



CHARLES UNIVERSITY
Faculty of science

OPONENTSKÝ POSUDEK DIPLOMOVÉ PRÁCE

Název práce: Optimalizace CAR T lymfocytů pro imunoterapii hematologických malignit

Student: Bc. Martin Mucha

Vedoucí práce: MUDr. Pavel Otáhal, Ph.D.

Oponent: Mgr. Zdeněk Zadražil, Ph.D.

Diplomová práce Bc. Martina Muchy se zabývá tématem léčby hematologických malignit za pomoci T lymfocytů exprimujících chimerické antigenní receptory (CAR T). Ve své práci se student soustředí na přípravu CAR T buněk pomocí plasmidů, včetně konstrukce CAR T proti molekule CLL1 společně s genem pro IL-21, a následně se snaží ověřit jich funkčnost.

Studentův diplomový projekt je metodický, se širokým záběrem molekulárně biologických metod. Vybrané téma považuji za atraktivní zejména pro budoucí možné klinické aplikace v léčbě hematologických malignit.

Diplomová práce je klasicky dělena do úvodu, materiálů a metod, výsledků, diskuze a závěru, provedení některých kapitol ovšem nedosahuje předpokládané kvality.

Úvod

Tato kapitola je psána sice přehledně, avšak je velmi stručná, na 11 stranách, ocenil bych detailnější popis např. 3D struktury TCR, stručný přehled markerů na B buňkách, přehled regulačních principů imunitní odpovědi využívané nádorovými buňkami či přehled klinických studií léčby za pomoci CAR T buněk.

Např. popis molekuly CLL1, která je pro studentův výzkum stěžejní, zcela chybí. Proč je tato molekula důležitá pro imunoterapii? Stejně by byl dobrý alespoň nějaký popis funkcí IL-21. Celý kontext studentova výzkumu tak může být lépe pochopen.

Materiály a metody

Student popisuje širokou škálu metodik a ukazuje tak své schopnosti osvojení velkého spektra výzkumných metod. Samotná kapitola má 16 stran a je tak rozsáhlejší než úvod.

Výsledky

Problémem této části je hlavně opakování popisu metod. Student znovu detailně popisuje, jak bylo výsledků dosaženo. Narušuje to posloupnost celé části, a hlavně se tímto velká část kapitoly výsledky stává duplicitní. Přitom není u některých metodik jasně odůvodněno, proč je zvolen určitý protokol. Není například jasné, proč student vybral dny 16, 19 a 21 při opětovné stimulaci CAR T buněk leukemickými buňkami z pacientů s chronickou lymfocytární leukémií (CLL).

Diskuze

V kapitole diskuze student popisuje výsledky, tak, jak měly být popsány v kapitole předchozí. Znovu zde u některých výsledků opakuje metodiku. Částečně chybí diskutování pozorovaných výsledků.

Práce čítá 66 citací, včetně recentní literatury.

Hodnocení:

Student ve své práci jasně prokázal laboratorní schopnosti, kdy si osvojil širokou škálu metodik a dokázal naplnit cíle svého diplomového projektu. Student se zároveň během svých studií stal spoluautorem publikace, která vyšla v časopise *Cytotherapy*, což velmi oceňuji.

Diplomová práce je po formální stránce horší, chybí mi důkladný úvod, široká diskuze či jasný závěr, ve kterém student spíše shrnuje svou vědeckou cestu, nikoliv souhrn výsledků a co z nich vyplývá. Diplomová práce svou kvalitou zdaleka nekopíruje úsilí, které student při svém výzkumu vynaložil.

Závěrem, diplomovou práci Bc. Martina Muchy navrhuji k přijetí titulu Mgr.

Otázky

- 1) Proč používá student zrovna CAR T 2. generace?
- 2) Z jakých důvodů je CLL1 důležitá pro imunoterapii hematologických malignit?
- 3) Jaká je budoucí práce pocházející z výsledků studenta, které všechny kroky povedou k případné klinické aplikaci?
- 4) Při vnášení plasmidů pro CAR a EGFP, student pozoroval nízké procento CAR⁺EGFP⁺ buněk. Vysvětlení, že CAR⁻ buňky nebyly během kultivace, na rozdíl od CAR⁺, stimulovány B buňkami, student vyloučil. Jak si toto pozorování tedy student vysvětluje?
- 5) Student určoval cytotoxicitu připravených CAR T buněk proti CLL buňkám ze 2 pacientů. Lépe byly rozeznávány z pacienta B. Jak si toto pozorování student vysvětluje? Student také považuje 40% cytotoxicitu za velice dobrý výsledek. Jak toto student odůvodňuje?

..

V Praze 8.9.2021

Mgr. Zdeněk Zadražil, Ph.D.

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy