

Oponentský posudek na diplomovou práci Pavly Nedbalové:

Úloha vrozené a získané imunity v imunoterapii melanomu a pankreatického adenokarcinomu

Ve své diplomové práci se autorka věnuje v rámci výzkumu možností nádorové imunoterapie tématu vlivu vrozené a získané imunity na úspěch léčby. Práce splňuje po formální stránce všechny náležitosti, oddíly jsou vyrovnané, co se délky týká. Práce je psána srozumitelným, čtivým a vědecky přesným jazykem bez zbytečného balastu, gramatické a slohové chyby jsem také neobjevil.

V úvodu autorka seznamuje čtenáře nejprve obecně a možná až příliš stručně s příčinami vzniku nádorových onemocnění, onkogenů a kancerogenů. Autorka zmiňuje 2 onkogeny, jeden pro melanom a jeden pro pankreatický adenokarcinom. **Existují ještě jiné známé onkogeny pro tyto typy rakoviny?** Dále se věnuje vlastnostem nádorů a použitých nádorových linií. **Existují jiné modely melanomu a pankreatického adenokarcinomu a jak se jejich vlastnosti liší od použitých linií?**

Autorka dále popisuje jednotlivé komponenty imunitního systému, které jsou cílem složek studované imunoterapeutické směsi a také jejich vliv na rozvoj či potlačení nádorů. Je diskutována role buněčných populací vrozené i získané imunity i mechanismy úniku nádorových buněk. Nakonec jsou diskutovány možnosti nádorové imunoterapie. Úvod je velmi dobře zpracován a čtenáře seznamuje podrobně s tematikou.

Cíle práce jsou stanoveny jasně a realisticky.

Metody jsou popsány srozumitelně a podrobně.

U výsledků došlo ke zdvojení stránek 28-32. Jsou předkládány výsledky 4 imunoterapeutických pokusů. Na str. 28 autorka píše, že získaná imunita nemá zásadní vliv na redukci nádorového růstu, a to na základě kombinace komplexní terapie s usmrcenými buňkami. Na základě pokusu z obr. 1 však dle mého názoru nelze vyhodnotit vliv získané imunity, protože podle mě nelze jednoznačně určit, jaký účinek může mít přidání mrtvých buněk ke směsi. **Proč není u tohoto pokusu přežívací graf a jak vypadal?**

Další experimenty se zabývaly vlivem CD4+ a CD8+ T lymfocytů. Obr. 3 poukazuje na významný vliv CD4+ lymfocytů na přežívání myši. Bylo by zajímavé zjistit, jaký je poměr sub-populací CD4+ T lymfocytů během terapie. Tato informace by mohla být klíčová pro pochopení mechanismu úspěchu a dlouhodobého účinku terapie. **Existuje představa o tom, jaká populace CD4+ T lymfocytů je dominantní během terapie?** Podobně důležité by bylo identifikovat konkrétní klon, resp. antigen, který aktivuje příslušný klon T lymfocytů. Ten by mohl být v budoucnu součástí terapie. Je toto reálné?

Zajímavý je vliv anti-PD1 a anti-CD40 na přežívání i růst nádoru. Vypadá to, že sama anti-CD40 protilátka má sama o sobě terapeutický účinek. Existují anti-CD40 protilátky s antagonistickým, slabě a silně agonistickým účinkem. **Jaký typ anti-CD40 byl použit a jaký je tedy předpokládaný mechanismus účinku v prezentovaném pokusu?** Bohužel v kapitole 4.4. chybí informace o tom, o jaký typ nádoru/modelu se jedná (v metodách je uveden melanom, ale tato informace by měla být i ve výsledcích).


Ve třech *in vitro* pokusech byla sledována interakce nádorových buněk s NK buňkami a neutrofily, aktivovanými mananem ukotveným na nádorových buňkách. Všechny tři pokusy ukázaly, že navázání mananu zvyšuje cytotoxicitu NK buněk i neutrofilů. Bylo by zajímavé vidět, zda při kombinaci obou leukocytárních populací dojde k synergii při zabíjení buněk. Existuje takový pokus?

Diskuze je napsána velmi dobře a srovnává výsledky s dostupnou literaturou. Získané výsledky významně posouvají výzkum imunoterapie nádorů a jsou dalším krokem k nalezení účinné modulace imunitního systému, který by pak byl schopen efektivně ničit rakovinné bujení.

Předkládanou práci považuji za výbornou a navrhuji ji k obhajobě se známkou **výborně**.

V Českých Budějovicích, 10.5.2017

RNDr. Jindřich Chmelář, Ph.D.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Chmelář', written in a cursive style.

