

## **Posudek na disertační práci PharmDr. Jitky Fučíkové „Imunogenní buněčná smrt a její aplikace v imunoterapeutických podmínkách“**

Předložená disertační práce PharmDr. Jitky Fučíkové vychází z výtečných tradic laboratoře a je na ní patrna také zkušenost a lze říci i vědecká proslulost, jejího školitele, Doc. MUDr. Radka Špíška, PhD. Vychází ze tří velmi dobrých zahraničních publikací, i když v seznamu jsou uvedeny již čtyři. U dvou z nich je kandidátka první autorkou.

Recentní publikace je věnována podrobnému imunoterapeutickému protokolu přípravy dendritických buněk (DC) vhodných pro DC vakcínu. V první řadě bylo ověřeno nejvhodnější medium pro kultivaci nezralých DC vhodných pro příjem dostatečného množství antigenu a také aktivací signály, kterými se z nezralých DC stávají jejich zralé formy schopné účinně prezentovat antigen a navodit tak antigen-specifickou imunitní reakci. Autorka ze dvou možných jako lepší vybírá CellGro medium a směs GM-CSF a IL-4 jako cytokinů vhodných pro přípravu dostatečného množství nezralých, intenzivně fagocytujících DC buněk. Pro indukci jejich následného vyžívání jako profesionálních antigen-prezentujících buněk (APC) pak srovnávala LPS, polyI:C a směs prozánětlivých cytokinů (IL-1, IL-6, TNF a PGE<sub>2</sub>). Schopnost aktivovaných DC navodit antigen-specifickou T odpověď pak testovala pomocí modelových antigenů schopností T lymfocytů uvolňovat IFN $\gamma$ . Poslední otázkou bylo, který protokol povede k nejnižší proliferaci/indukci Treg. Závěr práce je jasný. Pro přípravu klinicky použitelné DC vakcíny jsou nejvhodnější DC připravené v CellGro mediu, namnožené vlivem GM-CSF a IL-4 cytokinů a vyžalé pomocí polyI:C.

Další práce potvrzuje dřívější pozorování Obeida, Zitvogelové, Apetoha, Panaretakise a dalších o imunogenní apoptóze nádorových buněk. Nově ji prokazuje i u vybraných lidských nádorových linií a primárních nádorových buněk izolovaných při resekci nádorů vaječníků ovšem pouze tehdy jsou-li vystaveny antracyklinům (doxorubicin, idarubicin). Proto správně uzavírá, že i lidské nádorové buňky zabité antracykliny mohou navodit tumor-specifickou imunitní reakci. Kromě antracyklinů bylo testováno UV záření, etoposid, gemcitabin pro REH linii (T-ALL), UV záření, gemcitabin, etoposid, cyklofosfamid, cisplatina a ifosfamid pro OV 90 linii (karcinom ovaria) a UV záření, leuprorelin a etoposid pro DU145 linii (nádor prostaty). Pouze antracykliny vyvolávaly translokaci kalretikulinu (CRT), HSP70 a HSP90 a jejich expresi na povrchu nádorových buněk stejně tak jako sekreci HMGB1 alarminu. Nádorové buňky usmrcené antracykliny byly také rychleji a ve větší míře fagocytovány. Kromě toho došlo

k zvýšené expresi CD83, CD86 a HLA-DR a k tvorbě většího množství nádorově specifických CD4+ a CD8+ T buněk produkujících IFN $\gamma$ . Nebyl pozorován rozdíl v inhibiční aktivitě Treg.

V další publikaci, věnované kombinované chemo-imunoterapii, je kandidátka jedním z 13 spoluautorů. Jde o kazuistiku, pacienta s hormon-neodpovídajícím metastatickým nádorem prostaty, u kterého byla využita pracovištěm vyvíjená DC vakcína. Současně s DC vakcínou byla kontinuálně podávána paliativní chemoterapie, a to docetaxel. U vážně nemocného pacienta došlo k výraznému (i když dočasnému) zlepšení jeho zdravotního stavu potvrzeného laboratorními výsledky a k více než devadesátiprocentnímu snížení hladiny PSA.

Ke kandidátce mám několik otázek. A to a) jaký je současný (světový) stav výsledků po podání DC vakcíny u pacientů trpících nádorem prostaty a jak je to u jiných diagnóz, b) v čem je pražská vakcína lepší než schválená americká vakcína, c) jak se procentuálně v průměru snižují Treg buňky po podání metronomického cyklofosfamidu, d) DC vakcína spoléhá na aktivovatelnost imunitního systému pacienta. Jak může být tento stav ovlivněn současně podávanou chemoterapií, například u pacienta, jehož kazuistika byla předmětem jedné z publikací, e) u stejné publikace mám další otázku. Jaká byla pravděpodobnost, že antigeny použité prostatické nádorové linie LNCap měly stejné imunodominantní epitopy jako nádor pacienta a podle mě základní otázka která s tím vším souvisí, f) jak jsou vybírání potenciální příjemci DC vakcíny, jaké parametry imunitního systému jsou důležité.

Disertace se bohužel nevyhýbá celé řadě formálních chyb. Tak především je potřeba se rozhodnout, zda dochází k obhajobě disertace (autoreferát, obálka) nebo dizertace (stránky 1 a 2). FDA není Food and Drug Association and Food and Drug Administration (str.6). Původní autor myšlenky a později i práce o imunitním dohledu je Sir MacFarlane Burnet, pozdější nositel Nobelovy ceny, a to nejenom v citované práci z roku 1970, ale dokonce o 13 let dříve (1957). Kandidátka tuto hypotézu uvádí špatně pod jmény Thomas a Burnet. Také bych ráda upřesnila, že William B. Coley podal v roce 1891 streptokoky pacientovi s inoperabilním nádorem a podobný princip potom aplikoval asi u 1000 pacientů. Jeho směs, *de facto* prvních popsanych imunomodulačních látek, byla a je dosud nazývána „Coley's Toxins“. Na str. 10 je vhodné uvést u Cancer immune Editing všechno s velkými písmeny. Nedá se říci, že něco vedlo k rychlé implantaci (str. 10), ale správně k rychlému rozvoji **po** implantaci. Na str. 11 je nesprávně konstatováno, že výsledkem stadia rovnováhy jsou tři různé situace. Správně je, že imunoeditace má tři různá stadia. Část úvodu věnovaná zánětu (2.3) je velmi zjednodušená. To ovšem bohužel do určité míry platí o celém úvodu. Citace jsem kontrolovala jen namátkově a to jen ty, které mi nějak zajímaly. Ale například chybí citace Dudley a Roopenian (1996). Opakuje se chybné slovo crosprezentace. Tak buď je to anglicky, pak je to cross-prezentace a nebo je nutné použít český překlad nebo popsání funkce. Také slovo manuskript je poměrně ošklivé. Máme krásné české slovo rukopis. Kandidátka je velice mladá, a tak lze omluvit nikoliv neupozornit na to, že Paul Ehrlich nemohl něco zmínit v osmdesátých letech minulého století...to už byl totiž dávno mrtvý. Obr. 4 a řada dalších je převzatá což je v pořádku, co v pořádku není je to, že nejsou dobře popsány. Není správně mluvit o imunogenicitě klinicky aplikovaných chemoterapeutik. Jde o imunogenicitu nádorových buněk na které tato chemoterapeutika působí. Kromě toho je tam zbytečně mnoho překlepů a také citace by měly být psány jednotně. Buď jsou všechny podrobné, tj. včetně měsíce kdy článek vyšel, nebo to není nikde.

Závěrem bych ráda zdůraznila, že výsledky autorky, které jsou nedílnou součástí práce celé laboratoře mohou a asi i budou mít v budoucnu významné aplikační výstupy. Také nemám pochyb o tom, že kandidátka je talentovanou vědeckou pracovnící se schopností samostatně řešit tvůrčí otázky, a proto doporučuji, aby jí byl udělen titul **Ph.D.**

25. ledna 2012

Prof. RNDr. Blanka Říhová, DrSc.