

Přírodovědecká fakulta
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Branišovská 31, 37005 České Budějovice

Tomáš Doležal, Ph.D. – Katedra molekulární biologie a genetiky
Tel: 387772229, E-mail: tomas.dolezal@prf.jcu.cz

Oponentský posudek na diplomovou práci Bc. Karolíny Kvardové – Nádorová imunoterapie a možnosti zesílení jejího účinku

Diplomovou práci Karolíny Kvardové ze skupiny Dr. Jana Ženky jsem si s velkým zájmem přečetl, jedná se o velmi atraktivní a zároveň poměrně obtížné téma. S předstihem mohu konstatovat, že se ho Karolína zhostila statečně a vypracovala na jeho základě kvalitní diplomovou práci.

Po formální stránce je práce v pořádku, přehledná, s malým množstvím chyb, má veškerá náležitosti. Jedná se spíše o rozsáhlejší dílo o 86 stranách, s minimálně 150 citacemi.

Úvod je rozsáhlý, čtivý a ve svém celku čtenáře uvede do studované problematiky. Vytkl bych pouze to, že mohl být rovnou více zaměřen na studovanou problematiku, Karolína zbytečně uvádí příliš obecné pasáže, připomínající spíše učebnici imunologie, kdy ale stejně nemůže jít do dostatečné hloubky. Doporučil bych vystavět strukturu úvodu více konkrétně kolem nádorové imunoterapie a vysvětloval bych s tím související imunologii a používané přístupy v této souvislosti, nádorová terapie měla být od začátku vodící linka.

Popis materiálu a metod je dle mého dostatečně detailní, aby umožnil přesné zopakování experimentů. Výsledky jsou přehledné a celkem dobře zdokumentované, ale uvítal bych detailnější popisky obrázků, které by umožnily čtenáři obrázku samostatně porozumět, Karolína se vlastně omezila pouze na název a zbytek nechává na textové části výsledků. Forma grafů také má spíše tendenci schovat skutečná data, počty opakování, skutečnou variabilitu výsledků. Statistika je sice všude použita, ale pouze hvězdičkou, která ukazuje signifikantní výsledek. Čtenář tak nemá šanci sám posoudit, jak moc robustní výsledky jsou, a je odkázán na interpretaci autorky. Pochopil jsem, že grafy reprezentují pouze 6 biologických replikátů a je to v pořádku, chápu limitace studentských prací zvláště s myším modelem, o to více bych ocenil poodkrytí skutečných hrubých dat. Například obr. 5 klidně mohl být prezentován bodovým grafem (scatter plot) s bodem pro každé jednotlivé měření, obr. 3 ukazuje stejná data přehledně; stejně tak obr. 14 atd. Toto je ovšem většinová praxe, a to i v publikacích, těžko tedy vytýkat pouze Karolíně.

Diskuze je na dobré úrovni, není zbytečně rozsáhlá, věcným způsobem posuzuje dosažené výsledky. Karolína pravděpodobně nemá možnost srovnat své výsledky s jinými pracemi, které by se dostatečně podobaly svým zaměřením práci Karolíny, přesto bych ocenil pokus o zasazení dosažených výsledků do nějakého širšího kontextu nádorové imunoterapie a jiných známých efektů studovaných molekul, například adenosinu, diskuze je hodně omezena na posouzení vlastních výsledků.

Konkrétní poznámky a otázky:

1. V úvodu autorka píše: „Může za to **především obrovská snaha** nádorových buněk skrýt se mechanismům imunitního systému a uniknout své eliminaci“ nebo „Tyto mechanismy nejsou zdaleka konečným výčtem **geniálních schopností** nádorových buněk předčit imunitní systém.“ Z těchto vět mám pocit, že autorka vidí v organismu jakési agresivní zárodky, které se za každou cenu snaží najít mechanismy, jak obejít imunitní systém a vytvořit nádor. Vidí to Karolína skutečně tak?
2. Práce je postavena na dvou nádorových modelech, ale autorka prakticky vůbec nepopsala patogenezi těchto dvou modelů. Ten popis je celkem zásadní při vyhodnocování efektivity terapie. Čím trpí a na co případně umírají myši zasažené použitými nádory? V diskuzi autorka například píše: „Na modelu myšího melanomu B16-F10 tato terapeutická směs dosahuje 83% vyléčení všech myší.“ Tento model Karolína prezentuje také na obr. 6. Jaké tam vlastně bylo dosaženo procento vyléčených myší? Které myši by byly považovány za vyléčené v tomto grafu, zvláště v kombinaci s obr. 3, kde nádor i u myší s terapeutickou směsí ve 30. dnu stále roste?
3. Nepopsaná patogeneze by mohla být též zajímavá ve výsledcích s gemcitabinem. Samotný gemcitabin zhoršuje přežívání myší (proč?), ale spolu s terapeutickou směsí snižuje růst nádoru oproti samotné terapeutické směsi (byly statisticky porovnány mezi sebou také žlutý a zelený sloupeček v obr. 5?). Nicméně celkové přežití to dále nevylepší. Samotný gemcitabin je pohroma, ale s terapeutickou směsí potlačuje růst nádoru, ač nevylepší přežití. To by mohlo souviset s patogenezí a různými účinky na nádor a na fyziologii organismu, například mimonádorovou imunitu? Z toho by se dalo poučit a dále pracovat na optimalizaci terapie.
4. Vazba ADA s BAM neměla vliv na aktivitu ADA. Testovala autorka nějak, že skutečně došlo k navázání BAM na ADA? Je možné, že k vazbě nedošlo (případně jen málo) a že při analýze aktivity ADA byla stanovena aktivita volného enzymu? Mohlo by to případně vysvětlovat, že nebyl detekován efekt ADA-BAM při terapii?
5. Obr. 17. Je skutečně možné porovnat vliv ADA-BAM (žlutě) na růst nádoru, když samotná terapeutická směs (zeleně) v tomto případě prakticky potlačuje růst nádoru a tudíž není moc prostoru pro zlepšení, na rozdíl od experimentu na obr. 20?
6. Karolína se ve své práci významně soustředí na adenosin, zejména na jeho extracelulární formu a signální úlohy. V práci ovšem stanovuje celkový adenosin, včetně intracelulárního, z nádorové masy. Nemůže toto představovat problém a vysvětlení, proč nevidí změny v celkovém množství adenosinu po přidání ADA-BAM?
7. Zajímavý je poměrně zřetelný efekt ADA-BAM+PNP-BAM na růst nádoru na obr. 20/22, ale přitom kratší doba přežívání myší na obr. 23 (žlutá vs. zelená, až na jednu přeživší myš). Má autorka nějaké vysvětlení? Opět zde narážím na patogenezi, kdy růst nádoru zřejmě není jediným ukazatelem, co se v postiženém organismu děje.

Jak jsem již uvedl na začátku posudku, přes uvedené poznámky a kritiky považuji práci Karolíny Kvardové za kvalitní, oceňuji náročnost jejího projektu a celkově velmi slušné zpracování psané práce. V každém případě doporučuji práci k obhajobě s předběžným hodnocením výborně až velmi dobře a finálním doporučením hodnocení na základě obhajoby a reakcí na otázky.

V Českých Budějovicích dne 14. 5. 2018



doc. Mgr. Tomáš Doležal, Ph.D.

Posudek na diplomovou práci Bc. Karolíny Kvardové

„Nádorová imunoterapie a možnosti zesílení jejího účinku“

Diplomová práce vychází z „dílny“ Jana Ženky, který se již řadu let věnuje imunoterapii nádorů. Dlouhodobě se snaží vylepšit terapii založenou na intratumorálním kotvení ligandů fagocytárních receptorů a zvýšení přílivu zánětlivých buněk do nádoru pomocí agonistů Toll-like receptorů.

Karolína se ve své práci pokusila ovlivnit obranné mechanismy nádoru potlačující protinádorovou imunitu. Konkrétně šlo o potlačení MDSC (myeloid-derived suppressor cells) cytostatikem gemcitabinem nebo odbourání imunosupresivně působícího adenosinu adenosin deaminázou a vznikajícího inosinu purinnukleosid fosforylázou. Vzhledem k použití vysoce denzního pankreatického adenokarcinomu jako dalšího nádorového modelu, testovala Karolína možnost nahrazení vysokomolekulárních ligandů fagocytárních receptorů látkami s nižší molekulovou hmotností.

Diplomová práce je klasicky členěna na literární úvod, cíle, materiál a metody, výsledky, diskusi a závěr. Přehled literatury se na dvaceti stranách zabývá vznikem a vývojem nádorů, jejich klasifikací a konkrétně nádorovými liniemi použitými v experimentech. Další kapitola je věnována interakci nádorů s imunitním systémem. Poslední část přehledu se věnuje nádorové imunoterapii.

