

V Praze dne 19. 1. 2012

Oponentský posudek na disertační práci PharmDr. Jitky Fučíkové „Imunogenní buněčná smrt a její aplikace v imunoterapeutických protokolech“

Tématem práce jsou buněčné vakcíny na bázi dendritických buněk, jejich příprava pro klinické využití a hlavní problematika jejich použití v kombinované chemoimunoterapii nádorů v pokročilém stádiu onemocnění. Práce je do určité míry metodická. Byla optimalizována příprava lidských dendritických buněk z monocytů z periferní krve podle podmínek správné laboratorní praxe a příprava protokolu pro klinické využití. Ve druhé části práce se autorka zabývá problematikou indukce imunogenní smrti nádorových buněk různými klinicky používanými cytostatiky. Tato část přinesla prioritní výsledky. Bylo zjištěno na modelech lidských nádorových buněk, že antracykliny mají schopnost indukovat imunogenní buněčnou smrt spojenou s translokací molekul kalretikulinu, HSP70 a 90 a HMGB1 na povrch buněk. Dále bylo prokázáno, že antracykliny ošetřené nádorové buňky jsou fagocytovány dendritickými buňkami a indukují jejich maturaci. Ve zbytku práce byl popsán případ imunoterapie hormon-refrakterního metastatického nádoru prostaty.

Disertační práce byla vypracována formou, kdy základ tvoří publikované nejdležitější články doplněné dle kladným úvodem a krátkým závěrem. Součástí práce jsou také komentáře výsledků z jednotlivých článků a přehled literatury, kde je uvedeno více než 120 citací. Výsledky byly publikovány ve třech uvedených pracích, z nichž dvě z nich je J. Fučíková prvním autorem.

Připomínky k jednotlivým částem práce

Teoretická část. V teoretické části je na třiceti stranách podán logický literární přehled problematiky a jsou uvedeny cíle práce. Je podán stručný úvod o souasných představách o roli imunitního systému v obraně proti nádorům a jejich historickému vývoji, dále charakteristika nádorových buněk a jejich interakcí s imunitním systémem. Dále je kladen na teoretický úvod k experimentálním pracím, tj. na imunogenní buněčnou smrt a na imunoterapii dendritickými buňkami. Chybí pouze zmínka o imunosupresi a T regulačních buňkách.

Experimentální část. Experimentální část práce (výsledky a diskuse) tvoří kopie tří publikací doplněné stručným úvodem a komentáři. V první části (rukopis práce Fučíková et al., Journal of Translational Medicine, 2011) byl úspěšně vypracován protokol pro přípravu dendritických buněk z lidských monocytů a optimalizován výběr kultivačního média. Zajímavé výsledky byly získány ze srovnání fenotypu dendritických buněk maturovaných smíšenými cytokiny nebo poly I:C. Přestože exprese sledovaných aktivních molekul na povrchu dendritických buněk byla nejvyšší na dendritických buňkách maturovaných smíšenými cytokiny, nejvyšší schopnost aktivovat expanzi specifických T buněk měly dendritické buňky maturované poly I:C. Zároveň dendritické buňky maturované smíšenými cytokiny indukovaly v těsné blízkosti T regulačních buněk. Bylo by zajímavé doplnit analýzy v této práci také kvantifikací cytokinů, zvl. IL-12, produkovaných jednotlivými preparáty dendritických buněk. Nižší

schopnost dendritických bun k maturovaných sm sí cytokin aktivovat efektorové T bu ky a zároveň vyšší schopnost indukovat T regula ní bu ky by mohla být dána jejich deficitem v produkci IL-12, p ípadn dalších prozán tlivých cytokin .

Ve druhé ásti práce byla na lidských nádorových bu kách analyzována schopnost vybraných klinicky používaných cytostatik indukovat imunogenní bun nou smrt (Fucikova et al., Canc. Res. 2011). Byla získána prioritní data, d ležitá pro lepší pochopení interak cí nádorových bun k ovlivn ných cytostatiky s antigen prezentujícími bu kami, kdy bylo prokázáno, že nádorové bu ky ošet ené cytostatiky antracyklinového typu jsou fagocytovány dendritickými bu kami a dokáží indukovat maturaci dendritických bun k sm rem k ú inným antigen-presentujícíím bu kách. Tato práce je velmi d ležitá vzhledem k tomu, že byla získána klinicky relevantní data na modelech lidských nádorových bun k. Podobn jako v p edchozí studii, by bylo zajímavé doplnit experimenty analýzou produkce cytokin dendritickými bu kami, p ípadn analýzou polarizace aktivovaných T lymfocyt .

