



**Oponentský posudek na diplomovou práci Lucie Paďoukové s názvem: Nádorová imunoterapie založená na synergii agonistů TLR a ligandů stimulujících fagocytózu. Posouzení spoluúčasti získané imunity.**

Tato diplomová práce je součástí dlouhodobě řešeného projektu, který se zaměřuje na optimalizaci imunoterapie nádorů a pochopení mechanismů uplatňujících se v terapeutických procesech. Téma imunoterapie nádorů je vysoce aktuální a atraktivní a tato práce, vypracovaná pod vedením Dr. Ženku, přinesla několik zajímavých výsledků. Použitím dvou typů nádorových buněk, melanomu a adenokarcinomu, autorka testovala nové kombinace terapeutické směsi. Konkrétně byl testován vliv systémového podání terapeutické směsi, účinek beta-glukanů, anti PD-1 i agonistů CD40. Účast adaptivní imunity autorka vyhodnocovala na základě produkce interferonu gama anti-nádorovými specifickými lymfocyty a retransplantace nádorových buněk do vyléčených myší.

Práce čítá 64 stran, je standardně členěná na úvod, literární přehled, cíle práce, výsledky a diskusi. Dosažené výsledky jsou shrnuty v závěru a nechybí ani seznam zkratk či literatury, ze které autorka čerpala informace. Práce je psána srozumitelně, stylisticky na velmi dobré úrovni s minimálním počtem překlepů.

V úvodu se autorka zabývá teoretickou částí problematiky a podává literární rešerši v rozsahu 20 stran. Zhruba polovina je věnována nádorovým onemocněním, včetně klasifikace, genetiky, či samotného procesu karcinogenezy. Druhá polovina této části práce je věnována imunitnímu systému, jeho základnímu rozdělení a složkám, které se uplatňují i v protinádorové imunitě. Obsahově je tato část zpracována dostatečně. Vyskytuje se tady pár nepřesností a nesprávných tvrzení, či nevhodně použité terminologie (např. Poly (I:C) není analog TLR-3 ale agonist; tvrzení, že TLR9 je jediný TLR receptor lokalizovaný na endozome není správné; obrázek dva označuje spíš schéma terapeutické směsi než strukturu). Po formální stránce je tato část zbytečně fragmentovaná. Přílišné členění textu na několik podkapitol ubírá na přehlednosti a kvalitě spíš snižuje. Na str. 9 je např. 5 podkapitol, které jsou pak tvořeny někdy jenom dvěma větami. Podkapitol, označených 5 či 6 číslicemi (např. 2.2.1.1.1.3.) je v práci mnoho (21) a proto doporučuji raději členění do paragrafů.

Cíle jsou definovány srozumitelně no poněkud obecně.

Metodická část je zpracována čitelně a vcelku jasně. Každý *in vivo* experiment je podrobně popsán. Vzhledem k stejnému charakteru pokusů by bylo postačující popsat dizajn experimentu jednou a pak použité variace doplnit do tabulky.

Kapitola výsledky je obsažena na 15 stranách a čítá 17 grafů. Výsledky jsou prezentovány srozumitelnou formou, popisky ke grafům jsou jasná a jednotlivé skupiny v experimentech jsou dobře rozeznatelná.

Část diskuse má rozsah 5 stran. Autorka tady nabízí možné vysvětlení získaných negativních i pozitivních výsledků. Líbí se mi, jak autorka analyzuje a snaží se vysvětlit, co která složka terapeutické směsi může v imunologickém proti-nádorovém ataku dělat. Tuto část práce považuji za nejlepší.

Závěrem autorka výstižně shrnuje dosažené výsledky v sedmi bodech.



