

Univerzita Karlova v Praze
2. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce



**Dendritické buňky u solidních nádorů urogenitálního
systému**

MUDr. Ivo Minárik, FEBU

Praha (2014)

Doktorské studijní programy v biomedicině

Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky

Obor: Experimentální chirurgie

Předseda oborové rady: Prof. MUDr. Jaroslav Živný, DrSc.

Školící pracoviště: Urologická klinika UK 2.LF a FN Motol

Autor: MUDr. Ivo Minárik, FEBU

Školitel: Doc. MUDr. Ladislav Jarolím, CSc.

Konzultant (byl-li):

Oponenti:

Autoreferát byl rozeslán dne:

Obhajoba se koná dne:vhod.
kde:

S disertační prací je možno se seznámit na děkanátu
2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

Obsah

1	Abstrakt	4
2	Úvod	6
3	Hypotézy a cíle práce	7
3.1	<i>Metodické aspekty přípravy buněčné imunoterapie u karcinomu ovaria a prostaty</i>	7
3.2	<i>Imunoterapie pomocí dendritických buněk u pacientů s karcinomem prostaty</i>	8
3.3	<i>Analýza infiltrátu imunitních buněk u karcinomu ledviny</i>	8
4	Materiál a metodika	9
4.1	<i>Metodické aspekty přípravy buněčné imunoterapie u karcinomu ovaria a prostaty</i>	9
4.1.1	Karcinom ovaria	9
4.1.2	Karcinom prostaty	10
4.2	<i>Imunoterapie pomocí dendritických buněk u pacientů s karcinomem prostaty</i>	11
4.3	<i>Analýza infiltrátu imunitních buněk u karcinomu ledviny</i>	12
5	Výsledky	13
5.1	<i>Metodické aspekty přípravy buněčné imunoterapie u karcinomu ovaria a prostaty</i>	13
5.1.1	Karcinom ovaria	13
5.1.2	Karcinom prostaty	14
5.2	<i>Imunoterapie pomocí dendritických buněk u pacientů s karcinomem prostaty</i>	15
5.3	<i>Analýza infiltrátu imunitních buněk u karcinomu ledviny</i>	16
6	Diskuze	17
7	Závěr	18
8	Použitá literatura	20
9	Seznam řešených grantů a vlastních publikací	21

1 Abstrakt

S rozvojem vědy se v posledních 15 letech objevují klinické studie, které mají za cíl obnovit imunitní reakci vůči nádorovým buňkám a případnou nádorovou tkáň z těla eliminovat. Nicméně pro vývoj účinných imunoterapeutických vakcín je nutné především pochopit interakce jednotlivých nádorů s imunitním systémem. V první části práce se věnuji přípravě vakcíny z dendritických buněk u pacientů s karcinomem ovaria a prostaty. In vitro jsme prokázali schopnost diferenciaci dendritických buněk z periferních mononukleárů pacientů s oběma typy nádoru, schopnost pulzace dendritických buněk apoptotickými nádorovými buňkami, v případě karcinomu ovaria autologními nádorovými buňkami, u karcinomu prostaty buňkami nádorových linií LNCap a DU145. Maturované pulzované dendritické buňky exprimovaly maturační znaky CD83, kostimulační molekuly CD80 a CD86 a produkovaly důležité cytokiny. Takto připravené dendritické buňky indukovaly specifickou T lymfocytární odpověď. V další fázi práce se věnuji praktické přípravě vakcíny z dendritických buněk u pacienta s karcinomem prostaty a její optimalizace v GMP podmínkách. Jako nejvhodnější médium pro kultivaci se ukázalo Cell Gro, maturace dendritických buněk pomocí poly I:C vedla k největší proliferaci specifických T lymfocytů a zároveň k nejnižší proliferaci regulačních T lymfocytů ze zkušných maturačních činidel. Prakticky jsme vyzkoušeli aplikaci a efekt vakcíny u pacienta s metastatickým karcinomem prostaty. V poslední části práce se věnuji studiu nádorového infiltrátu u pacientů s karcinomem ledviny a jeho korelaci se stádiem onemocnění. V pozdních stádiích jsme pozorovali vyšší zastoupení neutrofilů a nižší počet plasmacytoidních dendritických buněk. Zastoupení regulačních T lymfocytů v infiltrátu ani periferní krvi nebyl závislý na stádiu nádorového onemocnění, nicméně pacienti měli oproti zdravým kontrolám počty regulačních T lymfocytů v periferní krvi zvýšené. Tyto výsledky naznačují změnu interakce imunitního systému s nádorovými buňkami v závislosti na stádiu onemocnění, což může v budoucnu ovlivnit vývoj protinádorové imunoterapie a její vhodné načasování.

