzany Kumžákovej s názvom: Hľadanie agonistů Toll like receptoru použiteľných synergicky s ligandami fagocytárnymi receptoru pro imunoterapiu nádorových onemocnení v humánnej medicíne

Vypracovala: Mgr. Jaroslava Lieskovská, Ph.D.

Školiteľ: RNDr. Jan Ženka, CSc.

Diplomová práca Zuzany Kumžákovej je súčasťou dlhodobého projektu, ktorý sa zaoberá imunoterapiou nádorov s využitím vhodnej kombinácie signálnych a fagocytárných ligandov. Diplomová práca je obsiahnutá na 74 stranách a má obvyklé členenie na Úvod, Prehľad literatúry, Ciele, Material a metody, Výsledky, Diskusiu, Záver a Zoznam literatúry.

Literárny prehľad je spracovaný na 19 stranách. O charakteristike nádorov a ich klasifikácii sa dočítame v úvode tejto kapitoly. Nasleduje niekoľko podkapitol venovaných imunitnému systému a jeho účasti pri rozoznávaní a eliminácii nádorových buniek. Prehľadne je popísaná časť zaoberajúca sa PRR a PAMP. Nedostatočne je, podľa mojho názoru, rozpracovaná kapitola o samotnej imunoterapii nádorov, ktorá by mala byť vlastne nosnou témou celej práce. Po štylistickej a gramatickej stránke je práca veľmi dobrá.

Konkrétne pripomienky:

1. Výraz pomahačské CD4 bunky by mal byť nahradený výrazom pomocné CD4 bunky.
2. Viriálna RNA je vhodnejšie nahradiť slovom vírusová RNA.
3. Informácie v tabuľke 1 a 2 sa z väčšej časti duplikujú.

Ciele sú jasne a stručne definované.

Kapitola Material a Metody obsahuje podrobný popis roztokov, chemikálii, riedenia buniek a vcelku zrozumiteľný popis použitých metod. Niektoré pasáže sa však zbytočne opakujú a výrazne znižujú prehľadnosť tejto kapitoly. V prípade, že sa experiment opakuje s použitím napr. dvojnásobnej koncentrácie buniek je postačujúce túto informáciu uviesť vo výsledkoch a neopakovať/kopírovať celú metodu.

Pripomienky:

1. Nedeaktivované serum, použité ako doplnok v médiu má byť inaktivované serum. Ak sa mýlim, prosím vysvetlite
2. Zastúpenie jednotlivých zložiek roztokoch sa uvádza buď v percentách, alebo vo výslednej molarite.
3. Popis izolácie neutrofilov: aké primárne a sekundárne protilátky ste použili?
4. MACS je roztok, nie médium.

Časť Výsledky je rozpracovaná na 25 stranách. Vplyv roznych kombinácií ligandov bol vyhodnotený meraním veľkosti nádorov, dĺžkou života, intenzitou metastázovania, či prevalenciou metastáz. Za veľmi presvedčivý a pozitívny výsledok pokladám zistenie, že R848, v kombinácii s mananom kotveným na nádorové bunky, mal výrazný protinádorový efekt, čo by mohlo byť potenciálne využiteľné i v humánnej medicíne.

Pripomienky:

1. Pokus číslo 3 je opakovaním pokusu 2. Je vhodnejšie výsledky spojiť a prezentovať v jednom grafe.

2. Výsledky 7 *in vivo* a 3 *in vitro* pokusov sú prezentované ako numerický zoznam a nepokladám to za šťastnú voľbu. Prehľadnosť výsledkov je tým znížená, navyše sa mnohé výsledky duplikujú.

Diskusii je venovaných 8 strán. Autorka diskutuje svoje výsledky s výsledkami svojich spolužiakov a niekoľkými impaktovanými prácami. Napriek úctyhodnému rozsahu tejto kapitoly postrádam diskusiu v zmysle porovnania imunoterapeutického účinku použitých ligandov, konkrétne R848 s inými publikáciami. Diskusia je z väčšej časti opakovaním výsledkov.

Zoznam použitej literatúry pozostáva zo 126 citácií, citácií relevantných k imunoterapii nádorov je pomerne málo.

Otázky:

1. R848 ligand má antivirový účinok. Čo ho sprostredkúva? Je TLR78 jediný receptor pre tento ligand a ktoré bunky imunitného systému exprimujú receptory pre tento ligand?
2. Protinádorový imunoterapeutický účinok R848 bol už zdokumentovaný. Aký je mechanizmus jeho účinku? Diskutujte odlišnosti s Vaším modelom, prípadne s predpokladaným mechanizmom.

Na záver konštatujem, že predložená diplomová práca spĺňa všetky nároky kladené na diplomovú prácu, navyše prináša niekoľko cenných výsledkov, ktoré sa pravdepodobne stanú súčasťou vedeckej publikácie. Vyššie uvedené pripomienky jú mienené ako rada do ďalšieho štúdia. Prácu odporúčam k obhajobe a navrhujem známku 2.

V Českých Budějoviciach, 24. 5. 2015

Jaroslava Lieskovska

