

Oponentský posudek na dizertační práci MUDr. Pavla Gabriela nazvanou "Studie vlivu imunologických adjuvans na experimentální léčbu nádorů indukovaných HPV pomocí rekombinantních VACV a DNA vakcín"

Dizertační práce MUDr. Gabriela je zaměřena především na zkoumání imunogenních a protinádorových efektů virového CC-chemokinového receptoru (vCCI) viru vakcínie a granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF); obsahuje také kapitola zaměřenou na přípravu leukemické linie stabilně exprimující antigen Wilmsova tumoru 1 (WT1).

V práci prezentované výsledky byly opublikovány ve dvou původních článkách, IF časopisů 1.208 a 1.750. Kromě toho je MUDr. Gabriel spoluautorem dalších 5 článků, které však do dizertační práce zařazeny nejsou.

Dizertační práce je napsána přehledně a zjevně s důrazem na logické členění, nicméně pozornější korektura by jí prospěla. Práce obsahuje abstrakt, seznam zkratk, obsáhlý a velmi zdařilý úvod a přehled studované problematiky (toho si opravdu velmi cením, zejména pokud jde o interakce viru vakcínie s hostitelem), podrobně popsané metody, výsledky, diskusi, závěr, seznam referencí (580) a přílohy (reprinty 2 článků).

V první části práce se autor věnuje studiu vlastností a efektů vCCI jako adjuvans při vakcinaci proti E7 proteinu HPV16, exprimovaného různými rekombinantními viry vakcínie kmene Praha 13 nebo DNA plasmidy. K tomu bylo zkonstruováno poměrně velké množství plasmidů - inserčních/expresních vektorů, které byly dále použity k homologní rekombinaci a selekci rekombinantních virů s E7 proteinem v kombinaci s vCCI VACV kmene Praha 13 s nekompletní signální sekvencí, s vCCI s doplněnou, funkční signální sekvencí, příslušné revertanty a jiné kontroly. Expres vCCI byla ověřena na tkáňových kulturách western blot analýzou a jeho sekrece do supernatantu autoradiografií. Efekty exprese vCCI byly dále studovány in vivo na myších různými metodami, zejména ELISA, qPCR, ELISPOT. Bylo nalezeno snížení hladin některých cytokinů a atenuace VACV při zachování imunogenosti. Dále bylo testováno, zda imunizace DNA vakcínou s vCCI může ovlivnit replikaci rekombinantních VACV exprimujících vCCI. Na závěr byl testován na myších efekt sekreční formy vCCI na preventivní a terapeutickou imunizaci DNA vakcínami a rekombinantními VACV proti E7 proteinu HPV16 v různém uspořádání a efekt sekreční formy vCCI na protinádorový účinek této imunizace na podkožní růst TC-1, myší nádorové linie transformované onkogeny E6 a E7 HPV-16 a protoonkogenem H-Ras. Tyto pokusy vedly k závěru, že sekreční forma vCCI exprimovaná VACV vede spíše ke snížení protinádorového efektu imunizace, zatímco exprese pomocí DNA vakcín neměla žádný pozorovatelný efekt nebo růst tumoru poněkud snížila.

Ve druhé části práce se autor zabývá studiem efektu GM-CSF jako adjuvans při léčbě podkožních tumorů z buněk TC-1 a TC-1/A9, linie s expresí onkogenů HPV16 a sníženou expresí H-2b (MHC I). DNA vakcína proti E7 proteinu HPV-16 vedla k inhibici až involuci nádorů z TC-1 linie, zatímco neměla v podstatě žádný efekt na linii TC-1/A9. Tento nulový protinádorový efekt se autor snažil ovlivnit expresí GM-CSF pomocí rekombinantních VACV kmene Praha 13 a MVA při aplikaci i.p., i.m. a i.t. (intratumorálně). Z různých kombinací se jako efektivní adjuvans při aplikaci DNA vakcín jevila i.t. aplikace MVA exprimující GM-CSF - tento způsob aplikace inhiboval jak růst primárního tumoru z TC-1/A9 buněk, tak relaps po jeho chirurgickém odstranění. Imunohistochemickou analýzou a průtokovou cytometrií bylo zjištěno, že TC-1/A9 tumory byly po kombinaci DNA vakcín s i.t. aplikací MVA-GM-CSF zvýšeně infiltrovány CD3+ buněčnými elementy, avšak zvýšená exprese MHC I byla ovlivněna pouze samotnou DNA vakcínou, nikoliv GM-CSF.

Třetí část práce je zaměřena na přípravu leukemické linie stabilně exprimující antigen WT1, avšak toto vedlo pouze k selekci klonů rezistentních na selekční antibiotikum, ne ke stabilní expresi WT1. Vzhledem k tomuto výsledku i vzhledem k chybějící diskusi na toto téma působí třetí část práce jako neuzavřená.

Na autora bych měla několik dotazů a připomínek:

V úvodu na str. 52 zmiňujete, že kožní léze způsobené inokulací VACV s delecí vCCI byly větší, přičemž imunitní odpověď charakterizovaná infiltrací zánětlivými elementy byla rovněž větší. Jak byste takový výsledek interpretoval?

Na str. 105, Obr. 17 popisujete proužek ve vzorcích č. 1, 2 a 3 jako nespecifický. Osobně se domnívám, že tento proužek nelze považovat za nespecifický - intenzita signálu je relativně vysoká ve srovnání s pozadím. Existuje nějaký buněčný homolog či možnost zkříženě reagujícího buněčného proteinu? Bylo by možné ještě nějaké jiné vysvětlení, jak se daný proužek ve vzorcích objevil?

Na str. 109, Obr. 19 jste stanovoval replikaci různých rekombinantů pomocí kvantitativního PCR, charakterizovanou počtem kopií VACV/100 ng DNA. Zjištěné hodnoty počtu kopií se pohybují v podobném rozmezí v intervalu označeném 0 stejně jako i v dalších dnech (kromě hodnot, které jsou rovny 0). Mohl byste prosím objasnit, jak rozumět zjištění, že počet kopií viru byl v den inokulace stejný jako 3., 4. či 5. den po infekci?

Jak si vysvětľujete vyšší účinnost GM-CSF exprimovaného pomocí MVA než pomocí Praha?

Dále bych ráda, kdybyste mohl diskutovat rozdíly či překryvy mezi termíny onkolytická terapie a nádorová imunoterapie s využitím virů.

Drobné dotazy a připomínky:

Různé překlady, odchylky z vazby, stylistika

Nejednotné zkratky, např. dendritické buňky - DC i DB, virus vakcínie - VACV i VV, atd.

Str. 58 – iNOS není reaktivní dusík, ROS nelze nazývat meziprodukty kyslíku

Str. 105 - odkaz na Obr. 2 (str 35) – zřejmě má být Obr. 17

Str. 106 4.1.3.2. síťovací činidlo – lépe asi zesíťovací činidlo

Na závěr svého hodnocení doporučuji, aby dizertační práce MUDr. Gabirela byla přijata jako podklad pro udělení titulu PhD.

MUDr. Zora Mělková, PhD

V Praze dne 18. června 2014