Ve t etí ásti je popsán klinický p ípad využití kombinované chemoimunoterapie hormon - refrakterního metastatického nádoru prostaty (Rožková a spol., Clin Immunol., 2009), která dokumentuje potenciál použití dendritických bun k jako terapeutické vakcíny v kombinaci s dalšími terapeutickými modalitami. Zde bylo d ležité úsp šné metronomické použití cyklofosfamidu pro snížení populace T regula ních bun k. Vzhledem k tomu, že J. Fu íková zde nebyla prvním autorem, m l by být uveden její podíl na této studii.

Záv r. Práce je dopln na stru ným záv rem, který shrnuje získané výsledky. Možná by bylo vhodné více diskutovat data z jednotlivých ástí práce ve vzájemných souvislostech.

Poznámky k formální stránce práce. Práce je jasn , p ehledn a logicky napsána s kvalitními obrázky a tabulkami s minimem p klep a chyb. N kdy se v esky psaném úvodu vyskytují anglikanismy (anglická transkripce „calreticulin“ nebo eskoanglické „crosspresentace“). V n kolika p ípadech se m nily fonty písma. U práce Fu íková et al., (J. Transl. Med.), kde je presentován rukopis, chybí ozna ení asopisu (je možné ho zjistit až z p ehledu vlastních publikací).

Dotazy k diskusi

- Práce je psána formou, kdy jsou presentovány jednotlivé publikace. Vzhledem k tomu, že u každé publikace je více spoluautor , není jasné, které ásti autorka d lala sama; mohla by autorka specifikovat sv j podíl na experimentech (publikace 2 a 3)?
- Stupe maturace dendritických bun k byl po použití jednotlivých matura ních agens sledován analýzou exprese povrchových matura ních znak (CD86, MHC II, CD83), která prokázala, že nejv tší exprese byla u dendritických bun k maturovaných sm sí cytokin , naopak funk ní studie prokázaly, že nejv tší aktiva ní efekt mají dendritické bu ky maturované poly I:C. Mohl by tento rozdíl být vysv tlen rozdílnou produkcí cytokin (IL - 12) jednotlivými preparáty DC, respektive tím, že pro plnou funk ní maturaci DC je žádoucí aktivace p es TLR?

- Může být nedostatek produkce aktivních cytokin dendritickými buňkami pulsovanými a maturovanými nádorovými buňkami, u nichž byla indukována buněčná smrt různými chemoterapeutiky, spojena s indukcí T regulačních buněk?
- V diskusi v práci Rožková a spol. je zmínka o indukce imunosupresivních CD4⁺, IL-13-produkujících buněk dendritickými buňkami? Dělali jste v nich dalších experimentech analýzu zastoupení těchto buněk a dalších imunosupresivních populací kromě T regulačních buněk, případně plánujete takové analýzy? Co je známo z literatury o fenotypu CD4⁺, IL-13-produkujících buněk, jedná se o NKT buňky druhého typu?
- Analýzy zastoupení jednotlivých populací T buněk jsou z technických důvodů prováděny v periferní krvi; jaká je podle vás korelace se skutečnou situací v mikroprostředí nádoru?

Závěr

PharmDr. Jitka Fučíková potvrdila, že je schopna samostatně v decky pracovat. Získala prioritní výsledky, které získala za použití náročnějších metodik molekulární i buněčné biologie, které byly publikovány v několika pracích ve významných mezinárodních časopisech, z nichž ve dvou byla prvním autorem. Zároveň byla její práce důležitá pro vypracování přípravy dendritických buněk pro klinické použití. Doporučuji, aby práce byla přijata jako podklad pro udělení titulu PhD.

RNDr. Milan Reiniš, CSc.