



UNIVERZITA KARLOVA

1. lékařská fakulta

ÚSTAV IMUNOLOGIE A MIKROBIOLOGIE

Studničkova 7, 128 00 Praha 2

Česká Republika

Oponentský posudek disertační práce

Mgr. Kláry Dáňové

Role imunitního systému v imunopatogenezi autoimunitních chorob a možnosti terapeutického ovlivnění autoimunitní reakce tolerogenními dendritickými buňkami

Disertace byla vypracována na renomovaném pracovišti a zabývá se aktuálním tématem navození imunologické tolerance za účelem léčby autoimunitních chorob se zvláštním zřetelem k diabetu 1. typu (T1D). Jde o spojení základního a klinického výzkumu vysoké úrovně. Práce je založena na dvou původních publikacích, kde je kandidátka první autorkou a které byly otištěny v kvalitních impaktovaných mezinárodních časopisech. Jedna z prací byla odměněna cenou České imunologické společnosti, druhá cenou České společnosti pro alergologii a klinickou imunologii. Tyto skutečnosti jsou důkazem vysoké kvality předkládané disertace. Část získaných výsledků se stala podkladem dvou mezinárodních patentů, u kterých je Mgr. Dáňová spoluautorkou. Kandidátka je rovněž spoluautorkou tří přehledných článků týkajících se tématu disertace uveřejněných ve dvou českých odborných časopisech a v jednom mezinárodním impaktovaném časopise.

Práce je psaná anglicky, velmi přehledně a srozumitelně a má promyšlenou a logickou koncepci. Krátký úvod výstižně uvádí do problematiky. Podrobný literární přehled je zaměřen ve třech oddílech na diabetes mellitus 1. typu, na tolerogenní dendritické buňky a na shrnutí

dosavadních zkušeností a názorů na potenciální využití dendritických buněk při léčbě autoimunitních onemocnění. Záměry práce jsou dobře promyšlené a formulované. Výsledky jsou představeny dvěma příloženými publikacemi, jimž vždy předchází krátká charakteristika a zhodnocení. Výsledky, které nebyly dosud publikovány, jsou popsány v třetím oddíle „Výsledků“. Následuje shrnující diskuse, závěry a obsáhlý seznam citované literatury svědčící o dokonalé orientaci autorky ve studované oblasti

Tolerogenní vlastnosti dendritických buněk, mechanismy vzniku a možnosti léčení T1D jsou studovány již delší dobu a toto studium zdaleka není u konce. Autorka analyzuje dosavadní výsledky, navazuje na ně a ke studované problematice přispívá kritickým posouzením metod používaných pro přípravu tolerogenních buněk, vyvinutím optimalizované metody a přináší řadu nových původních výsledků týkajících se vlastností, funkce a stability tolerogenních dendritických buněk.

První práce se zabývá přípravou tolerogenních dendritických buněk z krve zdravých dárců, jejich podrobnou fenotypickou a funkční charakterizací a přináší prioritní podrobnou analýzu signalizačních drah uplatňujících se při regulaci tolerogenních vlastností a funkce dendritických buněk. Jsou popsány rozdíly v signalizačních drahách po stimulaci tolerogenních dendritických buněk ve srovnání s netolerizovanými dendritickými buňkami. Metoda použitá autorkou umožňuje přípravu tolerizovaných dendritických buněk značně stabilních v zánětlivém prostředí, což je nezbytným předpokladem pro potenciální léčebné využití.

Druhá publikace se věnuje přípravě a charakterizaci tolerogenních dendritických buněk připravených z krve pacientů s T1D a jejich srovnání s tolerogenními dendritickými buňkami z krve zdravých dárců. Z krve pacientů byly připraveny i stabilní tolerogenní dendritické buňky pulsované imunodominantním autoantigenem specifickým pro T1D (glutamát dekarboxyláza 65 – GAD65), které navozovaly vznik Ag specifických regulačních T buněk (Treg). Zcela nové a velmi důležité jsou poznatky objasňující vlastnosti získaných dendritických buněk a T buněk a jejich tlumivého potenciálu v závislosti na stupni rozvoje onemocnění. Ukazují, jak tlumivé působení autologních tolerizovaných dendritických buněk a vznik Ag specifických Treg závisí na klinickém stavu pacienta, na stupni kompenzace jeho glykemie a na délce trvání onemocnění. Z krve pacientů, kteří mají T1D kratší dobu a mají dobře kompenzovanou glykemii lze připravit tolerizované dendritické buňky s lépe

rozvinutými tlumivými vlastnostmi než z krve pacientů s více rozvinutým diabetem.

U pacientů s déle trvajícím diabetem a vysokou glykemií se hůře navozuje vznik Treg. Tyto výsledky, i když zatím založené jen na pokusech *in vitro*, mají zásadní význam pro posouzení vyhlídek buněčné léčby a pro budoucí výběr pacientů pro klinické pokusy. Nové poznatky a metodické modifikace představují důležitý stupeň přípravy pro budoucí klinické využití.

Třetí, dosud nepublikovaná část výsledků představuje už bezprostřední přípravnou fázi ke klinickým pokusům: zabývá se optimalizací přípravy tolerogenních dendritických buněk v dostatečném množství a kvalitě nutnými pro klinické pokusy (prováděno ve spolupráci s Sotio a.s. Technical Operations). Byly porovnány a posouzeny různé metodické modifikace a vypracován systém kontrol připravených tolerogenních dendritických buněk, které by měly být podávány pacientovi. Příprava buněk dostatečného množství a kvality byla úspěšná a tyto výsledky značně přiblížily počátek klinických pokusů. Vzhledem k tomu, že použití tolerizovaných dendritických buněk pulsovaných specifickým antigenem je spojeno s potenciálním nebezpečím, že aplikace těchto buněk *in vivo* může neočekávaně způsobit zhoršení autoimunitního onemocnění, nelze v současné době počítat s jejich podáním pacientům. Proto výše popsaná přípravná fáze klinických pokusů počítá s použitím dendritických buněk nepulsovaných specifickým antigenem.

Práce je věcně i formálně velmi dobře provedena a nemám k ní zásadní připomínky. Při jejím čtení vyvstává řada otázek, jejichž zodpovězení vyžaduje další výzkum. K diskusi bych navrhovala dva následující body:

- Z uvedených a pochopitelných důvodů nebyla pro přípravu tolerogenních dendritických buněk ke klinickým pokusům použita stimulace specifickým antigenem β -buněk pankreatu. Do jaké míry mohou takové nespecificky tolerizované dendritické buňky potlačovat imunitu proti infekci či proti nádorům? Byla tato otázka studována na zvířecím modelu?
- Různými způsoby se daří potlačovat autoimunitní onemocnění, ale tento efekt zpravidla mizí brzy po vysazení léčby. Cílem buněčné terapie má být navození dlouhodobé tolerance proti autoantigenům. Pokud jde o snahy o buněčnou léčbu T1D tolerizovanými dendritickými buňkami, jakou dlouhodobost můžeme očekávat? Je možné dosáhnout trvalého účinku, a jaký by mohl být jeho mechanismus?

Závěr

Předložená práce je velmi kvalitní a obsažná a plně splňuje nároky na disertační práci. Zahrnuje prioritní výsledky, má významné publikační výstupy a je příslibem brzkého klinického využití. Autorka prokázala schopnost samostatné tvůrčí práce. Doporučuji, aby byla disertace přijata jako podklad pro udělení vědecké hodnosti PhD.

Prof. MUDr. Ludmila Prokešová, CSc.

V Praze 10. května 2019