



UNIVERSITY of CALIFORNIA, SAN DIEGO
SCHOOL OF MEDICINE

Ján Strnádel, PhD.
Department of Anesthesiology
School of Medicine
University of California, San Diego and
Sanford Consortium for Regenerative Medicine
Tel.: 858-534-7380
E-mail: jstrnadel@ucsd.edu

Posudok k diplomovej práci s názvom **“Použití neutrofilů v nádorové imunoterapii”**

V predloženej diplomovej práci autorka **Bc. Markéta Kovářová** študovala úlohu neutrofilných granulocytov v protinádorovej imunitnej odpovedi. Ako nádorový model bol zvolený melanóm, v tomto prípade zastúpený líniou B16-F10. Autorka v práci študuje úlohu neutrofilov na úrovni *in vitro* a *in vivo*, pričom zároveň skúma potenciál kotvenia ligandov fagocytárných receptorov. Jednou z ďalších študovaných stratégií v tejto práci bola kombinácia imunoterapie spojenej s cieľenou navigáciou neutrofilov do nádorového ložiska.

Terapie, založené na aktivácii alebo podpore prirodzených obranných mechanizmov organizmu predstavujú s najväčšou pravdepodobnosťou budúcnosť v liečbe nádorových ochorení. Štúdium mechanizmov, ktoré sú zodpovedné za spustenie, či zosilnenie protinádorovej reakcie je teda viac než žiaduce. Zadaná téma diplomovej práce je preto veľmi aktuálna.

Členenie diplomovej práce je prehľadné a plynulé. Teoretická časť je spracovaná veľmi detailne a svojim rozsahom predstavuje podstatnú časť diplomovej práce. Informácia, že rakovina je najčastejšia príčina úmrtia v rozvinutých krajinách je nepresná – stále totiž dominujú kardiovaskulárne choroby. V každom prípade by sa samotná teoretická časť dala využiť ako súčasť vysokoškolských skrípt, pretože napriek svojej rozsiahlosti neunavuje. Využíva množstvo citovanej literatúry, českej i zahraničnej.

V metodologickej časti sú použité experimentálne metódy popísané dostatočne prehľadne. Autorka v predkladanej diplomovej práci využíva naozaj pestrú paletu experimentálnych postupov a prístrojov. Magnetické sortovanie buniek spolu s analýzou na prietokovom cytometri sú

techniky, ktorých zvládnutie (spolu s ďalšími technikami, ktoré sú popísané v práci) dáva autorke solídny základ na prípadné absolvovanie stáže v zahraničí alebo v ďalšej vedeckej práci. K tejto časti mám jeden návrh do budúcich experimentov– v prípade (FACS) analýzy bunečnej suspenzie, pochádzajúcej z nádorového ložiska by bolo vhodné použiť tzv. izotypové kontroly ku každej detekčnej protilátke. Nádorové bunky totiž niekedy obsahujú povrchové molekuly, ktoré viažu nešpecificky detekčné protilátky. Mieru tejto väzby je vhodné určiť a podľa nej nastaviť tzv. “gating”, čiže hranice populácie s nešpecifickým signálom.

Kapitola číslo 4 (Výsledky) obsahuje množstvo dát, ktoré sú adekvátne štatisticky spracované a majú dobrú úroveň grafického výstupu. Na overenie experimentálnych hypotéz autorka použila dostatočne rozsiahlu skupinu zvierat. V diskusnej časti sú jednotlivé dosiahnuté výsledky dostatočne komentované.

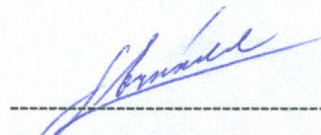
K predkladanej práci nemám výhrady, ide o veľmi dobre spracovanú diplomovú prácu, vypracovanie ktorej umožnilo riešiteľke zvládnuť rôzne techniky na úrovni *in vitro* a *in vivo*.

Prácu hodnotím známku “výborná”.

Do diskusie autorke predkladám tieto otázky:

- 1.) Aké sú ďalšie spôsoby izolácie neutrofilov?
- 2.) Viete vysvetliť, prečo chemoatrakcia neutrofilov do nádorov pomocou thioglykolátového média a kazeínu nevykazuje žiadny terapeutický účinok? Čo môže byť príčinou tohto javu?
- 3.) S akými bunkami imunitného systému by bolo možné podľa Vášho názoru kombinovať neutrofilov, aby sa dosiahol terapeutický efekt alebo zosilnenie efektu?

