

Posudek na diplomovou práci Bc. Markéty Skaličkové „Imunoterapie metastazujícího pankreatického adenokarcinomu řešená na dvounádorovém modelu“

Diplomová práce vychází z dlouhodobého úsilí skupiny studentů kolem Dr. Ženky vyřešit imunoterapii zhoubných nádorů. Je nepochybné, že toto úsilí je nesmírně chvályhodné, neboť rakovina představuje vedle cévních chorob hlavní příčinu úmrtí člověka.

Ženkova tak zvaná MBTA terapie je založena na kombinaci ligandu stimulujícího fagocytózu (Manan-BAM), TLR agonistů (R-848, poly (I:C) a LTA) a Anti-CD40. Tato terapie, aplikovaná intratumorálně, vede k výraznému snížení nádorového růstu a vyléčení 80% myši. Důležité je, že nádor je primárně likvidován buňkami přirozené imunity (neutrofilů) a nádorové antigeny prezentované T lymfocytům indukují protektivní adaptivní imunitu, takže vyléčené myši jsou rezistentní k retransplantaci stejného nádoru.

Problémem většiny zhoubných nádorů jsou metastázy a tak Ženkova skupina usilovně hledá terapii, která by byla schopná je ničit.

Markéta Skaličková si vybrala velmi agresivní nádor, metastazující pankreatický adenokarcinom, i když původní úspěšné pokusy s imunoterapií byly provedeny na melanomu. Jako model rozvinuté metastázy bylo vybráno dvounádorové uspořádání s tím, že jeden z nádorů byl léčen MBTA terapií a druhý představoval rozvinutou metastázu. Pro Ženkovu skupinu je charakteristické neustálé hledání preparátů, které by šlo kombinovat s MBTA terapií a tím vylepšit její účinnost. Proto Markéta Skaličková testovala MBTA terapii v kombinaci s deriváty doxorubicinu, hyaluronidázou, která měla redukovat desmoplasiu mikroprostředí pankreatického adenokarcinomu, aplikací aktivovaných neutrofilů do nádoru neléčeného MBTA terapií a konečně s protinádorovým lékem – antagonistou glutaminu, který je označován zkratkou DON. Nakonec Markéta Skaličková učinila pokus opsonizovat nádorové buňky lipoteichovou kyselinou.

Diplomová práce je rozsáhlá (celkem 90 stran) a hned na začátku musím uvést, že je velmi pěkně napsaná. V rozsáhlém úvodu (31 stran) se Markéta věnuje nádorovým onemocněním obecně, pankreatickému adenokarcinomu, principům imunoterapie, Ženkově MBTA terapii, vysvětluje význam desmoplasiu nádorového mikroprostředí v souvislosti se zamýšleným použitím hyaluronidázy. V poslední části úvodu probírá metabolismus nádorových a imunitních buněk opět v souvislosti s léčbou pomocí DON. V úvodu je zřetelná snaha zdůvodnit použití jednotlivých preparátů k terapii.

Následují čtyři cíle, které jsou jasně formulovány.

Materiál a metody jsou podrobně zpracovány, u chemikálií je uveden výrobce, je popsána příprava a kultivace buněk, ověření čistoty neutrofilů průtokovou cytometrií. Detailně je popsáno 7 experimentů zaměřených na zvýšení účinnosti imunoterapie.

Výsledky jsou podrobně popsány a ilustrovány 16 grafy vesměs popisujícími vliv terapie na velikost nádoru a přežití myši. Nechybí statistické zpracování dat.

Diskuse na 6 stranách diskutuje výsledky jednotlivých experimentů, porovnává je s výsledky jiných autorů a snaží se vysvětlit příčiny neúspěchů.

V sedmibodovém závěru autorka shrnuje, že kombinace MBTA terapie s deriváty doxorubicinu, hyaluronidázou nebo aplikací aktivovaných neutrofilů do nádoru nevedly ke zvýšení účinnosti imunoterapie podobně jako opsonizace nádorových buněk LTA. Jedinou látkou, která průkazně zvýšila efekt MBTA terapie na růst obou nádorů (léčený a metastazující) byla aminokyselina 6-diazo-5-oxo-L-norleucin (DON). Efekt se projevil jak na redukci velikosti nádoru, tak i v prodloužení přežití myši. Na dvounádorovém modelu byla však tato léčba příliš agresivní a vedla k úhynu myši brzy po zahájení léčby.

K diplomové práci mám několik drobnějších poznámek, pár otázek a jeden komentář.

V kapitole 1.3 na str. 8 Imunitní systém se píše, že jeho hlavní funkcí je zajištění ochrany organismu před toxickými molekulami. Uveď, prosím, příklad.

Na str. 10 je popisována hypotéza imunoeditingu. Jaké mechanismy úniku (escape) používají nádorové buňky?

Str. 17: co je chemicky Poly I:C?

Str. 21: Regulační T lymfocyty zase negativně suprimují odpověď imunitního systému. Lze něco suprimovat pozitivně?

Str. 37 dole: Obě jehly byly naplněny 5 ml chladného PBS. Snad stříkačky?

V seznamu zkratek na str. 76 je chybně uvedeno, že CAR-T je kombinovaná antiretrovirová terapie. V textu Úvodu na str. 11 je to dobře.

Jak se překládá do češtiny „checkpoint“?

Otázka: V pokusu s opsonizací nádorových buněk LTA bylo k vyhodnocení cytotoxického účinku makrofágů využito počítání adhezaních buněk po odmytí efektorových makrofágů. Výsledky byly dosti variabilní. Existuje nějaká jiná metoda umožňující kvantifikovat cytotoxický účinek efektorových buněk (nekróza, apoptóza)?

Otázka: P388D1 je nádorová linie monocyto-makrofágového typu. Byla někdy použita tato linie jako efektorové buňky v cytotoxickém testu s nádorovými buňkami jako cíli?

Komentář: V diplomové práci se mluví o intratumorální imunizaci. I když vím, že se tento termín užívá, moc se mi nelíbí. Představoval bych si, že při intratumorální imunizaci imunizujeme tím, že imunogen pícháme přímo do nádoru. Ale tak tomu není. Zabitím nádorových buněk pomocí buněk přirozené imunity imunizujeme nádorovými antigeny, které se z mrtvých buněk uvolňují. Proto si myslím, že výstižnější by bylo mluvit o intratumorální imunostimulaci nebo imunomodulaci.

Můj další komentář směřuje k tomu, že si Dr. Ženka, podle mého názoru, vybral velmi obtížný model, kdy druhý „neléčený“ nádor představuje rozvinutou metastázu. Tento model na příklad nebere v úvahu tvorbu tak zvané premetastatické niky, která vzniká ovlivněním tkání nebo orgánů primárním

nádorem a vytvořením podmínek pro uchycení cirkulujících nádorových buněk a dá se ovlivnit inhibitory cytokinů nebo jejich receptorů.

Závěr: diplomová práce Markéty Skaličkové je po všech stránkách výborně napsaná a i když většina výsledků je negativních, nijak to nesnižuje její kvalitu.

Navrhuji známku „**výborně**“

V Českých Budějovicích 30. 6. 2020

Prof. RNDr. Jan Kopecký, CSc.