



Vážená paní
PhDr. Marta Hrušková
vedoucí Oddělení Ph.D. studia a zahraničních záležitostí
děkanát 2. lékařské fakulty University Karlovy
V Úvalu 84, Praha 150 06

Oponentský posudek disertační práce disertační práce Mgr. Ondřeje Peláka

Název disertační práce: *Specifická protivirová imunita u imunokompromitovaných pacientů, především po transplantaci kostní dřeně*
Pracoviště: Klinika dětské hematologie a onkologie, FN Motol
Školitel: doc. MUDr. Tomáš Kalina, PhD.
Doktorský studijní program: *Imunologie*

Vážení kolegové,
předně mi dovoluji, abych poděkoval za důvěru, s níž jste mi odeslali výše uvedenou disertační práci k posouzení.

Úvod

Jedná se o originální práci věnující se problematice CMV specifické imunity po alogenní transplantaci krvetvorných kmenových buněk a transplantaci ledviny a to v širokém rozsahu od detekce specifických lymfocytárních subpopulací až po jejich využití v predikci a léčbě CMV reaktivací. Práce vychází z pěti článků publikovaných v zahraničních časopisech v letech 2014 až 2019, na kterých se uchazeč podílel jako hlavní autor nebo spoluautor.

Práce je opatřena teoretickým úvodem, který sumarizuje problematiku protivirové imunity po alogenní transplantaci s akcentem na T-buněčné subpopulace. Popisuje moderní analytické metody pro sledování stavu a aktivity imunitního systému po transplantaci, cytometrické i molekulárně genetické, a věnuje se také pokročilé analýze multiparametrických cytometrických dat. Výsledky práce odkazují na předpokládané cíle a prezentují hlavní myšlenky jednotlivých publikačních výstupů. Text práce tvoří 76 stran včetně tabulek, grafů, seznamu citované literatury a pět příloh, resp. článků, ze kterých práce vychází.

Obsahová stránka a výsledky disertační práce

Téma disertační práce je velmi aktuální. Reaktivace CMV infekce a její léčba mají významný vliv na morbiditu pacientů podstupujících transplantační léčbu. Její včasná a správná diagnostika přispívá ke snížení dopadu této komplikace na mortalitu a kvalitu života nemocného.

Jedním z cílů práce bylo charakterizovat populace T-lymfocytů, které umožňují kontrolu CMV reaktivace u pacientů po alogenní transplantaci hemopoetických kmenových buněk. Pacienty s rychlou eliminací viru bylo možno identifikovat podle exprese CD8⁺ T-lymfocytů produkujících IFN γ a IL-2. Riziko vzniku CMV reaktivace bylo signifikantně sníženo při přítomnosti těchto lymfocytů a také při absenci kortikoterapie v potransplantačním období.

Schopnost detekovat CMV specifické lymfocyty byla využita k pilotní studii s jejich adoptivním přenosem v rámci léčby CMV reaktivací u rizikových pacientů. Podání CMV specifických T-lymfocytů izolovaných



z krve haploidických dárců bylo provedeno u dvou pacientů a u obou vedlo k dobré kontrole virové reaktivace.

Na souboru pacientů po transplantaci ledviny byly vyšetřovány klony T-lymfocytů, které zkříženě rozpoznávají CMV a alo antigen a mohou hrát roli v rejekci štěpu. Analýza TCR β repertoáru prokázala přítomnost klonů sdílených mezi alo a CMV specifickou reakcí. Porovnání zkříženě reagujících klonů s klony T-lymfocytů izolovanými z biopsie ledviny ukázalo, že alo reaktivní klony jsou v transplantátu nejen přítomné, ale někdy i v překvapivě vysokých frekvencích a odpovídají CMV asociované akutní rejekci štěpu. Časné zahájení protivirové léčby je proto nejen prevencí CMV nemoci ale také T- buněčné rejekce.

