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 fagocytárních receptorů pro terapii nádorových onemocnění a studium možnosti zesílení jejich účinků současnou stimulací TLR receptorů**

Autor: **Bc. Nikol Vácová**

Problematika nádorových onemocnění je přes veškeré experimentální snahy stále ve stádiu hledání nových postupů, které by výrazně zvýšily úspěšnost jejich léčby. Různé imunoterapeutické přístupy představují v současné době velmi nadějný a rychle se rozvíjející směr. Nové experimentální studie, které by přinesly v této oblasti další aplikovatelné výsledky, jsou proto stále velmi žádoucí. Předložená diplomová práce se zabývá možností imunoterapie nádorů za použití Imiquimodu (agonisty TLR7) a sledováním úlohy neutrofilů v protinádorové reakci za pomoci pokusů *in vivo* a *in vitro*. Ve vztahu k výše zmíněnému experimentálnímu trendu považuji předloženou magisterskou diplomovou práci za velmi aktuální a zajímavou.

Práce má klasické členění. Rozsáhlý a přehledně uspořádaný literární úvod s použitím recentních prací dokládá velmi dobrou orientaci autorky ve studované problematice. Cíle práce jsou krátce, jasně a srozumitelně definované. V části „Materiál a metody" jsou podrobně popsány všechny použité postupy pro realizované pokusy *in vivo* a *in vitro*. Značný rozsah této části diplomové práce dokumentuje obrovský rozsah experimentální práce a zvládnutí širokého spektra laboratorních technik. V následující části práce jsou realisticky prezentované dosažené výsledky. Pro jasnou dokumentaci interakcí mezi aktivovanými neutrofily a nádorovými buňkami s laminarin-BAM autorka vytvořila zajímavé video, které názorně prezentuje chování obou typů buněk *in vitro*. V části „Diskuze" jsou dosažené výsledky podrobněji a kriticky rozvedeny a dány do souvislostí se současnými poznatky. V rozsahu jedné strany jsou pak shrnuty nejdůležitější závěry práce. Na konci diplomové práce je uvedena použitá odborná literatura, která je citována jednotným 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. Str. 18 – co znamená zkratka f-MLFKK?

2. Str. 19 – při přípravě f-MLFKK-DOPE (6.5.3) je uvedeno, že sterilizace výsledného roztoku byla provedena filtrací. Jak byly sterilizovány další tři připravované terapeutické látky?

3. Str. 19 – 6.7 Počítání plicních metastáz – je zmíněno, že: „Po vyjmutí plic z těla byly plíce fixovány 4% formaldehydem. Obratem byly celé plíce prohlédnuty pod binokulární lupou …". Znamená to, že plíce byly pouze ponořené do 4 % formaldehydu a okamžitě byly počítány povrchové plicní metastázy? Nevyskytují se metastázy také uvnitř plicního parenchymu?

4. Str. 21 – 6.12 Pokusy: Pro aplikaci terapeutických látek *in vivo* autorka uvádí, že byl použit pulzní režim. Na základě jakých pokusů nebo výsledků byl zvolen tento režim aplikace?

5. Str. 24 – 6.12.5 : „V desetiminutových intervalech byla pozorována tvorba shluků pod invertovaným mikroskopem při zvětšení 40 – 400 x". Jak byla tvorba shluků vyhodnocována a kvantifikována, kolik zorných polí bylo hodnoceno?

6. Str. 30 – 7.2 f-MLF byl v tomto pokusu použit jako chemoatraktant neutrofilů. Proč v tomto pokusu nebylo - kromě sledování růstu nádorů a výskytu plicních metastáz – přímo prokázáno (průtokovou cytometrií nebo imunohistochemicky), že v nádorech vlivem f-MLF skutečně došlo k nárůstu neutrofilů?

7. Str. 34 – 7.4. Pro tento typ *in vitro* pokusů byly použité jako efektorové buňky neutrofily z peritonea, jejich čistota byla pouze 30%. Na základě takto velmi nízké čistoty použitých buněk je iluzorní dělat jakékoliv závěry o cytotoxickém efektu neutrofilů na nádorové buňky, protože v použité buněčné suspenzi byly určitě i další imunitní buňky (např. makrofágy), které mohou sledovanou reakci výrazně ovlivnit! Proč nebyla použita pro přečištění získané buněčné suspenze MACS technika jako v případě izolace neutrofilů z kostní dřeně?

