

Oponentský posudek doktorské dizertační práce (Ph.D.) Mgr. Kateřiny Pokorné s názvem „Preklinický model akutní promyelocytární leukemie: studium anti-leukemického efektu vyvolaného pomocí ATRA a DNA vakcinace“ „Pre-clinical model of acute promyelocytic leukemia: Study of the anti-leukemic effect induced by ATRA and DNA vaccination“

Práce je celá v angličtině a byla vypracována v INSERM UMRS940, v Institutu Universitaire d'Hématologie Hopital Saint-Louis, v Paříži ve Francii pod vedením školitelů Dr. Mariky PLA, Ph.D. a doc. RNDr. Vladimíra Holáně, Dr.Sc.

Práce byla vypracována v rámci doktorského studijního programu Univerzity Karlovy a Akademie věd České republiky v oboru Imunologie.

Práce se celá zabývá studiem možností kombinované diferenciační a imunologické léčby akutní promyelocytární leukemie (APL) v preklinických modelech transgenních myší. Hlavní pozornost je věnována navození a charakterizaci imunitní odpovědi vyvolané léčbou pomocí ATRA (kyselinou all-trans-retinovou) a DNA vakcinací.

Cíle práce byly následující:

1. Provést charakterizaci imunitní odpovědi vyvolané léčbou pomocí ATRA a ATRA+DNA kombinované terapie
2. Monitorovat vývoj nemoci a předpovědět klinický výsledek a eliminaci PML-RARalfa pozitivních buněk dosažené pomocí ATRA+DNA kombinované léčby.

Předkládaná práce je metodicky bohatá – používá jak imunologických (průtoková cytometrie, ELISA, cytotoxické testy na efektorové buňky), tak i biochemických a molekulárně biologických metodických přístupů na bázi qPCR, přípravy cDNA a RNA. Autorka zvládla nejmodernější molekulárně-genetické analýzy. Práce vychází z předpokladů možnosti navození dlouhodobé remise onemocnění indukci specifické jak protilátkové, tak i T-buněčné imunitní odpovědi využitím DNA vakcíny v kombinaci s diferenciační terapií pomocí ATRA. U myší s transplantovanou APL z transgenních modelových myší byly sledovány parametry protilátkové i buněčné adaptivní odpovědi proti leukemickým buňkám - před, během a po léčbě ATRA. Jednou z klíčových otázek bylo, zda kombinovaná léčba ATRA a DNA vakcínou navozuje dlouhodobou remisi se specifickou imunitní odpovědí založenou na CD4+ a CD8+ T-lymfocytech. Sledováním exprese znaku CD107a (degranulace) byla prokázána specifická cytotoxická T buněčná imunitní odpověď namířená proti APL buňkám. Tato odpověď byla závislá na antigenní prezentaci MHC. Podařilo se tak i izolovat CD8+ a CD107a+ cytotoxické T-lymfocyty namířené proti leukemickým buňkám. Tyto buňky zároveň produkovaly interferon-gamma. Úspěšnost léčby podávané modelovým myším APL byla posuzována podle prodloužení doby přežití. Zároveň byla monitorována protilátková aktivita proti PML-RARalfa transkriptu u nemocných léčených ATRA. Důležitou otázkou bylo prozkoumání, kde

se nacházejí reziduální leukemické buňky, které mohou nastartovat relaps onemocnění. Pomocí molekulárních technik bylo zjištěno, že zdrojem relabujících leukemických buněk nemocných může být mozek i slezina. V práci je také detailně popsán myší transgenický model akutní promyelocytární leukemie, který byl získán od M. Bishopa z Bostonu. Práce se zabývá i mnoha dalšími aspekty monitorování a léčby promyelocytární leukemie na zmíněném myším modelu, ale i u nemocných.

Předkládaná práce obsahuje 2 vyšlé publikace ve vysoce impaktovaném mezinárodním periodiku (Blood) i s bohatým příloženým materiálem, a dále je předložena publikace zasláná do téhož periodika s prvním autorstvím předkladatelky. Všechny práce byly vypracovány během pobytu v jedné z nejprestižnějších laboratoří INSERM v Paříži. Vypracování dizertační práce bylo podpořeno několika zahraničními granty a grantem GAČR a GA Univerzity Karlovy.

Vzhledem ke kvalitě předložených publikací, rozsahu a kvalitě práce autorky doporučuji tuto práci k obhajobě a ke kladnému posouzení jako dizertaci pro získání titulu Ph.D. Práce dle mého názoru zcela splňuje formální i kvalitativní požadavky kladené na doktorskou dizertační práci z oboru imunologie.

V Praze dne 30.8.2012

Doc. RNDr. Petr Stöckbauer, CSc.

Ústav hematologie a krevní transfuze

U Nemocnice 1

12820 Praha 2