

**Bc. Denisa Sváčková: Studium mechanismů působící při nádorové imunoterapii založené na instalaci ligandů fagocytárních receptorů na povrch nádorových buněk.**

(73 stran textu, 105 citací, 69 obrázků včetně histogramů, 1 tabulka v textu)

Předložená práce má obecně za cíl hledání cesty k nejvhodnější nádorové imunoterapii, která bude účinná v humánní. Toto zadání je z vědeckého hlediska optimální- míří na relativně vysoké cíle, výzkum je dostatečně průkopnický (byť navazuje na práci týmu školitele), téma je také dostatečně atraktivní, metody dostupné a především výsledky jsou potenciálně důležité pro medicínu v návaznosti na zdraví člověka. Problematika nádorů (speciálně melanomů) je v současné době víc než aktuální, neboť jejich výskyt v lidské populaci stoupá i přes výrazné pokroky moderní medicíny. Jakýkoliv pokrok v této oblasti má pro člověka velký význam.

Denisa Sváčková nás v úvodní části komplexně (na 27 stranách) uvádí- krok za krokem- do celé problematiky. Celý tento úvod doplnila autorka 9 převzatými obrázky (zdroj každého obrázku je řádně citován), což je u tohoto typu práce- pro porozumění náročné problematice- výhodou.

Cíle práce (viz výše) si autorka dala dosti vysoké, ale dosažitelné. Velkou výhodou je zde nasazení klasických histologických technik, které umožnily dostatečné vyhodnocení složitých experimentů.

Kapitola "Materiál a metody" podrobně popisuje na 10 stránkách všechny použité techniky a to jak týkající se pokusných myši, chemikálií, přípravy nádorových buněk B16- F10 pro použití in vivo, přípravy terapeutických látek pro in vivo experimenty, přípravy histologických preparátů a jejich vyhodnocení, tak měření a výpočet velikosti nádorů, počítání plicních metastáz a statistické vyhodnocení výsledků. Histologické techniky jsou dobře vybrány a podle obrázků i dostatečně provedeny (pro budoucí pokračování studia této problematiky bych doporučil relativně jednoduché techniky transmisní elektronové mikroskopie eventuálně jako „vyšší třídu“ imunoelektronovou mikroskopii). Nakonec jsou popsány jednotlivé experimenty. V těch je použito od 24 do 51 exemplářů myši což je pro zachycení případné biologické variability (i pro statistické vyhodnocení výsledků) dostatečné.

V kapitolách "Výsledky" (na 18 stranách včetně obrázků) a „Diskuse“ (6 strany) Denisa Sváčková předkládá a komentuje to, čeho se jí podařilo v diplomové práci dosáhnout, přičemž podotýká že práce navazuje na předchozí výzkumy provedené na Katedře medicínské biologie (a které byly zaměřeny na nádorovou imunoterapii s využitím vrozené imunity). Úsporným jazykem představuje výsledky, vyhodnocuje je a diskutuje. Vysocé hodnotím jak experimentální část práce týkající se nádorů, tak histologické vyhodnocení experimentů (podpořené originálními histologickými obrázky). Autorka konstatovala, že histologickým vyhodnocením lze získat obraz mikroprostředí nádoru, kde pak je možné vidět v čase postupující degradaci tkáně. Upozorňuje ale, že nelze rozpoznat všechny typy buněk- NK buňky, dendritické buňky, popřípadě Tc- lymfocyty tak, jako dokáže průtoková cytometrie. Sama si uvědomuje vhodnost použití imunohistochemického zpracování (a já připomínám výhody imunoelektronové mikroskopie jak už jsem zmínil výše).

