

Oponentský posudek na diplomovou práci

Název práce: Inhibitory NK cell receptors and possibilities of manipulation of cytotoxic properties
Jméno autora(ky): Bc. Veronika Švubová
Oponent Doc. RNDr. Magdaléna Krulová Ph.D.

Předložená diplomová práce Bc. Veroniky Švubové se zabývá studiem NK buněk jako potencionálního terapeutického nástroje pro léčbu akutní myeloidní leukemie, se zaměřením na vliv imunosupresivního cytokinu TGF β na NK buňky a možnost potlačení působení TGF β prostřednictvím specifických inhibitorů. Toto téma je jistě klinicky relevantní, a má značný potenciál pro klinické využití.

Práce je psaná anglicky a je klasicky členěná. V úvodní části autorka shrnuje současné znalosti o akutní myeloidní leukémii, výhodám terapeutického přístupu pomocí NK buněk, imunitnímu a cytokinovému prostředí niky kostní dřeně, a vlivu TGF β na NK buňky. Tato kapitola, stejně jako celá práce je úsporná, zaměřuje se velmi specificky na fakta spojená s cílem diplomové práce a přesto, že bych místy uvítala rozšíření informací, vše podstatné je v úvodní kapitole zahrnuto a považuji ji za zdařilou. Drobná výtka se týká kreditování obrázků. Pokud je autorka vytvořila sama, mělo by to být z popisu obrázků jasné, a pokud je vytvořila pomocí nástroje BioRender, mělo by to být uvedeno.

V části Materiál a metody jsou popsány metodické přístupy využívané v diplomové práci. Jednotlivé metody jsou popsány v zásadě dobře, ovšem opakovat pokusy podle popsáných metodických přístupů by bylo obtížné, protože občas chybí důležité údaje. Některé je možné pochopit v po přečtení části výsledků, některé zůstávají nejasné. Například v kapitole 2.1.2. je popsána kultivace NK buněk, v tabulce 1 je přesně uveden objem média které bylo odebráno, objem média s cytokiny přidaného ke kulturám, ale není uvedeno po kolika dnech byla pasáž prováděna. Úplně nejasná mi byla kapitola 2.1.3, která popisuje ovlivnění buněk TGF β a inhibitory, kde jsou pouze specifikace a použité koncentrace uvedených látek, ale vůbec zde nevyplývá jak často a po jak dlouhou dobu jsou buňky ovlivňovány. Navíc je uvedeno, že

kultivace probíhala ve 24 jamkových destičkách, ale pokud jsem správně metodický přístup pochopila, byl TGF β přidáván již v průběhu kultivace (tedy pro lepší orientaci lehce zmateného čtenáře by toto mělo být uvedeno i v kapitole 2.1.2), ale ta probíhala v 6 jamkových destičkách? Navíc na straně 18 je uvedeno, že koncentrace TGF β byla 10 ng/ μ l ale na straně 23 autorka uvádí použitou koncentraci 2.5 ng/ml. V kapitole 2.3 je přesně popsáno množství NK buněk přidávaných do cytotoxické eseje, ale množství cílových buněk uvedeno není. Tyto údaje jsou nicméně přesně uvedeny u výsledků. Další metody jsou popsány důkladně.

V části Výsledky autorka dokumentuje získané výsledky. Pozitivně hodnotím logiku práce i zpracování dat. Z práce jasně vyplývá, že autorka zpracovala výsledky pečlivě a provedla některé náročné analýzy. Výsledky jsou pečlivě dokumentovány a popsány. Drobnou výtku mám k popisu obrázku 4, který je na jiné straně než obrázek, což je nepřehledné. Také chybí vysvětlení spodních grafů u obrázků 7, 9, 10, 11, 12. U obrázku 7 jsem strávila chvíli počítáním teček u spodního grafu, a hledání logiky v použité barevnosti, abych se ujistila, že se jedná o vyjádření stejných výsledků jako v horních grafech jen s důrazem na jednotlivé dárce. Autorka by opět čtenáři usnadnila čtení, kdyby toto vysvětlila v popisu grafu.

Kapitola Diskuse je velmi zdařilá. Získané výsledky jsou vhodně a pečlivě diskutovány, autorka se důkladně zamýšlí nad jednotlivými konsekvencemi vlivu TGF β na NK buňky v prostředí AML i v souvislosti s rozdíly mezi jednotlivými dárce a působení dalších vlivů, včetně virových infekcí, které mohou ovlivnit výsledky terapie pomocí NK buněk. Literární odkazy použité v diplomové práci jsou správně citovány.

V předložené diplomové práci Veronika Švubová prokázala znalost řady laboratorních metod, ale i řady dalších pokročilých technik. Získané výsledky jsou zajímavé a v kontextu světové literatury nebyly dosud popsány. Logika práce je jasná a dobře komentovaná, metodické přístupy jsou vhodně zvoleny a zdůvodněny. Autorka jasně prokázala schopnost získávat, interpretovat a diskutovat výsledky.

Výše uvedené připomínky významně nesnižují kvalitu diplomové práce, předloženou práci jednoznačně doporučuji k obhajobě.

Doplňující otázky:

1. Pro koncept terapie pomocí NK buněk je zásadní variabilita u jednotlivých dárců. Z obrázku 4c je možné usoudit, že fenotyp NK buněk po kultivaci je vcelku homogenní, je to vlivem kultivace? (Pozorovali jste, případně byla popsána variabilita ve fenotypu NK buněk u zdravých dárců)?
2. Studium vlivu TGF β in vitro je komplikováno přítomností tohoto cytokinu v séru. Brali jste tuto koncentraci v potaz pro stanovení optimální koncentrace použité v experimentech? Není to bazální koncentrace TGF β pozorovaná na obrázku 4d? Jak dlouhý je poločas rozpadu rekombinantního TGF β ? Je možné jej naměřit ještě 48 h po přidání do kultury (obr 4d)?
3. Kolik dárců bylo v práci využito? Není jasné, zda například výsledky zobrazené na obrázcích 11 a 12 jsou ze stejných nebo různých dárců.
4. Kontinuální kultivace NK buněk v přítomnosti silně aktivačních cytokinů může vést k metabolickému vyčerpání buněk (Felices et al. 2018). Jaké důsledky může tento jev mít ve vašich experimentech? Jsou navrženy alternativní přístupy kultivace NK buněk?
5. Jaký je fenotyp NK buněk u pacientů s AML? Jsou využívány terapeutické přístupy podporující specificky funkci NK buněk?
6. Jaké jsou obecné limity terapie pomocí NK buněk?

V Praze

dne 30.5.2023

.....
podpis oponenta