

Oponentský posudek na disertační práci Mgr. Petera Zavita „Adjuvant mucosal immunization of mice against influenza virus“

O aktuálnosti tématu předložené disertační práce v době epidemií „ptačí“ a „prasečí“ chřipky snad nikdo nepochybuje. Sami se ze sdělovacích prostředků přesvědčujeme o tom, že příprava nové vakcíny proti aktuálnímu subtypu chřipkového viru není jednoduchá a vyžaduje čas. Z tohoto hlediska se jeví jako velmi zajímavé a významné zejména výsledky Petera Zavita ukazující možnost dosažení inter-subtypové protektivní imunity intratracheální imunizací inaktivovaným virem spolu s *Bacillus firmus* jako adjuvanciem. Je důležité, aby se patogen setkal s účinnou obranou již v bráně vstupu infekce, kterou je pro virus chřipky sliznice respiračního traktu. Intramuskulární imunizace v současné době prováděná u lidí dostatečnou slizniční imunitu neindukuje. Mgr. Zanvit prokázal, že je možné indukovat protektivní slizniční imunitu inaktivovanou vakcínou opět díky adjuvantnímu účinku *B. firmus*.

Předložená disertační práce má úctyhodný rozsah 113 stran a je založena na třech publikovaných článcích a dvou dosud nepublikovaných rukopisech. U dvou publikací je Peter Zanvit prvním autorem a jde o publikace v kvalitním časopise Immunology Letters (IF mezi 2,3 a 2,6). U předložených rukopisů je Mgr. Zanvit prvním a druhým autorem a časopis Vaccine, do kterého byl jeden z nich zaslán, má IF 3,3.

Úvod na 62 stranách je velmi dobře zpracován, prvních 40 stran na mě působilo jako stručná moderní učebnice imunologie. Autor se zde věnuje slizničnímu imunitnímu systému, pattern recognition receptorům, imunitnímu systému respiračního traktu, viru chřipky včetně imunity proti chřipkové infekci a vakcinace a nakonec bakterii *Bacillus firmus* z hlediska jejich adjuvantních účinků. Pro méně zasvěceného čtenáře je připojen přehled použitých zkratk. Cíle práce jsou jasně formulované a již na tomto místě je možno konstatovat, že byly beze zbytku splněny.

Materiál a metody souborně uvedeny nejsou protože je lze najít u jednotlivých publikací a rukopisů které jsou součástí disertace. Použité metody zahrnují přípravu viru a bakterie *B. firmus*, imunizační schémata a metody hodnocení indukované imunity. V rámci těchto metod jsou užity ELISA testy k determinaci protilátek, ke stanovení cytokinů byla použita ELISA, RT-PCR nebo Real-time PCR. Posledně jmenovaná metoda byla využita i k měření genové exprese po vakcinaci a zahrnovala geny pro Toll-like receptory, interferony, Th1/Th2 cytokiny, iNOS a další proteiny. Použité metody byly adekvátní řešené problematice a zahrnovaly i moderní metody molekulární genetiky. V souvislosti s metodikou mám pouze

jeden dotaz. V článku v Immunology Letters (2005) jsem se setkal s titrem namnoženého viru $1,2 \times 10^4$ EID₅₀/ml. Zdá se mi to málo, ačkoli jsem s virem chřipky nikdy v laboratoři nepracoval.

Kapitola výsledky shrnuje na 15 stranách výsledky jednotlivých publikací. Za významný v první práci považuji fakt, že adjuvantní intratracheální imunizace výrazně zvýšila IgA a IgG protilátky v bronchoalveolární laváži i IgG protilátky v séru, čili slizniční imunizace se projevila i výrazným zvýšením systémové imunitní odpovědi proti viru chřipky typu B. Zajímavé je snížení proliferace splenocytů ze zvířat imunizovaných *in vivo* inaktivovaným virem po stimulaci tímto virem *in vitro* ve srovnání s nestimulovanými splenocyty a snížení produkce cytokinů v *ex vivo* kulturách splenocytů z kontrolních zvířat stimulovaných inaktivovaným virem. *Jak si autor vysvětluje imunosupresi inaktivovaným virem?*

Ve druhé publikované práci byl potvrzen adjuvantní účinek *B. firmus* na intranasální imunizaci inaktivovaným virem chřipky typu B u morčat. Důležité je, že po adjuvantní imunizaci došlo k výraznému zvýšení virus-neutralizačních protilátek.

Jak jsem již uvedl, velmi významný se mi jeví výsledek dokazující zkříženou protektivní imunitu indukovanou slizniční imunizací inaktivovaným virem + *B. firmus*. Takováto imunizace, povolená u lidí, by alespoň částečně vyřešila problémy s vývojem vakcín proti epidemicky aktuálnímu subtypu viru. V souvislosti s tímto výsledkem bych se chtěl autora zeptat, *čím byla podle něj způsobena crossprotekcce. Zkoušeli jste získaná séra na zkříženou reaktivitu ve virus-neutralizačním testu? Může DBF zvyšovat crossprezentaci antigenů chřipkového viru? Může crossprotekcce vysvětlit aktivace CTL, které nejsou subtypově specifické?*

Další dosud nepublikovaný rukopis potvrzuje indukci zkřížené ochrany při vakcinaci na sliznici spolu s *B. firmus* u fylogeneticky odlišných driftových variant chřipkového viru typu B.

Poslední rukopis již spadá do oblasti molekulární imunologie a snaží se osvětlit mechanismy adjuvantního efektu *B. firmus*. Autoři dokazují, že adjuvantní imunizace inaktivovaným virem chřipky + *B. firmus* zřejmě aktivuje plasmacytoidní dendritické buňky, které jsou významným zdrojem interferonů I. typu. Velmi časně po imunizaci došlo k polarizaci imunitní odpovědi směrem k Th1, což znamená vývoj buněčné antivirové imunity. Ovlivnění přirozené imunity adjuvanciem se nepochybně promítá i do regulace adaptivní specifické imunity. *Vzhledem k tomu, že práce je metodicky náročná a na publikaci je uvedeno 11 spoluautorů, zajímal by mě podíl disertanta na této práci.*

Předložená disertační práce nepochybně obsahuje nové poznatky, které se týkají využití *B. firmus* pro slizniční imunizaci proti chřipkové infekci. Tyto poznatky mají současně i velký aplikační potenciál. Práce je napsána přehledně, kvalitní angličtinou s minimem překlepů. Uzavírá jednu etapu výzkumu adjuvantní imunizace proti chřipce a současně otevírá další výzkumné směry, které se týkají zejména objasnění imunologické podstaty crossprotektce dosažené s pomocí *B. firmus*.

Závěr: Disertační práce prokazuje předpoklady autora k samostatné tvořivé vědecké práci a k udělení titulu Ph.D. za jménem. Disertaci jednoznačně doporučuji k obhajobě.

V Českých Budějovicích 28.8. 2009



Doc. RNDr. Jan Kopecký, CSc.