In the last 15 years we can observe many clinical studies which focus on recovery of immune reaction against tumor cells and possibly tumor elimination. At first it is necessary to understand the interaction of immune system with tumor cells so that effective vaccines are developed. In the first part of this work, I focus on the preparation of dendritic cell vaccine for patients with ovarian and prostate cancer. We show that dendritic cells can be differentiated from peripheral mononuclear cells in both tumors in vitro, we were able to pulse dendritic cells with apoptotic tumor cell, in case of ovarian cancer with autologous tumor cells, in case of prostate cancer with prostate cancer cell lines LNCaP and DU145. Pulsed mature dendritic cells expressed maturation marker CD83, costimulatory molecules CD80 and CD86 and produced significant cytokines. These dendritic cells also induced specific T lymphocyte response. In the next part of the work we focused on practical aspects of preparation of dendritic cell vaccine in the patient with prostate cancer and optimization of preparation in GMP conditions. The best medium for cultivation turned out to be Cell Gro. Maturation of dendritic cell with poly I:C led to the highest proliferation of specific T lymphocytes and at the same time to the lowest proliferation of regulatory T lymphocytes. We administered the vaccine in a patient with metastatic prostate cancer and followed the clinical and immunological response. In the last part of the work we studied the dendritic cells, neutrophils and regulatory T lymphocytes in the blood and tumor infiltrate of patients with clear cell renal carcinoma and correlated the results with clinical stage. We found higher numbers of neutrophils and regulatory T lymphocytes in the peripheral blood of renal cancer patients than in healthy controls. We observed more neutrophils and less plasmacytoid dendritic cells in the tumor infiltrate in the advanced stage patients, however, we found no significant difference in the regulatory T lymphocytes in the tumor microenvironment when stage groups were compared. These results imply possible change in the interaction of immune system with tumor cells with respect to the disease stage which may influence the development of cancer immunotherapy and its appropriate timing.

2 Úvod

Nádorová onemocnění představují pro společnost ohromnou zdravotní i ekonomickou zátěž. Představují přibližně třetinu všech příčin úmrtí v ČR. Přestože se úspěšnost léčby v posledních 30 letech výrazně zlepšila, i tak velká část pacientů umírá na generalizaci onemocnění. U některých nádorů, jako jsou např. germinální tumory varlat, je vysoká pravděpodobnost vyléčení současnými možnostmi (chemoterapie). Na druhou stranu stádia generalizace např. nádorů ovaria nebo ledviny nebo kastračně rezistentní stádium karcinomu prostaty mají nízkou pravděpodobnost 5letého přežití [1-3]. Celá řada klinických studií se zaměřuje právě na tyto tumory. Zkouší se nová chemoterapeutika, hormonální preparáty, ale také nové imunoterapeutické postupy, konkrétně cílená buněčná imunoterapie [4-8]. Příkladem schválené buněčné terapie je Sipuleucel-T [7]. Jedná se o vakcínu z dendritických buněk pulzovaných hybridním proteinem obsahující kyselou prostatickou fosfatázu a GM-CSF, která je určena pacientům s kastračně rezistentním karcinomem prostaty. Ve srovnání s placebem prodlužuje celkové přežití přibližně o 4 měsíce. Vzhledem k relativně vysokému počtu publikovaných studií (většinou I a II fáze) je prokazatelný efekt dosud vyvinutých vakcín nízký. Abychom dokázali zvýšit účinnost imunoterapeutických vakcín, musíme co nejlépe pochopit interakci imunitních a nádorových buněk v různých stádiích příslušných tumorů. V této disertační práci se věnuji ověření schopnosti přípravy vakcíny z dendritických buněk u pacientů/tek s karcinomem prostaty a ovaria, přípravě vakcíny v GMP podmínkách s aplikací u pacienta s metastatickým karcinomem prostaty, v poslední

části se zaměřuji na studium nádorového infiltrátu u pacientů se světlobuněčným karcinomem ledviny.

3 Hypotézy a cíle práce

3.1 Metodické aspekty přípravy buněčné imunoterapie u karcinomu ovaria a prostaty

Jednotlivé úkoly řešené v průběhu experimentu:

- Podmínky pěstování DC z periferních monocytů pacientek s ovariálním karcinomem a pacientů s karcinomem prostaty
- Metody indukce apoptózy nádorových buněk UV zářením
- Optimalizace časů expozice dendritických buněk nádorovým buňkám a sledování lokalizace nádorových buněk po pohlcení
- Ověření funkčnosti DC z monocytů u pacientů - Indukce specifické protinádorové odpovědi in vitro u pacientek s ovariálním karcinomem

Naší hypotézou bylo:

Metody kultivace DC z periferních monocytů pacientů vhodných k imunoterapii musí vést k indukci imunitní reakce in vitro proti nádorovým antigenům.

3.2 Imunoterapie pomocí dendritických buněk u pacientů s karcinomem prostaty

Jednotlivé úkoly řešené v průběhu experimentu:

- Stanovení optimálního aktivačního činidla pro maturaci dendritických buněk v GMP podmínkách
- Ověření počtů regulačních T lymfocytů v krvi pacienta s karcinomem prostaty a možnosti jejich ovlivnění
- Ověření in vitro přítomnosti tumor specifických cytotoxických T lymfocytů v krvi pacienta po aplikaci vakcíny a sledovat kinetiku odpovědi

Naší hypotézou bylo:

Dendritické buňky podané in vivo vyvolají imunitní reakci in vivo.

3.3 Analýza infiltrátu imunitních buněk u karcinomu ledviny

Jednotlivé úkoly řešené v průběhu experimentu:

- Stanovení zastoupení dendritických buněk, neutrofilů a regulačních T lymfocytů v krvi a nádoru pacientů s karcinomem ledviny a korelovat výsledky dle klinického stádia onemocnění

Naší hypotézou bylo:

Nádorový infiltrát se mění v průběhu progresu nádoru a má prognostický význam.

4 Materiál a metodika

4.1 Metodické aspekty přípravy buněčné imunoterapie u karcinomu ovaria a prostaty

4.1.1 Karcinom ovaria

Do studie jsme zahrnuli 26 pacientek, od kterých jsme získali vzorek krve, ascitické tekutiny a primárního tumoru. Z periferní krve jsme pomocí Ficollu izolovali periferní mononukleáry, které jsme nechali v misce adherovat v inkubátoru po dobu 2 hodin. Adherované buňky jsme kultivovali po dobu 6 dní v přítomnosti GM-CSF a IL-4. Získané nezralé dendritické buňky jsme použili v dalších fázích experimentu.

K izolaci autologních nádorových buněk jsme nedříve nádorovou tkáň rozdělili na drobné částky, které byli v přítomnosti 0,14% kolagenázy typu I a 0,01% deoxyribonukleázy disociovány. Tuto směs jsme následující den filtrovali přes 150 μ m nylonovou sítku. Ze získané buněčné suspenze nebo ascitické tekutiny jsme pomocí gradient Ficollu získali nádorové buňky, které jsme po dobu 1,5 min vystavili UV záření. Kinetiku apoptózy jsme určili na průtokovém cytometru pomocí barvení Annexinem V a propidium jodidem.

Nezralé dendritické buňky jsme po dobu 4 hodin koinkubovali s apoptotickými nádorovými buňkami. K průkazu fagocytózy jsme dendritické buňky značili HLA-DR FITC, nádorové buňky PKH-26, endosomální a lyzozomální kompartmenty jsme označili pomocí anti-LAMP-1 a anti-LAMP-3. Výsledek jsme ověřili na konfokálním mikroskopu.

U dendritických buněk jsme v různých stádiích experimentu sledovali expresi povrchových molekul HLA-DR, CD11c, CD1a, CD14, CD80, CD83 a CD86. Analýza byla provedena na přístroji FACS-Aria. Současně jsme stanovili produkci cytokinů IL-12p70, IL-10 a TNF α pomocí metody ELISA. K určení proliferace specifických T lymfocytů po stimulaci autologních lymfocytů pulzovanými zralými dendritickými buňkami jsme použili metodu ELISPOT.

4.1.2 Karcinom prostaty

Do studie s karcinomem prostaty jsme zahrnuli celkem 9 pacientů a 10 zdravých kontrol. Zaměřili jsme se na pacienty po radikální prostatektomii, kteří mají vyšší riziko recidivy, tj. musí splňovat alespoň jedno z kritérií: předoperační PSA nad 10 ng/ml, Gleasonovo skóre ≥ 7 , pozitivní chirurgické okraje nebo stadium T3 a více. Izolace a kultivace dendritických buněk byla shodná se studií s karcinomem ovaria. Z tkáně prostaty jsme však nebyli schopni izolovat dostatečné množství nádorových buněk, proto jsme se rozhodli použít buněčné linie karcinomu prostaty LNCaP a DU145. Pomocí značení Annexin V a propidium jodid jsme určili dobu nutnou k indukci apoptózy u nádorových buněk. Fagocytární aktivitu nezralých i zralých dendritických buněk jsme stanovili pomocí značeného dextranu. Fagocytózu apoptotických buněk jsme hodnotili pomocí značení dendritických buněk PKH-67 a nádorových buněk PKH-26 a následně ověřili na průtokovém cytometru i konfokálním mikroskopu. Fenotyp dendritických buněk v různých stádiích jsme určili stejným způsobem jako ve studii s karcinomem ovaria. Pomocí ELISA

metody jsme kvantifikovali produkci cytokinů IL-6, IL-1 β , TNF α , IL-10 a IL-12p70.

4.2 Imunoterapie pomocí dendritických buněk u pacientů s karcinomem prostaty

Do prvotní studie jsme po předchozím souhlasu lokální etické komise a souhlasu pacienta zařadili pacienta s metastatickým karcinomem prostaty. Z periferní krve jsme pomocí průtokové cytometrie stanovili zastoupení regulačních T lymfocytů (CD4+ CD25+ FoxP3+). Nejdříve jsme provedli in vitro experimenty, ke kterým jsme použili dodané buffy coaty. Z nich jsme negativní selekcí izolovali monocyty, které jsme následně kultivovali v Cell Gro médiu po dobu 5dní v přítomnosti GM-CSF a IL-4. K určení nejvhodnějšího maturačního činidla jsme získané nezralé dendritické buňky koinkubovali po dobu 4 hodin s poly I:C, lipopolysacharidem (LPS), nebo směsí prozánětlivých cytokinů (IL-1, IL-6, PGE2 a TNF). Takto připravené zralé dendritické buňky jsme pulzovali influenza matrix peptidem (MP) a následně jsme je přidali k autologním lymfocytům v poměru 10:1 (T lymfocyty : dendritické buňky) na 7 dní za průběžné substituce IL-2. Lymfocyty byly poté restimulovány pulzovanými dendritickými buňkami a stanovili jsme počet T lymfocytů produkujících IFN γ pomocí intracelulárního značení. Četnost influenza MP specifických T lymfocytů jsme určili pomocí barvení HLA-A2-MP tetramery. Vzorky byly analyzovány na průtokovém cytometru FACS Aria. In vitro jsme na konfokálním mikroskopu verifikovali schopnost nezralých dendritických buněk pohlcovat apoptotické nádorové buňky linie LNCaP získané