8. Str. 38 – Obr. 9. Jaký je rozdíl mezi obr. B a obr. C? Text k nim je stejný.

9. Str. 41 – V textu nad obr. 13 je uváděno, že při studium vlivu f-MLFKK-BAM na erytrocyty nedocházelo ke vzniku buněčných shluků. Naproti tomu v suspenzi neutrofilů byl pozorován výrazný vznik shluků (str. 39). S ohledem na to, že v tomto pokusu nebyly erytrocyty nijak specificky izolovány a byla použita plná nesrážlivá krev, ve které jsou neutrofily zastoupené (i když v porovnání s erytrocyty minoritně), očekával bych alespoň řídký výskyt buněčných shluků. Proč k tomu nedocházelo?

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:

Předložená magisterská diplomová práce Bc. Nikol Vácové je po odborné stránce velmi přehledně a srozumitelně stylizovaná, což dokládá výbornou orientaci autorky ve studované problematice. Za hlavní pozitivita práce považuji celkovou koncepci a obrovský rozsah experimentální práce na úrovni *in vivo* a *in vitro* a realistické hodnocení dosažených výsledků. Naproti tomu za značný nedostatek pokusů *in vivo* považuji velmi malý počet pokusných zvířat v jednotlivých experimentálních skupinách. Díky tomu výsledky některých nadějných kombinací, které naznačují určitý inhibiční efekt na růst nádorů (např. intratumorální aplikace mananu-BAM + aktivované neutrofily) není možné přesvědčivě a se statistickou průkazností interpretovat a jejich validita je pak velmi nízká. Snížení počtu pokusů a díky tomu zvýšení pokusných zvířat ve skupinách by jistě bylo přínosné. Dalším nedostatkem je v pokusech *in vivo* pouhé sledování růstu nádorů a přežívání pokusných zvířat bez jakýchkoliv dalších analýz nádorů (např. histologie, imunohistochemie, průtoková cytometrie), které by mohly přinést podrobnější informace o tom, co se skutečně v nádorech děje. Tyto nedostatky jsou ale mimo oblast kompetence autorky práce.

Přes výše uvedené výhrady a připomínky považuji předloženou magisterskou diplomovou práci Bc. Nikol Vácové za velmi kvalitní a splňující všechny požadavky na ni zákonem kladené. Autorka prokázala schopnost samostatné tvůrčí práce a zvládnutí rozsáhlého spektra laboratorních technik, uvážlivé interpretace dosažených výsledků, jejich přehledné zpracování a začlenění do kontextu současných poznatků. Práci hodnotím stupněm „výborný".

Práci doporučuji přijmout k obhajobě a po úspěšném obhájení udělit autorce akademický titul „magistr" (ve zkratce Mgr.).

V Liběchově 22. 5. 2015

RNDr. Vratislav Horák, CSc.

Oponentský posudek na magisterskou diplomovou práci Nikol Vácové „Použití agonistů fagocytárních receptorů pro terapii nádorových onemocnění a studium možnosti zesílení jejich účinků současnou stimulací TLR receptorů“

Předložená magisterská práce Nikol Vácové tematicky zapadá do dlouhodobého projektu dr. Ženky v oblasti imunoterapie myšího melanomu, který je na Katedře medicínské biologie řešen již několik let. V této práci je největší pozornost věnována neutrofilům jakožto nejpočetnější a tudíž zřejmě zásadní populaci leukocytů v okolí nádoru. Metodicky se práce opírá zejména o *in vitro* experimenty založené na cytotoxickém testu s fluorescenčním substrátem a mikroskopickém pozorování interakcí buněk ovlivněných vázanými imunostimulačními ligandy.

