

Oponentský posudek na dizertační práci

Dendritické buňky u solidních nádorů urogenitálního systému

Autor : MUDr. Ivo Minárik, FEBU:

Předložená práce obsahuje 88 stran textu a zahrnuje 3 původní publikace v kvalitních zahraničních časopisech, u jedné z nich je Dr. Minárik prvním autorem. Součástí je dále souhrnný článek autora v polském urologickém časopise. Po stránce formální je práce napsána velmi přehledně a čtivě, bez překlepů, s názornou obrazovou dokumentací, seznam použité literatury obsahuje celkem 134 citací, převážně originálních článků v mezinárodních periodících. Práce má jasně definované cíle a publikované výsledky zapadají do předložených hypotéz. Metodika experimentů je podrobně popsána v příložených článcích a není jí věnována zvláštní kapitola. Jedná se o velmi aktuální téma, imunitní odpověď proti nádorovým buňkám a zejména možnosti buněčné imunoterapie patří ke klíčovým oblastem současné klinické imunologie.

V úvodu se autor zabývá vztahy mezi imunitním systémem a nádory a zmiňuje jak tradiční teorii immunosurveillance jako dohledu nad nádorovým bujením, tak i komplexnější pohled ve smyslu tzv. immunoeditingu, kdy dochází postupně ke ztrátě schopnosti imunitního systému kontrolovat nádorové buňky. Popsány jsou konkrétní případy mechanismů, kterými mohou nádorové buňky indukovat imunologickou toleranci a utlumit imunitní systém.

V další části práce jsou popsány jednotlivé imunitní buňky a jejich úloha v interakcích s nádorovými buňkami. V případě neutrofilních leukocytů jsou zmíněny jak N1 neutrofilie, které tvoří prozánětlivé cytokiny a směřují k eliminaci nádorových buněk, tak i N2 neutrofilie, které mají protumorózní efekt a tvorbou metaloproteináz napomáhají metastazování. Obdobná polarizace se vyskytuje i u makrofágů ve smyslu M1 a M2 subpopulací. Zmíněny jsou dále nezralé myeloidní buňky (MDSC) tlumící imunitní odpovědi a také efektorové mechanismy NK buněk vedoucí k rozpoznání a likvidaci nádorových buněk. Adekvátní prostor je věnován problematice dendritických buněk (DC), popsána je jejich diferenciaci i základní subpopulace, rozpoznávání pomocí PRR, zmíněny jsou DC, které vlivem nádorového mikroprostředí potlačí expresi

kostimulačních molekul a vedou k anergii T lymfocytů. V případě T lymfocytů jsou popsány efektorové funkce jednotlivých subpopulací i mechanismy potlačení těchto buněk pomocí cytokinů s protizánětlivým účinkem, zejména TGF beta a IL-10, které jsou v nádorech ve větší míře tvořeny. Na jejich tvorbě se kromě N2 neutrofilů, M2 makrofágů a MDSC mohou podílet i B buňky, jejichž hlavní úlohou by měla být tvorba protilátek proti nádorovým antigenům.

V další kapitole jsou popsány imunitní reakce u vybraných tumorů. U progresu karcinomu prostaty se předpokládá značný význam přítomnosti T regulačních buněk a M2 makrofágů, ale cytokiny podporující růst nádoru mohou být tvořeny i nádorovými buňkami. I u karcinomu ovaria je přítomnost T regulačních buněk a M2 makrofágů špatným prognostickým znamením a naopak přítomnost T lymfocytů tvořících IL-2 a IFN gama je pozitivním prognostickým faktorem. Další přežívání pacientek bylo popsáno také v případě, kdy byl nádor ve větší míře infiltrován B lymfocyty s cytotoxickými CD8+ T lymfocyty. Tyto výsledky jsou v kontrastu se studii u světlobuněčného karcinomu ledviny, kde je přítomnost CD8+ lymfocytů spojena s kratším přežitím a tyto buňky nevykazují požadovanou cytotoxickou aktivitu. I u renálního karcinomu se setkáme s T reg buňkami a M2 makrofágy, které zhoršují prognózu. Vzhledem k různým podtypům karcinomu ledviny jsou výsledky často kontroverzní.