ozářením UV po dobu 10min. Pulzované nezralé dendritické buňky jsme maturovali pomocí poly I:C. Zralé dendritické buňky jsme koinkubovali s autologními T lymfocyty a následně jsme stanovili IFN γ produkující T lymfocyty. Příprava samotné vakcíny pro pacienta probíhala v GMP podmínkách. Periferní mononukleáry jsme z produktu leukaferézy pacienta izolovali pomocí gradientové centrifugace na Ficoll-Paque a poté nechali adherovat v Cell Gro médiu. V přítomnosti GM-CSF a IL-4 jsme vykultivovali dendritické buňky, které jsme poté pulzovali apoptotickými nádorovými buňkami linie LNCaP a maturovali pomocí poly I:C. U části dendritických buněk jsme stanovili expresi HLA-DR, CD11c, CD80, CD83 a CD86. Připravenou vakcínu jsme aplikovali subkutánně do inguinální a axilární oblasti. Před první aplikací jsme po dobu 7 dní podávali 50mg cyklofosfamidu denně. Před a po každé aplikaci vakcíny jsme odebrali pacientovi krev, kterou jsme využili pro stanovení specifických T lymfocytů produkujících IFN γ po restimulaci LNCaP nebo PSA pulzovanými dendritickými buňkami. Podrobnější informace jsou uvedeny v původním článku.

4.3 Analýza infiltrátu imunitních buněk u karcinomu ledviny

V rámci experimentu jsme po získání informovaného souhlasu zařadili celkem 37 pacientů s nově diagnostikovaným karcinomem ledviny a 11 zdravých kontrol. Všichni pacienti podstoupili nefrektomii nebo resekci primárního tumoru. Na základě patologického hodnocení jsme pacienty rozdělili do dvou skupin – časně (pT1 N0 M0, pT2 N0 M0) × pokročilé (všechny ostatní) stádium. Před výkonem jsme pacientům odebrali krev pro vyšetření krevního obrazu s diferencíálem a část jsme použili na další

měření. Z primárního tumoru jsme odebrali nádorovou tkáň, která byla homogenizována a filtrována přes 170 μ m nylonové sítko. V periferní krvi i nádorové tkáni jsme poté stanovili zastoupení dendritických buněk, regulačních T lymfocytů a neutrofilů. Dendritické buňky jsme definovali jako CD45+ HLA-DR+ Lineage- CD14-. Myeloidní dendritické buňky byly CD11c+, plasmacytoidní dendritické buňky byly CD123+. Stav maturace jsme ověřili pomocí CD83. Regulační T lymfocyty jsme v našich experimentech definovali jako CD25+ CD4+ FoxP3+ a neutrofilů jako CD45+ CD14- CD65+. Exprese povrchových molekul byla stanovena pomocí průtokového cytometru FACS Aria.

5 Výsledky

5.1 Metodické aspekty přípravy buněčné imunoterapie u karcinomu ovaria a prostaty

5.1.1 Karcinom ovaria

Nádorové buňky se nám podařilo izolovat z ascitické tekutiny nebo primárního tumoru. Sledovali jsme, jak UV záření vyvolává apoptózu nádorových buněk. Jako optimální pro největší výtěžnost apoptotických nádorových buněk je doba 24hod po ozáření. Dále jsme z periferních mononukleárních buněk po kultivaci v přítomnosti IL-4 a GM-CSF izolovali nezralé dendritické buňky. Takto připravené nezralé dendritické buňky jsme kokultivovali s apoptotickými nádorovými buňkami, kdy doba 4 hodin kokultivace se jevila jako nejvýtěžnější. Přítomnost apoptotických tělísek v endosomálním kompartmentu jsme úspěšně prokázali na konfokálním mikroskopu. Maturace pulzovaných dendritických buněk

pomocí poly I:C je účinná. Na dendritických buňkách jsme v jednotlivých stádiích sledovali intenzitu exprese MHC-II (HLA-DR), maturačního znaku CD83 a kostimulačních molekul CD80 a CD86. Zralé dendritické buňky ve srovnání s nezralými signifikantně více produkovaly IL-12p70 a TNF α , pulzované také o něco více IL-10. Jen maturované pulzované dendritické buňky signifikantně více indukovaly proliferaci specifických T lymfocytů (prokázáno metodou ELISPOT). Prokázali jsme schopnost produkce vakcíny a indukce specifické lymfocytární odpovědi in vitro. Podrobnější postup i výsledky jsou uvedeny v příloženém původním článku.

5.1.2 Karcinom prostaty

Na průtokovém cytometru jsme pozorovali expresi povrchových molekul, které charakterizují takto vykultivované dendritické buňky – HLA-DR+, CD11c+ a CD14-, a také molekuly charakterizující jejich maturační stav – CD83, CD80 a CD86. V našem souboru měly nezralé dendritické buňky expresi HLA-DR, CD11c, nízkou expresi CD80 a CD86 a neexprimovaly CD83 a CD14. U maturovaných dendritických buněk byla signifikantně vyšší exprese kostimulačních molekul CD80 a CD86, HLA-DR a byla přítomna molekula CD83 typická pro zralé DC. Všechny tyto charakteristiky odpovídají fenotypu zdravých kontrol. Rozdíl mezi pacienty a zdravými kontrolami nebyl statisticky významný. V našem souboru dendritické buňky vykazují fagocytární aktivitu odpovídající stupni maturace (vysoká u nezralých dendritických buněk, nízká u zralých dendritických buněk), což je jedním z hlavních předpokladů pro úspěšnou pulzaci dendritických buněk nádorovým antigenem. Rozdíl mezi fagocytární aktivitou dendritických buněk pacientů a zdravých kontrol byl

statisticky nevýznamný. Maturované dendritické buňky produkují velké množství cytokinů IL-12, IL-1 β , IL-6, TNF α a IL-10 na rozdíl od nezralých, jež mají omezenou produkci, případně žádnou. Tato pozorování jsou v souladu s výsledky u zdravých kontrol. V další části experimentu jsme zjistili, že buňky nádorových linií LNCaP a DU145 jsou značně odolné proti UV záření a na jejich usmrcení je potřeba doba ozáření alespoň 5 minut. Fagocytózu apoptotických nádorových buněk nezralými dendritickými buňkami se nám podařilo prokázat na průtokovém cytometru i konfokálním mikroskopu.

5.2 Imunoterapie pomocí dendritických buněk u pacientů s karcinomem prostaty

V této studii jsme se věnovali optimalizaci přípravy vakcíny pro pacienty s karcinomem prostaty v GMP podmínkách. Jako nejlepší medium pro kultivaci dendritických buněk z periferních mononukleárů v těchto podmínkách se osvědčilo medium Cell Gro. Ke stanovení nejlépe vyhovujícího maturačního činidla byly nezralé dendritické buňky nejdříve maturovány v přítomnosti poly I:C, lipopolysacharidu, nebo směsí IL-1, IL-6, TNF a PGE2. Takto připravené zralé dendritické buňky byly následně pulzovány influenza matrix peptidem. Po kokultivaci a následné restimulaci s autologními T lymfocyty jsme zjistili, že maturace dendritických buněk pomocí poly I:C vede k nejvyšší proliferaci specifických T lymfocytů. U našeho pacienta jsme detekovali vyšší podíl regulačních T lymfocytů v krvi než u zdravých kontrol. Pomocí aplikace nízkých dávek cyklofosfamidu po dobu 7 dní jsme dokázali snížit množství

regulačních T lymfocytů v krvi pacienta. V další fázi přípravy vakcíny jsme nezralé dendritické buňky pulzovali nádorovými antigeny ve formě apoptotických nádorových tělísek z linie LNCaP indukovaných UV ozářením. Takto připravené dendritické buňky in vitro zvyšovaly 5× detekci specifických T lymfocytů po restimulaci. Proliferaci specifických T lymfocytů jsme také stanovili u našeho pacienta in vivo po několika dávkách vakcíny. Došlo jak k proliferaci specifických T lymfocytů zaměřených proti dendritickým buňkám pulzovaným LNCaP, ale také proti PSA. Dále jsme sledovali klinický vývoj onemocnění pacienta, jehož přežití delší než očekávané bylo pozitivním stimulem k iniciaci klinických studií u pacientů s karcinomem prostaty v různých stádiích onemocnění. Podrobný postup přípravy a výsledky jsou uvedeny v článku.

5.3 Analýza infiltrátu imunitních buněk u karcinomu ledviny

V našem případě jsme se zaměřili na pacienty s tumorem ledviny, který je výborným zdrojem nádorové tkáně pro charakterizaci imunitních buněk v nádorovém infiltrátu. Počty dendritických buněk byly vyšší v krvi pacientů než u zdravých kontrol. V časném stádiu větší procento dendritických buněk v krvi exprimovalo maturationální marker CD83, ale také jsme pozorovali vyšší zastoupení plasmacytoidních dendritických buněk v nádorovém infiltrátu. Počty neutrofilů v krvi pacientů byly vyšší než u zdravých kontrol. V pozdních stádiích stoupal počet infiltrujících neutrofilů v nádorové tkáni. Rozdíl v zastoupení regulačních T lymfocytů v nádorech jsme však mezi oběma skupinami nepozorovali. Nicméně pacienti měli vyšší počet regulačních T lymfocytů v krvi než zdravé kontroly. Tato práce je součástí výzkumného projektu zaměřeného na analýzu imunitního

infiltrátu nádoru ve vztahu k prognóze onemocnění. Poznatky mohou v budoucnu sloužit k individualizaci protinádorové léčby včetně imunoterapie. Podrobný postup i výsledky jsou popsány a diskutovány v příloženém článku.

6 Diskuze

V rámci studií přípravy buněčné imunoterapie u karcinomu ovaria i prostaty jsme se rozhodli použít dendritické buňky derivované z monocytů (moDC) získaných z periferní krve pacientů. Na rozdíl od jiných metod [9, 10] jsme tímto způsobem schopni poměrně jednoduše získat větší množství nezralých dendritických buněk. I když jejich funkce nemusí plně odpovídat přirozeně se vyskytujícím dendritickým buňkám [11, 12], v našich studiích jsme prokázali, že nezralé moDC mají vyšší fagocytární aktivitu, pohlcují apoptotické nádorové buňky a po vystavení maturačnímu činidlu dozrávají. K pulzaci moDC jsme se rozhodli použít apoptotické nádorové buňky, které jsou zdrojem většího počtu potenciálních nádorových antigenů než definované proteiny nebo peptidy. Jejich výhodou je ve srovnání s nádorovými lyzáty indukce vyšších počtů specifických T lymfocytů [13].

K aplikaci u pacienta s metastatickým karcinomem prostaty jsme se rozhodli použít zralé dendritické buňky, které sice po maturaci ztrácejí schopnost fagocytózy, ale prokazatelně více exprimují kostimulační molekuly, cestují do lymfatických uzlin [14] a indukují specifickou T lymfocytární odpověď in vivo. K maturaci moDC jsme si vybrali činidlo poly I:C na rozdíl od jiných autorů, kteří používají koktejl IL-1, IL-6, TNF a PGE2

[15]. Poly I:C v naší studii lépe indukovalo expanzi specifických T lymfocytů a vede k nejmenší proliferaci regulačních T lymfocytů, které in vivo potlačují specifickou protinádorovou odpověď. Ke zvýšení účinnosti vakcíny jsme se rozhodli před podáním první vakcíny aplikovat nízké dávky cyklofosfamidu, což vedlo ke snížení regulačních T lymfocytů v periferní krvi pacienta. Imunoterapii jsme u pacienta kombinovali s chemoterapií (Docetaxel) z důvodu udržení, lépe snížení nádorové zátěže, nicméně bylo nutné pečlivě sledovat restituci imunitního systému pro správné načasování další dávky vakcíny.