Otázky a připomínky:

- Chybí vysvětlení zkratky p.os. Chybí informace o zdroji anti IFN- $\gamma$  protilátky, není uvedeno, jakým chromoforem byla protilátka konjugována.
- Str. 28, z metodického popisu usuzuji, že byl R-484 rozpuštěn v 1,4  $\mu$ l 3.5% HCl? Opravdu tomu tak bylo?
- Prosím vysvětlíte, co znamená Fox3=Fixation/permeabilization working solution. U tohoto materiálu chybí informace o výrobcí/zdroji (str. 22).
- Str. 32, proč a jakým způsobem byly koncentrace IFN- $\gamma$  měřeny Elisou ze slezinových buněk přepočteny na mm<sup>3</sup> nádoru? Jaká je citlivost použitého ELISA kitu? Na str. uvádíte citlivost v pg/mm<sup>3</sup>. Dle tabulky IX, kde je uvedena koncentrace IFN- $\gamma$  standardů v destičce, má nejřednější vzorek koncentraci 0,63 pg/ml. Prosím o vysvětlení. Na str. 30 taky uvádíte, že řada standardů byla připravena desítkovým ředěním, dle tabulky IX jde o dvojkové ředění.
- Molekulu CD-40L ste v úvodu zařadila k cytokínům. Můžete doplnit pár základních faktů?
- Jaká byla strategie „gatování“ v experimentu prezentovaném na obrázku 12 a 13? Bylo možné dobře oddělit buňky produkující IFN-  $\gamma$  od neprodukcujících? Je vhodné uvést příklad histogramu nebo dot plotu z FACS analýzy.
- Jak si vysvětlujete rozdíl v produkci IFN naměřeného intracelulárně a extracelulárně v čase 23 dní od zahájení terapie?
- Byly obecně transplantace adenokarcinomu stejně úspěšné jako transplantace melanomu? Z Vašich grafů je patrné, že rychlost růstu transplantovaných melanomů byla rychlejší, než adenokarcinomů. Máte nějaké vysvětlení? Byla proliferace melanomových buněk v porovnání s buňkami adenokarcinomu taky jiná *in vitro*?
- Zaujalo mě, jak diskutujete různý podíl získané imunity v terapii vůči melanomu a adenokarcinomu. Byl podobný fenomén již někdy pozorován nebo popsán?

Na závěr konstatuji, že diplomová práce Lucie Paďoukové splňuje všechny požadavky kladené na diplomovou práci na Přírodovědecké fakultě Jihočeské univerzity a proto ji doporučuji k obhajobě.

V Českých Budějovicích dne 16. 5. 2018

Mgr. Jaroslava Lieskovská, PhD.

**Oponentský posudek na diplomovou práci Bc. Lucie Padoukové “Nadorova imunoterapie založená na synergii agonistu stimulujících fagocytozu. Posouzení spoluúčasti získané imunity.”**

Diplomová práce Bc. Lucie Padoukové s názvem “Nadorova imunoterapie založená na synergii agonistu TLR a ligandu stimulujících fagocytozu. Posouzení spoluúčasti získané imunity.” je jednou ze série prací z laboratoru Dr. Zenky zaměřené na nalezení efektivní léčby nádorových onemocnění. Předložená práce se konkrétně snaží zaměřit na zefektivnění již testované terapeutické směsi Manan-BAM + TLR agonisté (R-848, poly (I:C), LTA) pomocí kombinace s BAM kontrovným Fc-fragmentem, CpG nebo per orálně aplikovaným beta glukánem. Autorka zároveň testuje aplikaci této terapeutické směsi na novém nádorovém modelu- pankreatickém adenokarcinomu (předtím byla terapie testována jen u myšiho modelu melanomu). Zajímavé jsou experimenty, ve kterých kombinuje základní terapeutickou směs s checkpoint inhibitorem anti PD-1 a imunitním aktivátorem anti CD40. Součástí diplomové práce je také stanovení IFN-gamma dvěma různými metodami, Flow cytometry (intracelulární stanovení) a ELISA (extracelulární stanovení).

