

Oponentský posudek na bakalářskou práci Lucie Paďoukové „Studium mechanismů nádorové imunoterapie založené na kombinaci resiquimodu s kotveným mananem a její další optimalizace“

Lucie Paďouková vypracovala bakalářskou práci zabývající se problematikou imunoterapie myšího melanomu a hledáním optimální kombinace terapeutik. Tento přístup je ve výzkumné skupině Dr. Ženky úspěšně zaveden již několik let a předložená práce tak přináší další cenný díl do složité skládačky vztahů imunitního systému a nádorového bujení. Určitým pokusem o metodické oživení práce je pak srovnání dvou způsobů stanovení produkce interferonu gamma (ELISA, intracelulární značení pro FACS). Tuto pasáž je třeba vnímat pouze jako pilotní studii; správné použití těchto metod bude vyžadovat větší propracovanost i zkušenosti autorky.

Po formální stránce má předložená práce o rozsahu 53 stran standardní členění. Autorka má zjevně nadání psát poutavě a zaujmout i čtenáře, který už diplomové práce na obdobné téma četl mnohokrát. Na druhou stranu si nelze nevšimnout častých formálních a stylistických chyb:

- anglická stavba vět a nevhodný překlad (např. *hepatocyty jater*, *toxičnost* místo *toxicita*)
- naopak chybějící překlad tam, kde je to možné (např. *permeabilization buffer*, *absolut count kuličky*)
- přílišná zkratkovitost (z textu na str. 5 a 8 vyplývá, že CTLA-4 je protilátka, nikoliv antigen)
- chybějící kurzíva u latinských rodových a druhových jmen
- používání laboratorního žargonu (např. *mastermix*)
- vysvětlení zkratk v textu pomocí znaku „=“ není příliš vhodné
- nekvalitní Obr. 6.

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

- 1) Str. 1: Proč mají ženy vyšší úmrtnost na rakovinu?
- 2) Str. 5: Proč mají kuřačky větší riziko výskytu rakoviny děložního čípku?
- 3) Kapitola o vlastnostech nádorů je napsaná velmi zajímavě; oceňuji např. zmínku o tom, že i benigní nádor může být za jistých okolností život ohrožující, na což se obvykle zapomíná. Škoda jen, že v této souvislosti Lucie cituje učebnici pro střední zdravotní školy.
- 4) Str. 25: Jaká byla výsledná koncentrace nádorových buněk pro značení protilátkami na FACS?
- 5) Nastavení laserů průtokového cytometru (škálovací faktor, laser delay apod.) není v daném kontextu podstatné. Důležitější je uvést strategii tzv. gatingu, tj. vyloučení shluků, rozlišení živých a mrtvých buněk a především jakým způsobem byly definovány koncové subpopulace buněk, např. že za CTL byly považovány buňky CD45⁺ CD3⁺ CD8⁺ atd.

- 6) Jsou data z průtokového cytometru kompenzována (tj. bylo zohledněno překrývání emisních spekter fluochromů)?
- 7) Na str. 28 je uvedeno, že buňky B16-F10 byly usmrceny UV zářením, kterému byly vystaveny po dobu 1 hodiny. Jaká byla účinnost takového zabíjení? Proč nemohly být jako zdroj nádorového antigenu použity živé buňky?
- 8) V další práci doporučuji pro větší přehlednost uvádět přímo v grafech místo čísel experimentálních skupin *I. – IV.* rovnou zkrácené názvy, např. *PBS, Res, Res+Man* atd.
- 9) Ad stanovení intracelulárního IFN- γ : V seznamu chemikálií není uvedena protilátka proti IFN- γ . Výstupem měření na průtokovém cytometru není jen procento buněk nesoucí daný marker (IFN- γ), ale také relativní míra jeho produkce v jednotkách MFI (mean fluorescent unit), zjištěná z histogramu. Prosím o doplnění těchto hodnot při obhajobě. Rovněž prosím doplnit, z čeho jsou vypočítána procenta v Obr. 10 (jinými slovy, co představuje 100 %). Které další buňky mohou produkovat IFN- γ ?
- 10) Ad ELISA: Opět není nikde uveden přesný název ELISA kitu. Domnívám se, že citlivost v řádu pg/ml je v dnešní době standardní a nemusí být označována přívlástkem supersenzitivní. V tabulce na str. 31 je chybně uvedeno, že se jedná o desítkové ředění. Na základě čeho byl zvolen rozsah kalibrační křivky? Pokud to správně chápu a testované vzorky byly 5 \times naředěny, pak minimálně u myši Id byly hodnoty absorbance mimo kalibrační křivku, a proto jsou vypočtené koncentrace IFN- γ nevěrohodné.
- 11) Chápu, že předložená práce je součástí dlouhodobého projektu a tudíž v diskuzi je odkazováno na množství diplomových prací Vašich předchůdkyň. Kromě nich jsou však diskutovány pouze 2 publikace mimo skupinu Dr. Ženky, což považuji za nedostatečné.

Závěr: Na předložené bakalářské práci Lucie Paďoukové oceňuji velký podíl experimentální práce v laboratoři. Jak jsem zmínila výše, do metodiky detekce cytokinů je třeba proniknout hlouběji a doufám, že se tak v budoucnosti stane. Nicméně i přes výhrady k diskuzi a ostatní připomínky splňuje předložená práce všechny náležitosti závěrečné práce na Přírodovědecké fakultě Jihočeské univerzity a **doporučuji** ji k obhajobě.

V Českých Budějovicích 17. května 2016


RNDr. Helena Langhansová, Ph.D.