V poslední studii zaměřené na studium infiltrujících imunitních buněk jsme prokázali, že pacienti s pokročilými stádii světlobuněčného karcinomu ledviny mají jiné složení nádorového infiltrátu (vyšší počty neutrofilů a nižší počty plasmacytoidních dendritických buněk). Publikované výsledky u jiných nádorů i karcinomu ledviny jsou různé [16-18], někdy protichůdné. Imunitní reakce se u jednotlivých typů nádorů liší, a proto bude nutné u nich do budoucna lépe definovat funkční charakteristiku a interakce imunitních buněk v závislosti na histologii a klinickém stádiu nádoru. Tyto poznatky můžeme poté aplikovat v protinádorové imunoterapii.

7 Závěr

Ve své práci jsem do problematiky imunologie nádorů urogenitálního systému přispěl těmito poznatky: realizovali jsme studii proveditelnosti imunoterapie DC u pacientek s karcinomem ovaria a pacientů s karcinomem prostaty. Dendritické buňky připravené z monocytů těchto pacientů jsou funkční, mají vysokou fagocytární aktivitu, pohlcují apoptotické nádorové buňky, po maturaci exprimují znaky zralých

dendritických buněk. U pacientek s karcinomem ovaria indukují specifické T lymfocyty. Optimalizovali jsme čas UV ozáření pro indukci apoptózy u nádorových buněk. Experimentální metody optimalizované v rámci řady laboratorních pokusů se nám podařilo převést do podmínek správné výrobní praxe (GMP), což je podmínkou k aplikaci in vivo pacientům. U prvního pacienta, kterému byl přípravek buněčné terapie aplikován, jsme byli schopni detekovat in vivo specifické T lymfocyty proti nádorovým antigenům prostaty a potenciální klinický efekt. V poslední části mé práce u karcinomu ledviny jsme stanovili zastoupení jednotlivých buněčných populací v nádoru a periferní krvi. Tato studie je součástí výzkumného projektu zaměřeného na analýzu imunitního infiltrátu nádoru a imunitních parametrů v periferní krvi ve vztahu k prognóze onemocnění. Poznatky získané v tomto výzkumu mohou v budoucnu sloužit k individualizaci protinádorové léčby včetně imunoterapie.

Rozvoj vědy i techniky v poslední době umožnil podrobné studium a lepší porozumění imunitnímu systému, a to nejen v rámci fyziologických procesů, ale také patologických. Nezdá se, že některých nových imunoterapeutických procesů často vede k objasnění příčiny selhání, a tím dále posouvá naše znalosti ohledně interakce nádoru s imunitním systémem. Dnes již částečně chápeme, že interakce mezi nádorovými a imunitními buňkami se v průběhu růstu nádoru mění, že buňky imunitního systému dokážou zpočátku nádorovým buňkám vzdorovat, nicméně nádorové mikroprostředí si v pozdějších stádiích imunitní buňky přizpůsobí tak, že růst i metastazování nádoru spíše podporují. Proto hlavně v pozdějších stádiích je třeba nejdříve přesně definovat roli imunitních buněk v nádoru a až poté se můžeme pokusit imunitní systém

stimulovat k eliminaci tumoru. Imunoterapie šitá na míru pacientovi je dle mého názoru budoucností léčby nádorových onemocnění.

8 Použitá literatura

1. Tannock, I.F., et al., *Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer*. N Engl J Med, 2004. **351**(15): p. 1502-12.
2. Ozols, R.F., et al., *Focus on epithelial ovarian cancer*. Cancer Cell, 2004. **5**(1): p. 19-24.
3. Motzer, R.J., et al., *Phase III trial of interferon alfa-2a with or without 13-cis-retinoic acid for patients with advanced renal cell carcinoma*. J Clin Oncol, 2000. **18**(16): p. 2972-80.
4. Stiff, P.J., C. Czerlanis, and M.L. Drakes, *Dendritic cell immunotherapy in ovarian cancer*. Expert Rev Anticancer Ther, 2013. **13**(1): p. 43-53.
5. de Bono, J.S., et al., *Abiraterone and increased survival in metastatic prostate cancer*. N Engl J Med, 2011. **364**(21): p. 1995-2005.
6. Scher, H.I., et al., *Antitumour activity of MDV3100 in castration-resistant prostate cancer: a phase 1-2 study*. Lancet, 2010. **375**(9724): p. 1437-46.
7. Kantoff, P.W., et al., *Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer*. N Engl J Med, 2010. **363**(5): p. 411-22.
8. Jonasch, E., et al., *Vaccination of metastatic renal cell carcinoma patients with autologous tumour-derived vitespen vaccine: clinical findings*. Br J Cancer, 2008. **98**(8): p. 1336-41.
9. Ding, Y., et al., *FLT3-ligand treatment of humanized mice results in the generation of large numbers of CD141+ and CD1c+ dendritic cells in vivo*. J Immunol, 2014. **192**(4): p. 1982-9.
10. Maraskovsky, E., et al., *In vivo generation of human dendritic cell subsets by Flt3 ligand*. Blood, 2000. **96**(3): p. 878-84.
11. Shortman, K. and Y.J. Liu, *Mouse and human dendritic cell subtypes*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(3): p. 151-61.
12. Osugi, Y., S. Vuckovic, and D.N. Hart, *Myeloid blood CD11c(+) dendritic cells and monocyte-derived dendritic cells differ in their*