OPONENTSKÝ POSUDEK NA DIPLOMOVOU PRÁCI

Název práce:

ÚLOHA VROZENÉ A ZÍSKANÉ IMUNITY V IMUNOTERAPII MELANOMU A PANKREATICKÉHO KARCINOMU

Autor práce: Bc. PAVLA NEDBALOVÁ

Oponent: Ing. Eva Pokorná, CSc.

Předložená práce zpracovává velmi potřebné téma – léčbu onkologického onemocnění. Autorka a celý tým spojený s RNDr. Janem Ženkou, CSc. vyvíjejí vlastní nový přístup k imunoterapii nádorů, který se zdá být velmi nadějný. Tato práce navazuje na řadu předchozích prací, které hledají optimální cestu ke stále vyšší účinnosti inhibice růstu nádorů. Během celé řady předchozích testování se stále nabízel otázka, jestli náhodou kromě vrozené imunity nehraje v procesu imunoterapie roli i imunita získaná. Odpověď na tuto otázku si dává za cíl nalézt tato práce. Zároveň testuje další nové možnosti, jak již sestavenou kombinaci preparátů a léčiv posílit o nové látky, které účinnost ještě zvýší. V případě této práce je to hlavně protilátka anti-CD 40.

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) Pěkně napsanou diskuzi.
- 2) Srozumitelnost celé práce, i když tematika je velmi složitá a není snadné jí jednoduchou formou vysvětlit a popsat.

K práci mám následující drobné připomínky:

- 1) V práci je použita řada velmi složitých látek s komplikovanými názvy. Rovněž všechny komponenty imunitního systému a jejich vzájemné působení není snadné pochopit a jednoduše popsat. Když čtenář přečte celou práci a propojí si informace z úvodu, výsledků a diskuze, pochopí dobře souvislosti. Vzhledem ke složitosti tematiky by ale myslím bylo dobré, kdyby např. v seznamu cílů práce bylo stručně vysvětleno, proč byl zvolen tento cíl, proč k tomu byla použita vybraná metodika, jaký očekáváme výsledek a pokud takový je nebo není, co z toho vyplyne. Pomohlo by to čtenáři se lépe a rychleji v práci orientovat.
- 2) V kapitole 3.13.1 by mělo být uvedeno, že se jednalo o *wild type* myši, protože to nemusí být každému úplně jasné a protože materiál a metody mají být popsány naprosto přesně.
- 3) Další připomínka je spíše poznámka k zamýšlení. Ze zkušenosti vím, že je lepší při práci se subkutánně aplikovanými tumory měřit tři rozměry (délku, šířku a výšku). Když totiž dochází vlivem nějakého léčiva k redukci objemu nádoru, začíná se obvykle nejprve zmenšovat výška

nádoru. A to se měřením jen dvou rozměrů nepostihne. Často se ale měří dva rozměry, takže to není žádná chyba, jen by měření bylo možná přesnější.

- 4) V kapitole 3.13.2 a 3.13.3 je uvedeno, že data ze skupiny C a D byly importovány z jiného pokusu. Mělo by být upřesněno ze kterého a kde se o něm můžeme dočíst.

K práci mám následující otázky:

1. V úvodu v kapitole 1.1.1.2. Kancerogeny uvádíte, že jedním z biologických kancerogenů jsou paraziti. Můžete o tom prosím pohovořit podrobněji?
2. V diskuzi na str. 39 uvádíte, že podnětem pro studium úlohy získané imunity bylo zjištění, že vyléčené myši jsou odolné vůči retransplantacím nádorů. To je velmi zajímavé a proto prosím, jestli byste nám o tom pověděla nějaké podrobnosti.
3. Zkoušeli jste předtím, než jste vybrali pankreatické buňky Panc02 pro ověření míry cytotoxického efektu neutrofilů a NK buněk, vyzkoušet toto působení na melanomech, které nejčastěji používáte?
4. Plánujete ověřit působení NK buněk a neutrofilů rovněž in vivo?
5. Můžete vysvětlit pojem „frustrovaná fagocytóza“, o kterém hovoříte na str. 44?
6. Zkoušeli jste někdy použít kombinaci manan-BAM + R848 + POLY(I:C) + LTA u myši s pokročilejší fází nádorového onemocnění, např. u těch, které už mají metastázy nebo mají opravdu velký nádor a jsou kachektické? Má tato imunoterapie nějaké vedlejší účinky?

Závěr:

Jedná se o zajímavou a velmi 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.



Ing. Eva Pokorná, CSc.

V Praze dne 18.5.2017