

## Posudek oponenta na diplomovou práci

oponentský posudek

Jméno posuzovatele: Milan Reiniš

Datum: 29.5.2013

Autor:

Barbora Dvořáková

Název práce:

Deplece  $T_{reg}$  buněk pro potenciaci nádorové léčby konjugáty léčiv vázaných na HPMA kopolymer

### Cíle práce

Práce byla zaměřena na možnosti eliminace  $T_{reg}$  buněk a využití této modality v kombinované chemoimunoterapii nádorů. Jednotlivými cíli bylo (i) ověřit možnost deplece  $T_{reg}$  buněk kombinací indukce jejich proliferace komplexu IL-2/protilátka a následné chemoterapie cytostatiky inhibujícími buněčný cyklus, (ii) ověření možnosti deplece  $T_{reg}$  buněk biotinylovanými protilátkami proti CD4 nebo CD25 s následnou eliminací cirkulujících protilátek pomocí avidinu navázaném na polymeru N-(2-hydroxypropyl)metakrylamidu (HPMA) a (iii) jako doplňující studie byla testována toxicita a protinádorový efekt vybraných HPMA kopolymerů s navázanými cytostatiky.

### Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému? ANO

Rozsah práce (počet stran): 91, 203 citací

Je uveden anglický abstrakt a klíčová slova, ANO

Je uveden seznam zkratk? ANO

### Literární přehled:

Odpovídá tématu? ANO

Je napsán srozumitelně? ANO

Použil(a) autor(ka) v rešerši relevantní údaje z literárních zdrojů? ANO

Jsou použité literární zdroje dostatečné a jsou v práci správně citovány? ANO

### Materiál a metody:

Odpovídají použité metody experimentální kapitole? ANO

Kolik metod bylo použito?

Základem práce byly experimenty *in vivo* na myších (aplikace imunokomplexů IL-2/protilátka, sledování toxicity vybraných kopolymerů HPMA s cytostatiky, deplece buněčných populací, chemoterapie nádorů EL4) a následné analýzy *in vitro* (příprava buněčných suspenzí, průtoková cytometrie v různém uspořádání, HABA esej, ELISA) V rámci diplomové práce byly použity adekvátní imunologické a biologické metody.

Jsou metody srozumitelně popsány? ANO

### Experimentální část:

Je vysvětlen cíl experimentů? ANO

Je dokumentace výsledků dostačující? ANO, s výjimkou chybějící statistické analýzy, zvláště růstových křivek v experimentech, kde bylo použito 8 myší na skupinu. U některých obrázků chybí úsečky SD, přestože jsou zmíněny v popisu (Fig. 5.13 a dále)

Postačuje množství experimentů k získání odpovědí na zadané otázky?

ANO

**Diskuze:**

Je opravdu diskuzí, nejde jen o konstatování vlastních výsledků? ANO

Jsou výsledky porovnávány s literaturou? ANO

Jsou uvedeny nějaké hypotézy či návrhy na další řešení problematiky? ANO

**Závěry (Souhrn) :**

Jsou výstižné? ANO

**Formální úroveň práce** (obrazová dokumentace, grafika, text, jazyková úroveň):

Práce je psaná anglicky, dobře se čte, text i obrazová dokumentace jsou velmi pečlivě zpracovány. Je v ní minimum chyb a nejasností (např. str. 12 místo „anti-tumor activity of tumor –associated macrophages“, asi má být „tumorigenic“; v Diskusi jsou zaváděny již zavedené zkratky). Místo výrazu „side toxicity“ je obvyklejší „side (adverse) effects“ nebo „toxicity“.

**Splnění cílů práce a celkové hodnocení:**

Zadané cíle diplomové práce jako byly splněny. Diplomantka zvládla odpovídající laboratorní techniky včetně náročných experimentů *in vivo* a velké množství získaných experimentálních dat dokázala vyhodnotit a diskutovat odpovídajícím způsobem. Literární úvod je výborný.

I když nebyla experimentálně nepotvrzena původní hypotéza, že je možno depletovat T<sub>reg</sub> buňky z organismu aktivací jejich proliferace komplexu IL-2/protilátka a následnou eliminací chemoterapií, byla získána nová prioritní data o dopadech použití komplexů IL-2/protilátka v kombinaci s následnou chemoterapií na T<sub>reg</sub> buňky a CD4<sup>+</sup> lymfocyty obecně. Bylo by zajímavé porovnat tyto výsledky s účinky komplexů a následné chemoterapie na CD8<sup>+</sup>, případně další buněčné populace. Další výsledky získané v rámci práce je možno považovat za předběžné, na které naváží další studie týkající se možnosti terapie kopolymeru HPMA nesoucí cytostatika kombinované s deplecí T<sub>reg</sub> buněk nebo komplexu IL-2/protilátka. Data jsou velmi robustní a publikační kvality, většina experimentů byla dělána na dostatečném počtu myši a opakována.

Určitou výhodu mám k použití označení výrazu MTD (maximum tolerated dose) v experimentech sledujících toxicitu kopolymerů. Experimenty byly naprosto dostatečné pro navržení vhodných schémat následujících terapeutických experimentů, ale pro určení MTD podle farmakologických standardů by bylo nutno sledovat větší soubory myši po delší dobu a také analyzovat více parametrů (sledování orgánové toxicity atd.). V kapitole 5.4.1 byly v rámci titrace *in vivo* porovnány dvě dávky αCD25 mAb; abychom mohli hovořit o titraci, bylo by nutné porovnat více dávek a zjistit minimální dávku, kdy dojde k maximálnímu efektu.

Celkově lze říci, že práce je na vysoké úrovni a diplomantka prokázala, že má velmi dobré předpoklady k budoucí vědecké práci.

**Otázky a připomínky oponenta:**

- Můžete shrnout, co je známo o rozdílných účincích cytostatik na  $T_{reg}$  a efektorové buňky a je možno vysvětlit, proč po použití kombinace IL-2 komplexů s následnou vybranou chemoterapií došlo ke zvýšení zastoupení  $T_{reg}$  v populaci  $CD4^+$  buněk?
- Je známo, že metronomické použití cyklofosfamidu depletuje populaci  $T_{reg}$  buněk; bylo by zajímavé terapeuticky použít cyklofosamid v kombinaci s komplexy IL-2?
- Důležitým údajem je dynamika populace  $T_{reg}$  buněk v uzlinách (např. jejich deplece bývá účinnější než ve slezině). Plánujete také sledovat populaci  $T_{reg}$  v uzlinách či máte nějaká data k dispozici?
- U grafů růstových křivek nádorů v terapeutických experimentů není presentována statistická analýza. Mohla byste doplnit signifikanci rozdílů mezi jednotlivými skupinami?

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně  velmi dobře  dobře  nevyhověl(a)

Podpis oponenta: