

Expres markerů imunogenní buněčné smrti na buňkách karcinomu plic

Předložená diplomová práce se zabývá velice aktuálním tématem na pomezí základního výzkumu a biomedicínských aplikací. Léčba nádorových onemocnění prožívá v poslední dekádě velký metodický posun směrem k biologické léčbě, jmenovitě k imunomodulaci s cílem využít potenciálu imunitního systému specificky rozpoznat nádorové buňky a eradikovat je. Školitel se dlouhou dobu této problematice věnuje a významným způsobem přispěl ke vzniku nového terapeutického přístupu kombinujícího personalizovaný přístup využívající autologní antigen-presentující buňky pacienta schopné prezentovat nádorové antigeny a aktivovat imunitní odpověď specifickou proti příslušnému nádoru. Je jasné, že podobný typ terapie před klinickým testováním vyžaduje obrovské množství přípravné experimentální práce, testování všemožných proměnných, s cílem odhalit optimální uspořádání studovaného systému vykazující co nejpotentnější a nejspecifičtější imunomodulační účinky. Přesně to je cílem předložené práce – optimalizovat výše popsaný přístup pro budoucí terapii plicních karcinomů, pole zcela neorané, kde všechny provedené experimenty přinášejí nové poznatky, zvláště v kontextu s indukci imunogenní buněčné smrti pomocí vysokého hydrostatického tlaku.

V *literárním přehledu* autorka shrnuje relevantní problematiku s důrazem na karcinomy plic, typy nádorových antigenů, imunogenní buněčné smrti a obecně imunomodulacemi v kontextu protinádorové odpovědi a podílu dendritických buněk. Vzhledem k obrovskému rozsahu literatury o protinádorových imunitních reakcích se autorka zmiňuje o nejdůležitějších faktech a zaostřuje je na řešenou problematiku. Rozsah této části diplomové práce je přiměřený pro uvedení do problematiky, obsahuje ty nejnovější popř. nejvýznamnější relevantní práce. *Na str. 14 autorka popisuje fenomén editace nádoru imunitním systémem. Jaká proporce vzniknuvších malignit je dle vašeho názoru terminována hned v počátečním stádiu? Na stranách 15-21 autorka popisuje relevantní DAMPs, vesměs intracelulárně lokalizované molekuly, které se při tzv. imunogenní buněčné smrti objevují na buněčném povrchu. Jaký je molekulární mechanismus této translokace?*

Kapitola *materiál a metody* je přehledně zpracovaná, obsahuje všechny důležité informace a umožňuje reprodukování a pochopení experimentů. Metodický rozsah, který si během své práce Linda Kobosilová osvojila je dostatečný pro vytvoření kvalitní diplomové práce (průtoková cytometrie, fluorescenční mikroskopie, proteinová biochemie). *Nejasnost jsem měl u na str. 44, kde je kapitola 4.1.4 pojmenována „Protilátky“ přičemž výčet reagentů neodpovídá této kategorii. Dále bych se chtěl zeptat na teplotu „chladného RIPA lyzačního pufru“ na str. 46. V metodice je zmiňováno, že preparáty pro mikroskopii byly před uzavíráním do montovacího média vysušeny. Má zkušenost je, že zaschnutí zvyšuje autofluorescenci preparátů a navíc dochází ke vzniku krystalů solí přítomných v PBS a poškození (i permeabilizaci buněk). Nesetkali jste se s něčím podobným?*

Výsledky jsou souhrnem logicky uspořádaných experimentálních dat. Autorka studuje aktivaci apoptózy biochemickým přístupem, charakterizuje typ buněčné smrti způsobené vysokým hydrostatickým tlakem (HHP), kvantifikuje expresi imunogenních molekul na povrchu nádorových buněk po ovlivnění HHP (mikroskopie a cytometrie), stanovuje množství extracelulárního ATP, stanovuje maturační molekuly na povrchu dendritických buněk pulsovaných nádorovými buňkami, fagocytickou účinnost, kvantifikuje populaci regulačních T-lymfocytů indukovanou dendritickými buňkami pulsovanými nádorovými buňkami usmrcenými HHP a nakonec studuje přežívání nádorových buněk ovlivněných HHP pomocí klonogenních esejů. *Vysoký hydrostatický tlak jako stimulant imunogenní buněčné smrti je zajímavý fenomén, jaké je vaše vysvětlení pro mechanismus jeho působení na buňky? U obr. 5.2.B mi není jasné, zda byl studován povrchový signál nebo celkový včetně intracelulárního. Vzhledem k tomu, že byl pro vizualizaci použit konfokální mikroskop, zdá se podle vzoru značení, že se jedná o permeabilizované buňky. Na straně 60 zmiňujete apikální lokalizaci signálu, značené buňky ale nevytvářejí souvislý epitel, v němž by se mohly polarizovat. Je to tak, že studované buněčné linie vytvářejí apikálně/bazolaterální polarizované uspořádání membránových domén již v jednobuněčném uspořádání? Na straně 67 jsou popsány experimenty kvantifikující fagocytózu ovlivněných nádorových buněk. Zajímalo by mne, co přesně znamenají uvedená procenta (% fagocytózy na obr. 5.5.A) a proč jste prováděli fagocytický test při 4°C, kde je zřejmé, že fagocytická aktivita bude velice nízká.*

Po formální stránce je práce zpracovaná s minimálním množstvím překlepů, na můj vkus někde čárky přebývají a někde se nedostávají, *in vitro* by mělo být psáno kurzivou (str. 50), obrázky by měly být popsány na stejné stránce (zde by mne zajímal popis obr. na straně 71 – „Chyba! Nenalezen zdroj odkazů“), DC jako rodu ženského (a zde asi i paradoxně neživotného) by asi měly být spojeny v přísudku s ypsilonem (podobně jako je správně uvedeno pro lymfocyty na straně 70), anglické slovo buffer bych osobně neskloňoval a nahradil českým ekvivalentem (str. 47).

Přes drobné formální nedostatky hodnotím předloženou diplomovou práci jako kvalitní, zajímavou a hodnotnou, zvláště v kontextu důležitosti studované problematiky. Doporučuji hodnotící komisi kladné hodnocení. Osobně přeji autorce mnoho úspěchů ve vědecké kariéře.