

Oponentský posudek na bakalářskou práci Karolíny Holkové:

Optimalizace nádorové imunoterapie založené na použití agonistů receptorů TLR2, TLR3 a TLR7 v synergii s kotveným mananem

Předložená bakalářská práce se zabývá léčbou melanomu B16-F10 u myší prostřednictvím stimulace činnosti imunitního systému, což je naprosto v souladu s výzkumným záměrem autorčina školitele Dr. Ženky. Konkrétně je v této práci již osvědčená terapeutická směs tvořená agonisty Toll-like receptorů a kotveným mananem kombinována s monoklonální protilátkou proti CTLA-4. Dále je zkoumán vliv různého počtu terapeutických dávek na potlačení růstu nádoru a přežití myší.

Bakalářská práce je tvořena 53 stranami a je členěna do standardních oddílů. Číslování jednotlivých kapitol a podkapitol je však nelogické. Kupříkladu podkapitoly teoretického úvodu jsou na stejné úrovni číslování jako kapitola výsledky nebo kapitola diskuze. Kapitoly závěr či literatura na druhou stranu nejsou číslovány vůbec. V práci dále postrádám seznam použitých zkratk. Tento seznam by byl jistě užitečný, neboť v textu se vyskytuje velké množství zkrácených názvů, z nichž mnohé nejsou vysvětleny hned, co jsou napoprvé použity.

Čtivost předložené práce snižuje poměrně častý výskyt neobratných, mnohdy až těžko pochopitelných formulací. Jako příklad mohou posloužit věty:

„Nádory málo exprimují nádorové antigeny, které vedou ke vzniku metastáz.“
„Tudíž i specifické antigeny jsou jen na některých nádorech, na jiných jsou specifické jinak.“

V textu se rovněž vyskytují formulace nevhodné pro odborný styl, například:

„a tak to pokračuje dokola“
„Buňky se musí nejprve rozmnožit, vyprodukovat nějaké protilátky a pak teprve se může něco stát.“

Text obsahuje spíše menší množství překlepů, na druhou stranu poměrně často chybí mezery mezi slovy. Narazila jsem i na několik pravopisných chyb. Celkově mám dojem, že práce byla psána ve spěchu a autorka neměla dostatek času na jazykovou a stylistickou korekturu textu. Dále je vhodné se v česky psané práci pokud možno vyhnout používání anglických názvů, tedy například místo erysipelas by se mělo psát erysipel a místo Fetal Calf Serum je lépe psát fetální telecí sérum.

ÚVOD na 23 stranách tvoří nejrozsáhlejší část práce. Autorka v něm uvádí obecné informace o nádorech, vrozené a získané imunitě a imunoterapii. Konkrétněji se věnuje melanomu, imunitním kontrolním bodům a receptorům rozeznávajícím vzory, zejména pak Toll-like receptorům. Obzvláště oceňuji poslední podkapitulu úvodu, kde je vysvětlena funkce jednotlivých složek terapeutické směsi používané v experimentech. Lze konstatovat, že teoretická část svým obsahem odpovídá experimentální části práce. K úvodní části mám následující výhrady:

- Kol. je zkratka kolektivu, tím pádem by se na konci měla psát tečka.
- Bakalářské či diplomové práce je třeba citovat, pokud je zmiňován nějaký konkrétní přínos těchto prací, například výsledky experimentů. Rozhodně by však studentské práce neměly být zdrojem obecných informací, jež lze čerpat z důvěryhodnějších literárních zdrojů, zejména původních vědeckých publikací. Tudíž například převzetí tabulky I (na str. 21) z bakalářské práce Karolíny Kvardové je nevhodné.
- Pomocné T lymfocyty není správné označovat jako „pomocné Th buňky“. Stejně tak cytotoxické T lymfocyty by neměly být označovány jako „cytotoxické Tc buňky“ (str. 10). Podobně by se nemělo psát T regulační lymfocyty, nýbrž regulační T lymfocyty.
- Slovem opsonizanty (str. 14) jsou pravděpodobně míněny opsoniny.
- Signálním proteinům produkovaným buňkami imunitního systému se v češtině říká cytokiny, nikoli cytokíny.

- Rodová a druhová jména (např. *Listeria monocytogenes*) by se měla psát kurzívou. Totéž platí i pro další odborné termíny převzaté z latiny (*in vitro*, *in vivo*, *in situ*).
- Je velký rozdíl mezi slovy **prozánětlivý** a **protizánětlivý**. Není správné tvrdit, že NOD-like receptory organizují protizánětlivou a antimikrobiální imunitní odpověď (str. 18) nebo že NF- κ B reguluje produkci protizánětlivých chemokinů a cytokinů (str. 23).
- V textu chybí odkazy na obrázky. Navíc je obrázek 2 ve špatné kvalitě.

