

Posudek oponenta na diplomovou práci Bc. Kristýny Danielové „Studium imunitní paměti při imunoterapii pankreatického adenokarcinomu“

Diplomová práce vychází z dlouhodobého záměru skupiny dr. Ženky vyvinout a optimalizovat účinnou imunoterapii nádorů. Terapie je založena na označení nádorových buněk mananem vázaným přes biokompatibilní kotvu, indukci migrace zánětlivých buněk do nádoru pomocí ligandů Toll-like receptorů a zvýšení aktivity antigen prezentujících buněk agonistickou anti-CD40 protilátkou. Terapeutická směs se aplikuje opakovaně přímo do nádoru a u vyléčených myší vyvolává imunologickou paměť.

Diplomová práce začíná rozsáhlým úvodem v rozsahu 20 stran, který se věnuje vzniku a patogenезi nádorů, zejména pankreatickému adenokarcinomu, popisu složení a funkce imunitního systému se zvláštním zřetelem k paměťovým buňkám, jejich subpopulacím a funkci. Dotýká se i nedávného objevu imunologické paměti u NK buněk. V závěru úvodu studentka popisuje mechanismy úniku nádorů před imunitním dohledem a samotnou MBTA imunoterapii navrženou dr. Ženkou.

Kapitola Materiál a metody podrobně popisuje použitý materiál pro MBTA terapii, aplikaci nádorových buněk a měření velikosti nádorů. Dále je podrobně popsáno 7 experimentů sloužících k optimalizaci terapeutického schématu, zahrnutí inhibitoru glutaminového metabolismu (DON), personalizovanou léčbu a analýze výskytu subpopulací paměťových buněk u myší vyléčených z pankreatického adenokarcinomu včetně průkazu imunologické paměti u vyléčených myší adoptivním přenosem imunity.

Výsledky neukázaly významný vliv změny velikosti terapeutických dávek, nebo četnosti podání na redukci nádorového růstu, nejvyššího přežití (87,5%) bylo dosaženo při aplikaci 10 dávek MBTA terapie v pěti pulzech. Kombinace MBTA terapie s DON, přinesla určitý pozitivní efekt, ale výsledky zůstaly za očekáváním. Studentka ukázala i pozitivní vliv personalizované terapie, kdy bylo opakovanou léčbou při výskytu rekurencí docíleno redukce nádorového růstu a prodloužení přežití. Při léčbě MBTA terapií byl ve slezině léčených myší detekován vyšší výskyt CD4+ pomocných T lymfocytů ve srovnání s kontrolou, u vyléčených myší byl ve slezině vyšší výskyt paměťových efektorových T lymfocytů jak CD4+, tak CD8+. Adoptivním přenosem CD3+ T lymfocytů byl dosaženo snížené rychlosti růstu nádoru. Bohužel o vlivu na uchycení nádorových buněk nebyly uvedeny žádné podrobnější výsledky kromě konstatování v Závěru, že ve skupinách, které dostaly jeden a dva miliony buněk se nádory neuchytily u jedné z 5 myší. Z grafu 26 však nic takového nevplývá, je uvedena pouze časová závislost objemu nádoru.

V diskusi na 4 stranách studentka diskutuje svoje výsledky a snaží se je vysvětlit v souladu se světovou literaturou. Upozorňuje na potřebu používat nádorové buňky v časných pasážích, protože se zvyšujícím se počtem pasáží klesá jejich invazivita. Adoptivní přenosy imunity podpořily dřívější pozorování, že vyléčené myši jsou odolné vůči retransplantaci Panc02. Některé výsledky mohl bohužel ovlivnit výskyt ulcerózní dermatitidy u léčených myší, která vyvolává hepatosplenomegalii spojenou s migrací zánětlivých buněk do sleziny.

Kristýně Danielové se podařilo prokázat vysokou účinnost MBTA terapie a přispět k její optimalizaci. Zvládla řadu laboratorních metod, jako jsou příprava a charakterizace splenocytů průtokovou cytometrií a imunomagnetická separace CD3+ buněk. Hlavní část práce byla věnována in vivo pokusům zaměřeným na optimalizaci MBTA terapie. I když se některé cíle práce (možnost použití paměťových buněk z léčených myší jako vakcinace) nepodařilo beze zbytku splnit, představuje

předložená diplomová práce úctyhodný spis psaný pěkným vědeckým a srozumitelným jazykem s minimálním počtem chyb.

Na studentku mám několik dotazů a komentářů:

Str. 6 1.2.1.2.: Humorální složka je tvořena cytokiny a složkami komplementu. Má za úkol chránit před extracelulárními bakteriemi jejich opsonizací. Opsonizují cytokiny? Co je opsonizace? Jak chrání cytokiny před infekcí?

Str. 6 dole: Pokud receptor B lymfocytu rozezná specifický antigen za přítomnosti IFN- γ , dojde k jeho rozdělení na paměťové a plasmatické lymfocyty. Můžete vysvětlit úlohu IFN- γ ?

Od začátku Úvodu po str. 7 se uvádějí informace z učebnic imunologie, což možná není úplně třeba.

Str. 7 dole: Tc lymfocyty rozpoznávají peptidy prezentované na povrchu APC buněk (DCS, MF) v komplexu s MHC I. Na jiných buňkách ne?

Str. 7: je ještě nějaký jiný mechanismus, kromě perforinů, který zapříčiní apoptózu buňky?

Str. 9 nahoře: co je sekundární vrozená humorální odpověď?

Str. 15: Jak to, že paměťové NK buňky mají paměť na specifické antigeny, když nemají T receptory?

Str. 36: Plná dávka MBTA měla na velikost nádoru větší vliv než poloviční. U přežití myší to bylo naopak. Čím to může být?

Str. 50: Jak by dopadlo studium vlivu adoptivního přenosu CD3+ T lymfocytů z vyléčených myší na úmrtnost po implantaci Panc02?

Str. 50, obr. 26: Kde je v grafu vidět vliv na uchycení nádoru? Popis osy x Den terapie není přesný, mělo by být Dny po přenosu CD3+.

Str. 56: EDTA je etylendiamintetraoctová kyselina.

Str., 57: Interferon je IFN, ne INF.

Poslední otázka: Proč jste sledovali Tem ve slezině, když se mají vyskytovat převážně v nelymfoidních tkáních? Mělo by smysl sledovat paměťové buňky přímo v nádoru?

Závěr: Předložená práce je kvalitní a splňuje požadavky na magisterskou diplomovou práci. S hodnocením práce počkám na průběh obhajoby a zodpovězení dotazů.

V Českých Budějovicích 11. 5. 2022



Prof. RNDr. Jan Kopecký, CSc.