Práce je psána na celkem 64 stranách a má klasické členění. Na první pohled zaujme pečlivá grafická úprava celé práce, s minimem překlepů a bez gramatických chyb. Na druhou stranu se autorka nevyvarovala použití některých slovních obratů, které patří spíše do uměleckého vyprávění, novinového článku nebo mluveného slova než do odborného textu (např. „…pomyslnou *červenou nit* práce tvořila jedna myšlenka…“, „…není makrofág jako neutrofil…“ apod.). Na některých místech by lepšímu plynutí textu prospěla souvětí namísto sekvence krátkých vět (např. závěr prvního odstavce v kap. 2.3.2 na str. 6).

Po pročtení celé práce je zřejmé, že autorka tzv. „ví, o čem je řeč“ a dobře se orientuje v dané problematice. Z výsledkové části bych vyzdvihla především kapitolu sledující interakce melanomových buněk s myšími neutrofily; výsledky nejenže jsou pečlivě zpracovány a doplněny kvalitními fotografiemi, ale zároveň dle mého názoru přesvědčivé ukazují, že kotvené ligandy se významně podílí na vzniku buněčných interakcí a zahájení procesu frustrované fagocytózy.

Na autorku mám následující otázky a věcné připomínky:

1) Str. 2, kap. 1.3: Pokud má myší melanom B16-F10 sníženou expresi MHC I, jakou roli v imunitní odpovědi hrají NK buňky?

2) Na str. 3 uvádíte, že všechny buňky přirozené imunity s výjimkou NK buněk jsou schopny fagocytózy. Za jakých podmínek fagocytují žírné buňky a bazofily?

3) Str. 18, kap. 6.2: Uvádění koncentrace jednotlivých složek média (antibiotika, glutamin, merkaptoetanol) v procentech je zavádějící. Striktně vzato, 1% glutamin znamená 1 g práškového glutaminu na 100 ml média, což neodpovídá skutečnosti. Lépe je uvádět skutečné molární koncentrace. Uveďte prosím na pravou míru.

4) Str. 20, kap. 6.9.1: V popisu izolace neutrofilů z kostní dřeně chybí důležité informace o tom, jaké kosti byly použity pro izolaci a jaké protilátky jsou na izolační koloně pro negativní selekci. Jaké markery byly použity pro stanovení čistoty izolovaných neutrofilů pomocí průtokové cytometrie?

5) Str. 21, kap. 6.11: Který *post-hoc* test byl proveden v rámci analýzy variance?

6) Na str. 28 uvádíte, že „…vliv Imiquimodu samotného i v kombinaci s kotveným mananem na přežívání myší je na obrázku 2…“, ale už nepíšete, jaký ten vliv je (nebo lépe řečeno, že není). Dle mého názoru by měly všechny grafy a tabulky výsledkové části být patřičně okomentovány v textu.

7) Str. 34, kap. 7.4: Jak probíhalo promývání „chybného“ supernatantu za účelem snížení pozadí?

8) Proč byly pro cytotoxický test použity peritoneální neutrofily (čistota pouze 30 %) a ne neutrofily z kostní dřeně? Uvažovali jste možný vliv stopového množství thioglykolátového média v suspenzi neutrofilů na cytotoxický test?

9) Jaká byla původní hypotéza pro účinek imiquimodu? Chápu snahu o nahrazení LPS, ale jaké protinádorové efekty byly očekávány právě od TLR-7 ligandu?

10) Str. 47, kap. 7.7: Ve čtvrtém řádku Obr. 19 vidíme značnou variabilitu v množství β-aktinu, a proto je těžké od oka usuzovat na množství fosforylovaného NF-κB. Přehlednosti obrázku by prospěla normalizace na β-aktin a zkrácené popisky přímo v obrázku nebo alespoň legenda na stejné stránce jako obrázek.

Závěr: Přes výše zmíněné připomínky mohu konstatovat, že Nikol Vácová předložila velmi kvalitní diplomovou práci, jejíž některé výsledky se mohou stát součástí publikace v renomovaném zahraničním časopise. Práce splňuje požadavky stanovené Přírodovědeckou fakultou Jihočeské univerzity na kvalifikační práci a **doporučuji** ji k obhajobě.

Ve Starých Hodějovicích 23. května 2015

RNDr. Helena Langhansová, Ph.D.