- ability to stimulate T lymphocytes. Blood, 2002. 100(8): p. 2858-66.*
13. Scheffer, S.R., et al., *Apoptotic, but not necrotic, tumor cell vaccines induce a potent immune response in vivo. Int J Cancer, 2003. 103(2): p. 205-11.*
 14. De Vries, I.J., et al., *Effective migration of antigen-pulsed dendritic cells to lymph nodes in melanoma patients is determined by their maturation state. Cancer Res, 2003. 63(1): p. 12-7.*
 15. Lee, A.W., et al., *A clinical grade cocktail of cytokines and PGE2 results in uniform maturation of human monocyte-derived dendritic cells: implications for immunotherapy. Vaccine, 2002. 20 Suppl 4: p. A8-A22.*
 16. Dadabayev, A.R., et al., *Dendritic cells in colorectal cancer correlate with other tumor-infiltrating immune cells. Cancer Immunol Immunother, 2004. 53(11): p. 978-86.*
 17. Iwamoto, M., et al., *Prognostic value of tumor-infiltrating dendritic cells expressing CD83 in human breast carcinomas. Int J Cancer, 2003. 104(1): p. 92-7.*
 18. Ambe, K., M. Mori, and M. Enjoji, *S-100 protein-positive dendritic cells in colorectal adenocarcinomas. Distribution and relation to the clinical prognosis. Cancer, 1989. 63(3): p. 496-503.*

9 Seznam řešených grantů a vlastních publikací

Granty:

- GA UK 54/2005
Vliv interakce nádorovou buňkou na charakteristiky dendritických buněk u pacientů s karcinomem prostaty.
Effescst of interaction with a tumour cell on characteristics of dendritic cells from patients with prostate carcinoma.
2005-2006
- GA UK 7753/2007
Studium interakce dendritických buněk a lymfocytů pacientů se solidními nádory reprodukčního a vylučovacího traktu.
Examination of interaction of patients' dendritic cells and lymphocytes with solid tumors of reproductive and urinary system.
2007-2009

- VZ MSM 0021620812
Chronická onemocnění vznikající na podkladě nepřiměřené reaktivity imunitního systému, jejich patogeneze a možnosti včasné diagnostiky a léčby.
Chronic diseases originated from inappropriate reactivity of immune system, their pathogenesis and possibilities of their early diagnosis and treatment.
2005-2011

Původní články s IF související s disertací:

- Tobiášová Z, Pospíšilová D, Miller AM, Minárik I, Sochorová K, Spísek R, Rob L, Bartůňková J. In vitro assessment of dendritic cells pulsed with apoptotic tumor cells as a vaccine for ovarian cancer patients. Clin Immunol. 2007 Jan;122(1):18-27. **IF 3.551**
- Rozková D, Tiserová H, Fucíková J, Last'ovicka J, Podrazil M, Ulcová H, Budínský V, Prausová J, Linke Z, Minárik I, Sedivá A, Spísek R, Bartůňková J.. FOCUS on FOCIS: combined chemo-immunotherapy for the treatment of hormone-refractory metastatic prostate cancer.. Clinical Immunology, 2009, sv. 131, s. 1–10. **IF 3.606**
- Minárik I, Lašťovička J, Budínský V, Kayserová J, Spíšek R, Jarolím L, Fialová, A, Babjuk M, Bartůňková J. Regulatory T cells, dendritic cells and neutrophils in patients with renal cell carcinoma. Immunol Lett. 2013 May;152(2):144-50. **IF 2.337**

Přehledové články související s disertací:

- Minárik I., Dendritic cell vaccines for prostate cancer. Polish Journal of Urology, 2007, sv. 60, s. 133–137. ISSN 0500-7208

Abstrakta související s disertací:

- I Minarik, Z Tobiasova, R Spisek, J Bartunkova, I Kawaciuk. Phenotype and function analysis of dendritic cells from patients after radical prostatectomy for prostate carcinoma. 7th EFIS Tatra Immunology Conference, 24.-28.6.2006. Štrbské Pleso, Slovakia.
- Z Tobiasova, D Pospisilova, I Minarik, R Spisek, L Rob, J Bartunkova. DC-based immunotherapy in patients with ovarian cancer – in vitro studies. 7th EFIS Tatra Immunology Conference, 24.-28.6.2006. Štrbské Pleso, Slovakia.
- I Minarik, Z Tobiasova, I Kawaciuk, J Bartunkova. Charakteristika funkce a fenotypu dendritických buněk pacientů po radikální prostatektomii pro karcinom prostaty. Česká urologie, 2006, p. 87. (Výroční konference České urologické společnosti ČLS JEP 11.-13.října 2006)
- I Minarik, Z Tobiasova, I Kawaciuk, J Bartunkova. Phenotype and function analysis of dendritic cells from patients after radical prostatectomy for prostate carcinoma. European Urology Meetings 2006; 1(1): 129.
- Minárik, Ivo. Vakcína z dendritických buněk pro nemocné s karcinomem prostaty. In Abrahámová Jitka. Vybrané otázky onkologie XI.. Praha: Galén, 2007. s. 93–98.
- Minárik Ivo, Tobiášová Zuzana, Kawaciuk Ivan, Bartunkova Jirina. Phenotype and function analysis of dendritic cells from patients with prostate carcinoma after radical prostatectomy, FOCIS 2007, San Diego, USA
- Minárik, Ivo. Zastoupení populací dendritických buněk v periferní krvi a nádoru u pacientů s karcinomem ledviny. Sjezd ČSAKI 2008, Praha
- Minárik, Ivo. Vakcína z dendritických buněk pro pacienty s karcinomem prostaty. Výroční konference ČUS, 10/2008, Hradec Králové, přednáška