CÍLE PRÁCE by dle mého názoru mohly být formulovány konkrétněji.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST PRÁCE je postavena na dvou *in vivo* pokusech, které zahrnovaly transplantaci nádorových buněk, aplikaci terapeutických látek, měření velikosti nádorů a sledování přežívání myši. Výsledky obou experimentů znázorňuje celkem šest grafů. Ke kapitolám materiál a metody a výsledky mám následující připomínky:

- Kapitola materiál a metody by měla být psána tak, aby dle instrukcí v ní bylo možné pokusy kdykoli zopakovat. Proto je vhodné uvádět užité koncentrace látek, poměry apod. Tyto informace mi však v kapitolách 10.2 a 10.3 chybí.
- Seznam použitých chemikálií není kompletní.
- Vždy je vhodné zmínit, zda data jsou v grafech vyjádřena jako průměr či třeba jako medián.
- Nestačí jen uvést, jaké statistické testy byly použity. Také je potřeba sdělit, kdy byl který statistický test použit. Z textu práce mi není vůbec jasné, zda jednocestná ANOVA byla užívána jen v případě dat vyjádřených jako velikost plochy pod křivkou (AUC) nebo byla užita jak v případě dat vyjádřených jako velikost plochy pod křivkou, tak i v případě dat vyjadřujících změnu velikost nádoru v čase.
- „Hladina významnosti byla dosažena.“ není z hlediska statistiky správná formulace.
- V případě druhého grafu (obr. 5) by měla být namísto jednocestné analýzy variance užita dvoucestná ANOVA.
- Velká část textu na str. 33 patří spíše do diskuze než do výsledků.

DISKUZE zabírá zhruba 2,5 strany předložené bakalářské práce. Z toho na straně a půl se autorka věnuje popisu vývoje terapeutické směsi používané v obou experimentech. Tento popis dle mého názoru patří spíše do úvodu než do diskuze. Vlastní výsledky pak autorka diskutuje na jedné straně a staví je do kontextu s pouhými dvěma literárními zdroji. Během čtení práce jsem nikde nenašla informace o tom, zda se protilátka proti CTLA-4 užívá (nebo bude užívat) kléčbě pacientů s melanomem a pokud ano, jaká je úspěšnost této terapie. Myslím si, že toto by bylo vhodné zařadit aspoň do diskuze a srovnat s ne příliš valným účinkem protilátky proti CTLA-4 v pokusu č. 1.

Výsledky experimentální části práce jsou přehledně shrnuty ve 4 bodech v kapitole ZÁVĚR.

Kapitola LITERATURA čítá úctyhodných 152 literárních zdrojů. Z toho 28 literárních zdrojů představují učebnice, slovníky a brožury pro širokou veřejnost. Takovýmto zdrojům literatury je vhodné se pokud možno vyhnout. Některé literární prameny jsou v textu práce chybně citovány, jiné jsou zase citovány v textu práce, ale chybí v seznamu použité literatury (např. Krejčík a Dvořáček, 1978; Weiner a kol., 2009). Jedna citace v seznamu literatury (Mahla a kol., 2013) je neúplná. Při užitém způsobu citování navíc není třeba literární prameny v seznamu literatury číslovat. Stačí, když jsou seřazené abecedně.

I přes všechny výše uvedené výhrady a připomínky se domnívám, že práce splňuje nároky kladené na bakalářské práce na Přírodovědecké fakultě Jihočeské univerzity a **doporučuji** ji proto k obhajobě. Na autorku mám následující otázky, které doufám, že mi během obhajoby zodpoví:

- 1) Na str. 11 tvrdíte, že skrze CTLA-4 dochází k inhibici aktivity T lymfocytů. Taktéž tvrdíte, že CTLA-4 je exprimován na regulačních T lymfocytech. Jakou roli hraje CTLA-4 v případě regulačních T lymfocytů? Jaký vliv může mít použití monoklonální protilátky proti CTLA-4 na regulační T lymfocyty?

- 2) Jak může stimulace produkce interferonů typu I napomoci k eliminaci nádorových buněk?
- 3) Na str. 23 píšete, že manan byl ukotven na molekuly za pomoci BAM. Jaké molekuly máte na mysli?
- 4) V pokusu č. 2 je čtvrtá skupina myší vedena jako kontrolní. Bylo těmto myším intratumorálně aplikováno 50 μ L PBS?
- 5) Obrázky 4 a 7 znázorňují změnu objemu nádoru v čase u čtyř různě léčených skupin myší. Byl užit nějaký statistický test k hodnocení rozdílů ve velikosti nádoru mezi jednotlivými skupinami myší? Pokud ne, jaký statistický test by bylo vhodné na takovýto typ dat použít?
- 6) Byl zjištěn statisticky signifikantní rozdíl mezi skupinami R-848 + POLY I:C + manan-BAM + LTA a R-848 + POLY I:C + manan-BAM + LTA + anti-CTLA-4? Jaká byla dosažená hladina významnosti (p)? Pokud rozdíl mezi oběma skupinami myší nevyšel statisticky průkazně, co to znamená?
- 7) Na str. 36 tvrdíte, že kombinace směsi s protilátkou proti CTLA-4 vedle květší redukci nádorového růstu než protilátka proti CTLA-4 samotná a že předpokládáte, že toto je způsobeno deplecí regulačních T lymfocytů, kterou vyvolala právě protilátka proti CTLA-4. Je ale toto tvrzení opravdu správné?
- 8) Na str. 37 uvádíte, že: „Minimální počet terapeutických pulzů jsou dva. Je to dáno tím, že aby se mohla zapojit získaná imunita, je třeba myš nevakcinovat vlastním nádorem.“ Mohla byste toto tvrzení vysvětlit?

V Českých Budějovicích dne 15. 5. 2018

Mgr. Adéla Chlastáková

Chlastakova