S pozdravom



Ján Strnadel, PhD., dňa 12.5.2015,

San Diego, CA, USA

Jindřich Chmelař

Oponentský posudek na magisterskou práci Bc. Markéty Kovářové

Použití neutrofilů v nádorové imunoterapii

Magisterská práce Markéty Kovářové se zabývá optimalizací a využitím neutrofilů v léčbě experimentálního nádoru – melanomu B16-F10, indukovaného subkutánní inokulací nakultivovanými nádorovými buňkami. Práce se svými 80-ti stranami řadí spíše k rozsáhlejším. Dělení je standardní a rozsah jednotlivých oddílů je vyvážený. Seznam citací je rovněž dlouhý a je vidět, že autorka se s většinou citovaných prací důkladně seznámila a informace dokázala vhodně použít jak v úvodní rešerši, tak k diskuzi získaných výsledků. U citací bych někdy, tam kde je to možné, doporučil používat novější literaturu. Práce je velmi čtivá, autorka má pěkný sloh a dle mého názoru talent pro psaní, možná nejen vědecké. Vytknul bych jen nesystematické používání anglismů a českých překladů, např. CD marker je zbytečně přeložen do češtiny jako CD znak, naopak místo použitého slova „primování“ by šlo jednoduše použít aktivace nebo senzitivace. Některé výrazy mě i pobavily, jako několikrát v práci zmiňované „ocáknutí“ supernatantu po centrifugaci. K jednotlivým oddílům:

Úvod:

Úvod je přehledně strukturován od obecných témat, jako je charakteristika nádorových onemocnění a možnosti terapie, přes popis známých funkcí ligandů a receptorů, použitých v experimentální části až po popis funkce neutrofilů a jejich role v nádorech. Rozsah informací je poměrně široký, ale adekvátní experimentální části. K úvodu mám jen pár drobných upozornění.

1. Protoonkogeny a antionkogeny se dle mého nedají označovat jako genové rodiny, tento termín by měl být rezervovaný pro sekvenčně a evolučně spřízněné geny a proteiny, nikoliv pro funkčně charakterizovanou skupinu.
2. V kapitole 1.4.4.4 je chyba v názvu, nejsou scavernerové ale scavengerové receptory

Cíle práce:

Cíle jsou definovány jasně a realisticky. Lze říci, že všechny body byly v práci adresovány, ať s úspěchem nebo bez.

Metodika:

U výčtu chemikálií by bylo možné uvést vedle jména firmy i katalogové číslo produktu. Popis metod a technik je velmi podrobný, přehledný a jasný. K této části nemám připomínky a otázky.

Výsledky:

Výsledky jsou řazeny postupně. Nejprve byl analyzován buněčný infiltrát v nádoru, kde se ukázalo, že neutrofilové tvoří podstatnou část infiltrátu. V další části byly provedeny různé pokusy in vitro za účelem analýzy schopnosti neutrofilů zabíjet nádorové buňky v přítomnosti testovaných látek. Zabíjecí mechanismus byl testován pomocí stanovení míry degranulace změřením myeloperoxidázové aktivity nejprve in vitro a poté i in vivo přímo v nádoru. Nakonec byl testován vliv thioglykolátového média a kaseinu na infiltraci neutrofilů do nádoru.

Zde mám několik otázek:

1. U pokusu č. 1 bych ocenil postup analýzy na průtokovém cytometru, jak byly jednotlivé populace detekovány a jak byl proveden „gating“.

2. Z grafů není nikde patrné, z kolika vzorků byla spočtena standardní odchylka a kolikrát byl pokus opakován. Obr. 7 a 8 nemá nikde statistickou průkaznost, přestože je vliv vázaného laminarinu očividný. **Jak by se dala průkaznost zajistit?**
3. Proč dochází ke snížení aktivity MPO (Obr. 14) při použití laminarinu a mananu oproti samotným neutrofilům? Jeden by čekal opak.
4. Na obr. 19 mi není jasné, co je relevantní kontrola. Je to nádorové buňky+neutrofilů nebo volný Zymosan. I zde mě překvapuje nepřítomnost statistické průkaznosti. Kolik bylo vzorků ve skupině?
5. Proč samotné nádorové buňky vykazují MPO aktivitu (Obr 19)?
6. In vivo to vypadá, že dochází k aktivaci MPO při injekci zymosanu a LPS, nicméně to vypadá, že se měření pohybuje na hranici detekovatelnosti MPO. Jsou výsledky použitelné?
7. Obr. 23 – chybí standardní odchylky. Proč?

Obecně je ve výsledcích škoda, že je příliš velký rozptyl jednotlivých vzorků, jsou příliš velké standardní odchylky. Jak by toto šlo řešit?

Diskuze:

Diskuze podrobně analyzuje výsledky a dává je do kontextu s dostupnou literaturou. V části týkající se dvou možných subpopulací neutrofilů N1 a N2 by bylo dobré tuto hypotézu experimentálně otestovat. Jak je možné experimentálně odlišit N1 a N2 populaci?

Celkově se mi práce Markéty Kolářové velmi líbila a doporučuji ji k obhajobě. navrhuji známku 1.

V Českých Budějovicích, 12.5.2015