- Minárik, Ivo. Preparation of dendritic cell vaccine in patients with prostate cancer and its in vitro efficacy. European Urology Meetings 2008; 3(10):148
- Minárik, Ivo. Charakteristika dendritických buněk a zastoupení regulačních T-lymfocytů v krvi a nádorové tkáni u pacientů se světllobuněčným karcinomem ledviny - přednáška na výročním sjezdu ČUS JEP, 2009. Praha
- Minárik, I., Lašťovička, J., Budínský, V., Kawaciuk, I., Bartůňková, J. Characteristics of dendritic cells and regulatory T-lymphocytes in the blood and tumor tissue in patients with renal cell carcinoma. European Urology Supplements. 2009 April; 8(8):676-677.
- Minárik, R. Horváth, M. Podrazil, H. Hromádková, P. Dušek, L. Jarolím, M. Babjuk, J. Bartůňková. Phase I/II of clinical study of prostate cancer immunotherapy using dendritic cell vaccination strategy – first results. European Urology Supplements. 2010 September; 9(6): 629
- Minárik I., Horváth R., Podrazil M., Hromádková H., Špišek R., Dušek P., Jarolím L., Babjuk M., Bartůňková J. Fáze I/II klinické studie imunoterapie karcinomu prostaty pomocí vakcinace dendritickými buňkami – první výsledky. Ces Urol 2010; 14(4): 26
- Minárik I., Špišek R., Podrazil M., Dušek P., Jarolím L., Bartůňková J., Babjuk M. Klinické studie fáze I/II imunoterapie dendritickými buňkami u pacientů s biochemickou recidivou a hormon refrakterním karcinomem prostaty – výsledky po 1 roce. Ces Urol 2011; 15(Suppl 2):63
- I. Minárik, J. Lašťovička, V. Budínský, J. Kayserová, R. Špišek, L. Jarolím, A. Fialová, M. Babjuk and J. Bartůňková. Regulační T lymfocyty, dendritické buňky a neutrofilů u pacientů s renálním karcinomem. Ces Urol 2013; 17(Suppl 1), 22.
- Jarolím L., Špišek R., Podrazil M., Babjuk M., Fučíková J., Fialová A., Minárik I., Hromádková H., Bartůňková J.: Klinická studie imunoterapie fáze I/II pomocí dendritických buněk u nemocných

s karcinomem prostaty a biochemickou recidivou. Klinická urológia 2013; 9: 10.

- Špíšek R., Podrazil M., Babjuk M., Jarolím L., Fučíková J., Fialová A., Minárik I., Hromádková H., Bartůňková J.: Klinické studie fáze I/II imunoterapie pomocí dendritických buněk u pacientů s biochemickým relapsem karcinomu prostaty. Journal of Clinical Oncology 2013; 5: 65.
- Jarolím L., Špíšek R., Podrazil M., Babjuk M., Fučíková J., Fialová A., Minárik I., Hromádková H., Bartůňková J.: Phase I/II clinical trials of dendritic cell-based immunotherapy in patients with the biochemical recurrence of the prostate cancer. Urology 2013; 82 (3 Suppl 1): S30.
- Minárik I., Laštovička J., Budinský V., Kayserová J., Špíšek R., Jarolím L., Fialová A., Babjuk M., Bartůňková J.: Regulatory T lymphocytes, dendritic cells and neutrophils in patients with renal cell carcinoma. Eur Urol Suppl 2013;12:e1112
- Jarolím L., Špíšek R., Podrazil M., Babjuk M., Fučíková J., Fialová A., Minárik I., Hromádková H., Bartůňková J.: Dendritic cell-based immunotherapy in patients with rising PSA after radical prostatectomy or salvage radiotherapy (phase I/II clinical trials). Eur Urol Suppl 2013;12:e1264.
- Jarolím L., Špíšek R., Podrazil M., Babjuk M., Fučíková J., Fialová A., Minárik I., Hromádková H., Bartůňková J.: Imunoterapie pomocí dendritických buněk u nemocných s elevací PSA po radikální prostatektomii nebo salvage radioterapii. Česká urologie 2013; 17 (Suppl. 1): 54.
- Jarolím L., Špíšek R., Podrazil M., Babjuk M., Fučíková J., Fialová A., Minárik I., Hromádková H., Bartůňková J.: Long-term immunotherapy by dendritic-cells based vaccine in patients with PSA-recurrent prostate cancer. Eur Urol Suppl 2014;13:e872.

Původní články s IF nesouvisející s disertací:

- Vesely S, Jarolim L, Schmidt M, Minarik I, Dusek P, Babjuk M. Parameters derived from the postoperative decline in ultrasensitive PSA improve the prediction of radical prostatectomy outcome. World J Urol. 2013 Apr;31(2):299-304. **IF 2.888**