Pro komplexní analýzu lymfocytárních subpopulací byla optimalizována metoda hmotnostní spektrometrie a také metoda přípravy vzorku, kdy byly porovnány výsledky získané klasickou izolací v hustotním gradientu a CD81+ afinitní chromatografií z pohledu čistoty a kompozice vzorků. Data byla následně zpracována clusterovou analýzou, která identifikovala celkem 37 unikátních populací (zčásti expertně identifikovaných a zčásti nesupervidovaných).

Hodnocení disertační práce

Disertační práce je přehledně uspořádána. Formální úprava i jazyková úroveň jsou v pořádku. Práce je napsána dobrou češtinou bez gramatických chyb či překlepů. Diskutovaná problematika je podána jasně a srozumitelně a srozumitelně jsou popsány i použité analytické metody. V jednotlivých kapitolách se uchazeč věnuje řešeným problémům dostatečně důkladně, vhodně analyzuje dostupnou literaturu a vyvozuje aktuální závěry. Použité statistické testy jsou adekvátní, nejsou přítomné evidentní metodologické chyby.

Publikace předložené v rámci disertační práce (5 publikací) a ostatní publikace autora (6 publikací) mají vysokou úroveň, byly otištěny v zahraničních časopisech s průměrným IF 4,2 na publikaci.

Práce přináší zajímavá nová data o problematice rekonstituce protivirové imunity po alogenní transplantaci, jejich korelaci s dalšími peritransplantačními parametry, a zároveň nabízí možnosti upřesnění predikce virové (CMV) reaktivace a algoritmů pro indikaci protivirové léčby včetně adoptivní imunoterapie. Pilotní využití imunoterapie v kontrole CMV reaktivace je východiskem pro výzkum virové specifických lymfocytů určených k léčbě dalších infekcí (EBV, ADV). Na problematice transplantací ledviny je naopak demonstrován možný negativní efekt T-buněčné imunity, která při protivirové imunitní odpovědi může současně přispívat ke vzniku rejekce transplantátu.

Dotazy

1. Jaké procentuální zastoupení CMV specifických IFN γ produkujících T-lymfocytů lze očekávat u zdravých dárců a jaká hodnota je potřebná pro jejich úspěšnou izolaci a adoptivní přenos?
 2. Ve své práci jste identifikovali T-lymfocytární subpopulace, které upřesňují riziko CMV reaktivace a délku jejího trvání. Změnili tyto informace nějakým způsobem zavedené postupy pro pre-emptivní léčbu.
 3. Kortikosteroidy podávané pro léčbu GVHD jsou výrazným rizikovým faktorem CMV reaktivace. Je tento vliv závislý na dávce, resp. existuje nějaká „bezpečná“ dávka s malým dopadem na imunitní rekonstituci ?
 4. Detekovali jste zkříženě reaktivní T-lymfocytární klony u pacientů po transplantaci ledviny, které hrají roli při rejekci transplantátu. Lze u pacientů po transplantaci krvetvorných buněk pozorovat podobný efekt ve smyslu asociace CMV reaktivace a GVHD resp. relapsu ? Pokud ano, pozorovali jste jej ve svém souboru?
-



Závěr oponenta

Práci hodnotím celkově kladně. Přes výše uvedené dotazy je možno konstatovat, že práce splnila stanovené cíle. Jde o důležitý příspěvek k problematice analýzy protivirové imunitní rekonstituce a řešení CMV reaktivací po transplantaci. Tyto informace následně umožňují individualizaci antivirové léčby, která má dopad na dlouhodobé přežití transplantovaných pacientů.

Uchazeč prokázal dostatečné teoretické a praktické znalosti problematiky a tvůrčí schopnosti, a proto doporučuji předloženou disertační práci k její obhajobě. Disertační práce splnila stanovené podmínky, proto také doporučuji, aby na základě uspokojivého zodpovězení otázek oponentů a úspěšné obhajoby byl Mgr. Ondřej Peláček udělen akademický titul PhD. podle § 47 Zákona o vysokých školách č. 111/98 Sb.

doc. MUDr. Daniel Lysák, PhD.
Hematologicko- onkologické oddělení
Fakultní nemocnice Plzeň

15.08.2020