Závěrečná část literárního přehledu je věnovaná imunoterapii nádorů. Zmíněny jsou historické výsledky s intravesikálním podáváním BCG u nádorů močového měchýře, podávání IFN alfa a IL-2 u renálního karcinomu i různé typy vakcin u karcinomů ovaria a prostaty, včetně možnosti imunoterapie pulzovanými dendritickými buňkami u karcinomu prostaty. Tato část disertační práce je doplněna o review článků autora otištěný v polském odborném periodiku vydávaném v angličtině. V případě léčby karcinomu ovaria je využívána k pulzaci dendritických buněk široká škála antigenů od nádorových lysátů až po purifikované proteiny či peptidy a několik klinických studií již probíhá ve fázi III.

Prvním cílem práce bylo metodické zvládnutí přípravy buněčné imunoterapie dendritickými buňkami u karcinomu ovaria a prostaty včetně ověření indukce specifické protinádorové odpovědi. Nádorové buňky byly izolovány z ascitické tekutiny nebo nádoru, pomocí UV záření u nich byla vyvolána apoptóza a poté byly vzniklé partikule využity k pulzování zralých dendritických buněk diferencovaných z periferních

monocytů. Bylo zjištěno, že takto pulzované dendritické buňky mají schopnost indukovat proliferaci a tvorbu IFN gama v autologních lymfocytech.

Dalším cílem bylo ověřit u pacientů po radikální prostatektomii pro karcinom prostaty, že pulzované dendritické buňky vyvolají imunitní reakci in vivo a ovlivní počty T regulačních buněk a tumor specifických T lymfocytů. Vzhledem k technickým problémům se získáním dostatečného množství autologních nádorových buněk byly k pulzaci dendritických buněk využity nádorové linie, takto ošetřené dendritické buňky pak 5-ti násobně zvyšovaly zastoupení specifických T lymfocytů, došlo ke klinickému zlepšení a poklesu hladiny PSA o více než 90%.

Posledním cílem práce bylo charakterizovat infiltrát imunitních buněk u karcinomu ledviny ve vztahu progresi nádoru a prognóze onemocnění. Výsledky ukázaly, že počty dendritických buněk v krvi jsou u pacientů vyšší oproti zdravým kontrolám s v časném stádiu nádoru exprimují ve větší míře CD83 současně s vyšším zastoupením plasmocytoidních DC v nádorovém infiltrátu. Také počty neutrofilů byly u pacientů s nádorem vyšší a v pozdních stádiích stoupal i jejich počet v nádorovém infiltrátu. V zastoupení T reg buněk v nádoru nebyl rozdíl mezi časným a pokročilým stadiem, v periferní krvi byly jejich počty zvýšené u pacientů s nádorem oproti zdravým.

Zásadní připomínky ke kvalitní dizertační práci nemám, pouze několik dotazů:

- 1) V literární úvodu jsou zmíněny N1 neutrofilů, které mají antitumorózní účinek, a dále N2 neutrofilů, které mají protumorózní efekt a napomáhají metastazování. Je známo, čím jsou tyto dvě odlišné populace buněk indukovány?
- 2) Když byly k pulzaci dendritických buněk využívány prostatické nádorové linie místo autologních nádorových buněk, nemohlo dojít také k indukci allospecifické odpovědi proti HLA antigenům odlišného jedince?
- 3) Ve článku v „Clinical Immunology“ z roku 2009 je prezentována kasuistika jednoho pacienta s karcinomem prostaty úspěšně léčeného vakcinací pulzovanými dendritickými buňkami. Jak velký je soubor pacientů v současnosti a jaký je klinický efekt této léčby?
- 4) V poslední přiložené práci (Immunology Letters) je ukázáno, že pacienti s karcinomem ledvin mají v krvi výrazně zvýšené zastoupení T regulačních buněk oproti kontrolní skupině. Do jaké míry se na tomto posunu mohla podílet léčba?

Závěr:

Z výše uvedeného posudku vyplývá, že předložená dizertační práce je kvalitní po obsahové i formální stránce, splnila stanovené cíle a svými výsledky přinesla nové poznatky. Autor osvědčil, že má hluboké znalosti v oboru, je schopen samostatně vědecky pracovat a ovládá metody k úspěšnému pokračování ve své vědecké činnosti.

Dizertační práce splňuje požadavky stanovené dle § 47 zákona o vysokých školách č. 111/1998 Sb., a proto **doporučuji, aby MUDr. Ivo Minárikovi, FEBU byla udělena vědecko-akademická hodnost PhD.**

V Praze 15.8. 2014

prof. MUDr. MUDr. Ilja Stříž, CSc.
Pracoviště klinické a transplantační imunologie
Institut klinické a experimentální medicíny (IKEM)
Václavská 1958/9, 140 21 Praha 4