

V Praze dne 5.9. 2012

**Oponentský posudek na disertační práci Mgr. Martiny Petráčkové „Geneticky modifikované buněčné vakcíny proti *bcr-abl*-transformovaným buňkám“**

Tématem práce byla příprava experimentálních buněčných vakcín proti chronické myeloidní leukémii (CML) založených na geneticky modifikovaných myších nádorových buňkách produkujících cytokiny IL-2, IL-12 a GM-CSF, jejich charakterizace a analýza jejich terapeutických účinků. Práce je logickým pokračováním a doplněním projektů týkajících se experimentálních protinádorových vakcín řešených v ÚHKT, ve kterých toto pracoviště dosáhlo značných úspěchů.

V rámci práce byly připraveny dvě sady buněčných vakcín produkujících cytokiny IL-2, IL-12 a GM-CSF, a to na bázi lymfoblastoidních buněk B210 a 12B1, transformovaných vnesením onkogenu *bcr-abl*, které se liší svým onkogenním potenciálem. Zde je nutno zdůraznit, že lymfoidní buňky jsou obecně obtížně transfekovatelné, proto byla příprava daných buněčných vakcín poměrně náročná. V *in vivo* experimentech byla u většiny vakcín prokázána vyšší imunogenicita a nižší onkogenicita modifikovaných buněk ve srovnání s parentálními liniemi (modifikované buňky B210 ztratily svoji onkogenicitu zcela a byly dále používány jako živé vakcíny). Těžištěm práce byly *in vivo* analýzy jejich terapeutického i protektivního účinku vakcín zvláště na modelu pro agresivní CML 12B1, kdy byly prokázána imunoterapeutická schopnost vakcín včetně jejich použití v kombinované chemoimunoterapii s cyklofosfamidem a imatinib mesylátem (Glivecem). Dále byla prokázána i jejich schopnost vyvolat protektivní imunitu, pokud byly podány v profylaktickém uspořádání. Zvláštní pozornost byla věnována analýze vedlejších účinků GM-CSF.

Disertační práce byla vypracována formou, kdy základ tvoří publikované články doplněné kvalitním úvodem, diskusí, krátkým závěrem a přehledem literatury, ve kterém je uvedeno téměř 200 citací. Součástí práce jsou také komentáře výsledků z jednotlivých článků. Výsledky byly publikovány ve čtyřech uvedených pracích, z nich u třech z nich je Mgr. M. Petráčková prvním autorem.

**Připomínky k jednotlivým částem práce**

*Teoretická část.* V teoretické části je nejprve podán krátký úvod, ve kterém jsou uvedeny cíle práce a vysvětleno, jakým způsobem tato práce navazuje na předchozí projekty řešené v ÚHKT. Následuje literární přehled, který čtenáře dobře uvede do problematiky práce. Součástí jsou stručné tabulky poskytující aktuální přehled o klinických studiích s modifikovanými nádorovými buňkami a s vakcínami proti CML. Tyto tabulky by bylo možno využít jako základ přehledného článku.

*Experimentální část.* Experimentální část práce tvoří kopie čtyř publikací doplněné stručným českým přehledem. Jedna práce je věnována popisu a charakterizaci připravených vakcín a dvě jejich terapeutickým a profylaktickým účinkům. Tyto tři práce tvoří logický celek, chybí však práce, která by se podrobněji zabývala podrobnější charakterizací imunitních odpovědí indukovaných podáními jednotlivých vakcín (např. role jednotlivých subpopulací imunocytů, role přirozené či indukované imunity, polarizace imunitní odpovědi). Velmi důležitou částí je však práce podrobně mapující vedlejší škodlivé účinky GM-CSF. Tato část má velký význam i z klinického hlediska, neboť GM-CSF je často využíváno jako adjuvans v imunoterapeutických protokolech v klinických studiích.

*Diskuse a Závěr.* Diskuse i Závěr jsou dobře napsány a přispívají k tomu, že disertační práce působí velmi koncise a dobře se čte, přestože je sestavena z jednotlivých publikací.

*Poznámky k formální stránce práce.* Práce je jasně, přehledně a logicky napsána s kvalitními obrázky a tabulkami s minimem překlepů a chyb. U Tabulky I v Úvodu by mohly být uvedeny citace pro jednotlivé body. Stručné přehledy před jednotlivými vloženými pracemi umožňují dobrou orientaci v textu a také je v nich jasně uvedeno, jaký byl podíl Mgr. Petráčkové na jednotlivých publikacích.

### **Dotazy k diskusi**

- Do jaké míry je nutné, aby buněčná vakcína produkující cytokiny byla založena na nádorových buňkách exprimujících stejné nádorové antigeny jako cílové nádorové buňky? Buněčné vakcíny tohoto typu mohou být účinné i jako nespecifická imunoterapie tím, že jsou v organismu schopny zajistit stabilní produkci a tím pádem hladinu vybraného cytokinu po určitou dobu. Porovnávali jste účinek vašich vakcín s účinkem kontrolní vakcíny připravené z jiného typu syngenního nádoru a produkující podobné množství cytokinů?
- Zvyšuje se exprese MHC I u linie B210 vlivem IFN $\gamma$ , případně *in vivo* během progresu a terapie onemocnění?
- Vyšší dávky cyklofosfamidů mohou indukovat akumulaci myeloidních supresorických buněk, máte údaje o změnách jejich procentuálního zastoupení např. ve slezině během kombinované terapie zahrnující cyklofosfamid?
- Pozorovali jste u výrazně zvětšených uzlin z myši léčených GM-CSF produkujícími vakcínami také vyšší podíl jiných buněk než leukocytů a infiltrovaných nádorových buněk (t.j. CD45-negativních)?
- Jaká je podle vás perspektiva dalšího klinického testování a případně schválení protinádorových buněčných vakcín ve světě a u nás?

**Závěr**

Mgr. Martina Petráčková potvrdila, že je schopna samostatně vědecky pracovat. Zvládla náročnou přípravu geneticky modifikovaných buněčných vakcín na bázi obtížně transfekovatelných lymfoidních buněk a s využitím těchto modelů získala výsledky, které byly publikovány v několika pracích v mezinárodních časopisech s IF, z nichž ve třech byla prvním autorem. Doporučuji, aby práce byla přijata jako podklad pro udělení titulu PhD.



RNDr. Milan Reiniš, CSc.

Laboratoř nádorové imunologie  
Ústav molekulární genetiky AV ČR, v.v.i.  
Václavská 1083, 142 20 Praha 4