V závěrech práce Denisa Sváčková konstatuje, že Flagelin a Pam3CSK4 se neosvědčily jako vhodná náhrada LPS v nádorové terapii založené na kombinaci TLR agonistů se stimulací fagocytózy. V kombinaci s mananem- BAM byly však účinné proti vzniku metastáz, což si vysvětluje stimulací vyžrávání dendritických buněk a tedy spojením vrozené a získané imunity. Nebyly zjištěny zásadní rozdíly mezi použitím volné či vázané *Listeria monocytogenes* pro účely nádorové imunoterapie. Podařilo se dosáhnout dalších úspěchů (viz závěry její práce). V neposlední řadě je důležité, že se fotografiemi histologických preparátů podařilo zdokumentovat typické rysy neléčeného melanomu i typické nálezy po imunoterapii pomocí směsi *Listeria monocytogenes*-SMCC, manan-SMCC, R-848 a POLY I:C. Mohu tedy konstatovat, že se cíle práce podařilo splnit. Hodnotím také aktuálnost tématu a význam výsledků pro směřování dalších výzkumů v oboru imunoterapie nádorů.

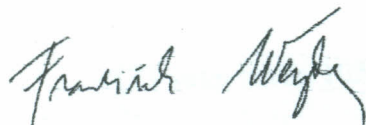
Seznam literatury obsahuje 105 citací (odpovídajících mezinárodnímu standardu) pokrývajících aktuální stav oboru. Práce je zakončena přílohou s obrázky.

Musím konstatovat, že jsem v práci nenašel závažné chyby a nedostatky, které by zásadně snižovaly úroveň práce. Drobné nepřesnosti a gramatické chyby jsem se rozhodl nediskutovat neboť zde nehrají velkou roli a nesnižují vysokou úroveň této diplomové práce. Samozřejmě doporučuji práci k opublikování ve vědeckém časopise (nejspíš po upřesnění některých partií).

### **Závěr**

V celkovém hodnocení předložené magisterské práce mohu konstatovat, že Denisa Sváčková problematiku zvládla a splnila všechna kritéria PřF JU na magisterskou práci. Studentka zde

prokázala schopnost samostatné vědecké práce i na obtížné tématice. **Práci Bc. Denisy Sváčkové: „Studium mechanismů působící při nádorové imunoterapii založené na instalaci ligandů fagocytárních receptorů na povrch nádorových buněk“ doporučuji přijmout jako magisterskou diplomovou práci.**



Doc.RNDr.František Weyda,CSc.

Přírodovědecká fakulta JČU (katedra medicínské biologie)

České Budějovice, 22. května 2016

# OPONENTSKÝ POSUDEK NA DIPLOMOVOU PRÁCI

Název práce:

## STUDIUM MECHANISMŮ PŮSOBÍCÍCH PŘI NÁDOROVÉ IMUNOTERAPII ZALOŽENÉ NA INSTALACI LIGANDŮ FAGOCYTÁRNÍCH RECEPTORŮ NA POVRCH NÁDOROVÝCH BUNĚK

Autor práce: Bc. Denisa Sváčková

Oponent: Ing. Eva Pokorná, CSc.

Předložená práce navazuje na řadu předchozích prací, které hledají optimální cestu k využití imunoterapie v onkologii. Byly testovány kombinace a mechanismy, které jsou založeny na instalaci ligandů fagocytárních receptorů na povrch nádorových buněk. Cílem tohoto hledání je objevit takovou kombinaci, která by byla vysoce účinná a současně netoxická pro člověka. Tato práce přispěla dalším dílem k dosažení výše uvedeného cíle.

Imunoterapie nádorů je téma velmi aktuální, protože na rozdíl např. od běžně užívané chemoterapie se jedná o léčbu bez nežádoucích vedlejších účinků a tedy pro organizmus neagresivní.

Soubor prostudované literatury je vyčerpávající a dostatečně využitý v úvodu i v diskuzi. Všechny části práce jsou dobře zpracované, seřazené ve správném pořadí a splňují všechny formální požadavky kladené na odbornou práci.

Pochvala za:

- 1) Velmi pěkně napsanou diskuzi.
- 2) Zajímavou histologickou analýzu, která podrobně zkoumá vývoj léčeného a neléčeného melanomu.