Materiál a použité metody jsou podrobně popsány, autorka uvádí, že hladiny adenosinu, inosinu a hypoxantinu v nádorech byly stanoveny ing. Davidem Kahounem, Ph.D. Nicméně postup přípravy vzorků pro LC-MS/MS je podrobně popsán stejně jako stanovení aktivity adenosin deaminázy. V kapitole Experimentální část jsou podrobně popsány jednotlivé pokusy včetně užití gemcitabinu, zkoumání vlivu vazby kotvy BAM na aktivitu adenosin deaminázy a purinnukleosid fosforylázy a zejména použití kotvených enzymů v kombinaci s užívanou terapeutickou směsí. Nakonec je popsán pokus nahrazení mananu v terapeutické směsi ligandami s nižší molekulovou hmotností.

Kapitola Výsledky podrobně popisuje efekty terapeutických směsí hodnocené podle objemu nádoru, přežívání myši eventuálně výskytu metastáz. Autorka se též zabývala hodnocením vlivu vazby kotvy BAM na aktivitu použitých enzymů. Zatím co aktivita adenosin deaminázy nebyla ovlivněna, aktivita purinnukleosid fosforylázy byla vazbou BAM výrazně snížena. Doplnění terapeutické směsi o oba kotvené enzymy nevedlo k větší redukci nádorů, došlo k poněkud vyššímu přežití léčených myši. Nahrazení mananu ligandami s nižší molekulovou hmotností mělo horší efekt na přežití myši ve srovnání s původní terapeutickou směsí.

Sedmistránková diskuse podrobně hodnotí získané výsledky ve srovnání s dostupnou literaturou. Pokouší se o vysvětlení neúspěchu ve snaze zvýšit účinnost nádorové imunoterapie potlačením některých obranných mechanismů nádoru. Oponent souhlasí s názorem, že obrana nádorů před imunitním atakem je velmi komplexní a zřejmě i redundantní a vyřazení jedné její složky se nemusí projevit na protinádorovém účinku terapeutické směsi.

Připomínky a dotazy:

Str. 7, CD4+ lymfocyty: CTL jsou schopny detekce antigenu ve spojení s *MHC I molekulami*

Str. 7 dole: Maturace B lymfocytů neprobíhá po kontaktu s antigenem v sekundárních lymfatických orgánech. Do těchto orgánů přicházejí již maturované (zralé) B lymfocyty.

Str. 26 nahoře: proč jsou myši C57BL/6N označeny jako wild-type?

Str. 33 rovnice: místo uric acid má být *uric acid*

Str. 67: D-MEM je pojmenováno podle pana Dulbecca, takže se píše s *D*

Dotazy:

Je efekt gemcitabinu na MDSC specifický? Pokud ano, proč?

Když proces degradace inosinu probíhá intracelulárně, jak se na něm může podílet purinnukleosid fosforyláza, ukotvená na povrchu nádorových buněk?

Jaké jsou další možnosti zvýšení účinnosti terapeutické směsi používané v laboratoři dr. Ženky?

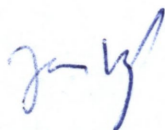
Závěr:

Diplomová práce Karolíny Kvardové je příkladem práce s negativními výsledky. Zdálo by se, že naplňuje Cimrmanovská kritéria „slepých uliček“ ukazujíc „kudy cesta nevede“. Ale podle názoru oponenta tomu tak není. Karolína pouze ukázala, že konkrétní doplnění terapie o složky potlačující obranné mechanismy nádoru nevede ke zlepšení její účinnosti. To však neznamená, že terapie nádorů založená na potlačení obranyschopnosti nádoru nemůže být úspěšná, nebo že by se neměla studovat.

Karolína vypracovala kvalitní, experimentálně náročnou práci a dosáhla některých cenných dílčích výsledků. Na příklad zhodnotila vliv kotvení vybraných enzymů na jejich aktivitu. Práci uzavřela fundovanou diskusí získaných výsledků.

Proto diplomovou práci Karolíny Kvardové doporučuji k obhajobě a hodnotím ji jako *výbornou*.

V Českých Budějovicích 4. 5. 2018



Prof. RNDr. Jan Kopecký, CSc.