Diplomová práce má klasické členění zahrnující úvod, přehled literatury, cíle práce, materiál a metody, diskuzi, zaver, seznam použitých zkratk a literaturu. Celá práce je psána velmi dobrou cestinou s minimem překlepu (příklady: v množství v koncentraci str. 28, dekována místo detekována hladina IFN-gamma str. 41), po formální stránce zde není téměř co vytknout. Jen bych upozornila na několik drobností, kterým by se autorka měla v budoucnu vyvarovat. (1) Věta by neměla začínat číslicí ale slovem (str. 25, str. 26, str. 29). (2) Autorka by se měla vyvarovat použití výrazu, které se nehodí do vědecké práce - slabších výsledku (str. 37), povšimnout grafu (str. 42).

**Nápis** je složen ze dvou vět. Lepší by dle mého názoru působil nápis jen o jedné větě.

**Úvod** o vhodné délce je hlavně zaměřen na statisticky vycet informace o nádorových onemocněních. Do budoucna bych spíše doporučovala zaměřit úvod více k dané problematice – v tomto případě na použitou imunoterapii.

**Přehled literatury** je psán na 19. stránkách. Uspořádání a rozsah této části doklady velmi dobrou orientací autorky v dané problematice a schopnost autorky pracovat s literárními zdroji. Velmi oceňuji, že většina citací je aktuálních z posledních let. Některé části jsou možná trochu více podrobné než je nezbytné (str. 4 Pagetova “Soil and seed” hypotéza). Přehled literatury by mohl být více kompaktní kdyby některé části byly redukovány. V Přehledu literatury bych upozornila na některé nesrovnalosti. Na str. 2 bych nepoužívala monoklonální ve spojení s nádory. Str. 7 při zmínce o rychle se rozvíjejícím odvětví onkogenetiky bych si představovala nějakou aktuálnější citaci. Str. 19 Název kapitoly “Nadorova imunoterapie týmu Dr. Zenka” by bylo vhodné nahradit jiným názvem. Na str. 11 bych zmínila myši tlr, protože je práce dělana na myším modelu, kde je situace s tlr trochu odlišná. Velmi chválím snahu autorky vytvořit obrázek

na str. 20. Z tohoto obrazku vsak nezainteresovany clovek pochopi, ze vsechny slozky terapie jsou vazany na nadorovou bunku, cemuz tak ve skutečnosti není.

**Cile práce** jsou jasné a srozumitelně definovány.

**Material a metody.** V části material metody bych jen chtěla upozornit na několik nepřesností: (1) autorka zde uvádí mannan se dvěma n ale v následujícím i předcházejícím textu používá jen jedno n – toto slovo by mělo být použito v jednotném formátu v celé práci. (2) Foxp3 není zkratkou pro Fixation/Permeabilization working solution, ale jedná se o protein z FOX rodiny. (3) V části “Příprava nádorových buněk pro transplantaci” bych nenazývala suspenzi nádorových buněk jako roztok. (4) Z textu také vyplývá, že pro úpravu koncentrace jak B16-F10 buněk tak i Panc02 buněk bylo použito medium RPMI (“4.4. Příprava nádorových buněk pro transplantaci”) ale v předchozí kapitole “4.3. Buněčné linie” je pro kultivaci Panc02 použito DMEM medium.

**Výsledky** jsou rozděleny na podkapitoly týkající se jednotlivých experimentů. V prvním experimentu (“5.1.”) autorka chybně uvádí v textu, že červená křivka reflektuje podávání terapeutické směsi i.p. a p.o.s. Stejně tak v nadpisu je uvedeno, že se jedná o perorální aplikaci. Avšak ve předcházejícím textu (material a metody, obsah) a také v grafu je zmínována pouze i.p. a i.t. aplikace směsi. Tato část je proto matoucí. Dale v textu u odkazu na obr. 8 autorka popisuje redukci nádorového růstu, přitom na obr. 8 je křivka přežití. U obr. 12 a obr. 13 bych ocenila odrazy na ose x pro jednotlivé dny detekce pro lepší orientaci. Na str. 48 autorka zmiňuje, že nádory myši neinfikovaly a nedošlo k uchycení nádoru. Slovo neinfikovaly by bylo vhodné nahradit jiným výrazem, tento výraz je spíše používán ve spojitosti s infekčními onemocněními. Autorka sjednotila všechny barvy léčených skupin v grafech v rámci jednoho experimentu ale pro zlepšení celkové orientace bych přistě doporučila také sjednotit barvy pro všechny experimenty (tzn. kontrola PBS bude ve všech experimentech jednotnou barvou).