K práci mám následující připomínky:

- 1) V práci je použita řada velmi složitých látek s komplikovanými názvy. I když si v Úvodu přečteme fakta o jednotlivých látkách, velmi špatně se nám, kteří tyto látky běžně nepoužíváme, z toho daří pochopit, proč právě danou kombinaci jste použili. Myslím, že by bylo dobré zařadit navíc kapitolu či odstavec, který jasně a srozumitelně vysvětlí, proč jste vybrali kterou kombinaci a proč právě v pořadí, které popisujete. Jaká je mezi nimi souvislost, když podle názvů testovaných látek se občas zdá, že spolu nesouvisí.
- 2) Zdálo by se mi srozumitelnější, kdybyste nejprve na základě testování vybrali nejúčinnější kombinaci imunoterapie a potom jí důkladně otestovali, tj. např. vyhodnotili dobu přežití i incidenci metastáz v době úmrtí a u stejné léčby provedli v dalším kroku i histologickou analýzu. Není mi jasné, proč se někdy počítaly metastázy a někdy sledovalo přežití a proč právě jiná kombinace byla použita pro histologickou analýzu.
- 3) Graf obr. 12 a graf obr. 15: není mi jasné, jak vznikl sloupec K – PBS. Z kapitoly Materiály a metody víme, že v kontrolní skupině K bylo vždy 5 myši. Pokud tedy vyhodnocujeme v % incidenci metastáz, může nám vyjít pouze 0, 20, 40, 60, 80 či 100%. U skupiny K ale vyšlo 75% u obou pokusů (č. 1 i č. 2). Z toho myslím vyplývá, že zde byly hodnoceny jen 4 myši a u tří se

našly metastázy. Ale o úmrtí páté myši, nebo proč byly vyhodnocovány jen čtyři myši, není v práci nikde žádné vysvětlení. Můžete toto vysvětlit?

- 4) Práce obsahuje běžné množství překlepů a chyb v češtině, někdy i chyby hrubé. Chyba je dokonce i v názvu práce, kde by se vyskytovat neměla (namísto působící by mělo být působících).

K práci mám následující otázky:

- 1) Můžete lépe vysvětlit, proč se používá redukční činidlo (jen velmi stručně je to popsáno v kapitole Materiály a metody).
- 2) Podle čeho jste prováděli plán pokusů, např. proč byly u pokusů 1 a 2 vyhodnocovány metastázy a u 3 a 4 doba přežití? Proč jste při sledování přežití nespočetali rovnou i počet metastáz v plicích. Pokud se to provede u mrtvé myši do asi 48 hod, dá se to ještě vyhodnotit.
- 3) Podle čeho jste určili dny, ve kterých má být podávána účinná látka u jednotlivých experimentů tak, aby byl účinek co nejvyšší?
- 4) Dovedete vysvětlit, proč kombinace Pam3CSK 4-BAM podporuje růst nádoru, ale současně inhibuje tvorbu metastáz? Totéž pak platí pro kombinaci Flagelin-BAM. Částečně to vysvětlujete v Diskuzi (3.odstavec na str. 58), ale toto nevysvětluje proč nekoreluje působení na růst nádoru a na tvorbu metastáz.
- 5) Zkoušeli jste histologicky analyzovat plicní metastázy? Myslíte si, že histologická analýza by se shodovala s histologickou analýzou nádoru?
- 6) Jsou látky R 848 (resiquimod), manan-BAM, či Listeria SMCC zcela bezpečné pro člověka?
- 7) Můžete shrnout z výsledků Vašich kolegyně, jestli se už podařilo účinně nahradit LPS nějakou jinou, pro člověka netoxickou látkou?

Závěr:

Jedná se o velmi zajímavou a dobře zpracovanou práci. Autorka prokázala, že je schopná samostatně řešit zadanou problematiku po stránce teoretické i praktické. Proto doporučuji, aby předložená práce byla přijata k obhajobě a hodnocena známkou „výborná“.



V Praze dne 22.5.2016

Ing. Eva Pokorná, CSc.