V **Diskuzi** se autorka snaží obhájit své výsledky a dává je do spojitosti s výsledky ostatních publikovaných prací. Pro potvrzení některých teorií, které autorka navrhuje by bylo užitečné zahrnout další experimenty. Pro diskuzi o CpG by bylo užitečné testovat IL12 v průběhu terapie nádoru (srovnání CpG terapie s komplexní terapií). U diskuze, kde autorka poukazuje na silnější zapojení specifické imunity u eradikace pankreatického karcinomu by bylo dobré udelat porovnání nádorové lymfocytární infiltrace v průběhu terapie u B16-F10 a Panc02. Na str. 52 autorka uvádí, že přítomnost IFN-gamma 15. a 23. den terapie je důkazem zapojení specifické imunity. Toto tvrzení je až moc silné, když bereme v úvahu, že nebylo dosaženo statisticky signifikantního rozdílu mezi kontrolní a léčenou skupinou. Má autorka nějaká data dokazující sníženou expresi PD-1 u myšiho Panc02? Pokud toto tvrzení není podloženo z literatury, doporučovala bych podložit toto tvrzení experimentem (immunohistochemické stanovení...). Celkově je diskuze velmi pěkně zpracována jen bych ocenila zakončení diskuze nastíněním budoucích kroků a plánu skupiny Dr. Zenky a jak výsledky z této práce podporily a nasmerovaly tyto budoucí plány.

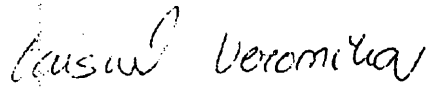
**Závěr** je prezentován v bodech jasné a srozumitelně. Reflektuje navržené cíle práce.

Na autorku mam nasledujici dotazy:

1. Muze autorka vysvetlit, proc jsou nektare *in vivo* experimenty ukoncovany v den 100 a jine v den 110? Proc neni u vsech experimentu jednotne ukonceji v den 100 v krivce preziti?
2. Muze autorka upresnit zda mysi, ktere byly usmrceeny v experimentech obr. 4, obr 8, obr. 10 a obr. 17 (100. nebo 110. den experimentu) mely meritelny nador nebo se u nekterych jedincu podarilo plne nador eliminovat?
3. Uvazuje autorka o mereni hladiny IL-12 v prubehu terapie, ktere je zminovano v diskuzi?
4. Bylo uchyceni a rust B16-F10 nadoru rychlejsi v pripade retransplantace v nadorovych bunek v experimentu "5.8." nebo byl pozorovan stejny prubeh rustu jako pri klasicke transplantaci?
5. Byly pozorovany nejake systemove priznaky (unava, letargie, snizovani hmotnosti) u jedincu po systemove (i.p) aplikaci terapeutické latky v experimentu "5.1."?

Celkove bych diplomovou praci Bc. Lucie Padokouve hodnotila jako velmi zdarilou. Pocet experimentu zahrnutych v teto praci a obsahlost teto prace ukazuje na fakt, ze autorka venovala tomuto projektu hodne casu a pile. Autorka prokazala schopnost samostatne experimentalni prace, interpretace dosazenych vysledku, kritickeho mysleni a velmi dobrou schopnost prace se zahraničnimi literarnimi zdroji. Vyse uvedene pripominky by mela autorka brat spise jako rady do budoucna a ne jako snahu o kritiku predlozene prace. Tato diplomova prace splnuje vsechny pozadavky Prirodovedecke fakulty Jihoceske university na odevzdane diplomove prace. Proto jednoznacne **doporučuji** diplomovou praci Lucie Padoukové k obhajobe.

V Bethesda 9. Kvetna 2018

  
Veronika Caisova, Ph.D.