

C1 Ještě vzácnější než vzácné: Najdeme u nás pacienty se získaným angioedémem s deficitem C1 inhibitoru?

Sobotková M.(1), Zachová R.(1), Hakl R.(2), Kuklínek P.(2), Králíčková P.(3), Krčmová I.(3), Hanzlíková J.(4), Vachová M.(4), Bartůňková J.(1)

1 - Ústav imunologie 2. Lékařské fakulty a Fakultní nemocnice v Motole, Praha 2 - Ústav klinické imunologie a alergologie Lékařské fakulty Masarykovy univerzity a Fakultní nemocnice u sv. Anny v Brně, Brno 3 - Ústav klinické imunologie a alergologie Univerzity Karlovy v Praze, Lékařské fakulty v Hradci Králové a Fakultní nemocnice Hradec Králové, Hradec Králové 4 - Ústav imunologie a alergologie lékařské fakulty a Fakultní nemocnice Plzeň, Plzeň

Školitel: prof. MUDr. Jiřina Bartůňková, DrSc.

Úvod: Získaný angioedém s deficitem C1 inhibitoru (AAE-C1-INH) je vzácné onemocnění, které se stejně jako vrozená forma deficitu C1 inhibitoru, projevuje otoky v různých lokalitách. Zatím nemáme přesná data o jeho prevalenci a neexistují ani oficiální doporučení pro jeho terapii. K prvním projevům zpravidla dochází po čtyřicátém roce věku a onemocnění obvykle bývá asociováno s jinými chorobami, nejčastěji lymfoproliferacemi a dalšími malignitami nebo autoimunitními chorobami.

Cíl: Cílem naší práce bylo identifikovat pacienty s AAE-C1-INH na území České republiky, získat jejich základní demografická data, údaje o efektivitě použité léčby a suspektních příčinných onemocněních.

Materiál a metody: V dubnu 2019 byla všechna čtyři centra pro léčbu hereditárního angioedému s deficitem C1 inhibitoru oslovena s žádostí o retrospektivní analýzu dat u jimi dispenzarizovaných pacientů. Kritériem pro zařazení byl věk čtyřicet let a výše při první manifestaci angioedémů, chybějící rodinná anamnéza otoků a funkce C1 inhibitoru 50% anebo nižší.

Výsledky: Celkem bylo zachyceno 14 pacientů (7 mužů a 7 žen), kteří splňovali kritéria pro zařazení do studie. Medián věku při první manifestaci byl 59,5 roku a medián trvání choroby do stanovení diagnózy byl 1 rok. Nejčastěji pacienti trpěli otoky obličeje (100%) a otoky postihujícími horní cesty dýchací (64%). U všech léčených pacientů byla zaznamenána dobrá odpověď při léčbě akutních otoků za použití ikatibantu a rekombinantního nebo humánního C1 inhibitoru. Hematologická malignita byla identifikována jako příčinné onemocnění u 9 pacientů (64%), monoklonální gamapatie nejasného významu u 3 pacientů (21%) a autoimunita u jednoho z nich (7%). U jednoho pacienta (7%) jsme žádné suspektní příčinné onemocnění neprokázali. U pěti ze sedmi pacientů (71%) léčených pro hematologickou malignitu došlo po léčbě buď k ústupu klinických symptomů angioedému, nebo i k laboratorní normalizaci deficitu C1 inhibitoru.

Závěr: Na základě našich údajů se prevalence AAE-C1-INH v České republice pohybuje kolem 1:760 000. AAE-C1-INH představuje asi 8 % všech pacientů s deficitem C1-inhibitoru. Naše studie prokázala velmi silnou asociaci s lymfoproliferativními chorobami. Léčba hematologické malignity může pomoci zmírnit i příznaky AAE-C1-INH.

C2 KOMBINOVANÁ IMUNOTERIE NÁDORU: JSOU DVA VŽDY VÍCE NEŽ JEDEN?

Kateřina Kalkušová

Ústav imunologie 2. LF UK a FN Motol

Školitel: doc. RNDr. Daniel Smrž, Ph.D.

Úvod: Adoptivní buněčná terapie (ACT) zaznamenala v posledních dekáдах mnohé úspěchy v léčbě nádorových onemocnění. Ačkoliv u některých typů nádorů se této terapeutické metody stále nedaří využít, a tak stále přetrvává snaha o její zdokonalení. Jednou z možností, jak zvýšit účinnost ACT, je její kombinace s dalšími formami terapie, které by mohly nádor vůči ACT senzitivizovat. Inhibitory inflamazomu, konkrétněji NLRP3 molekuly, která se na sestavení inflamazomu podílí, se v posledních několika letech staly atraktivním terapeutikem mimo jiné i při experimentální léčbě nádorů. Nedávné studie ukázaly, že inhibice NLRP3 vede k potlačení progresu a migrace nádoru in vivo a že existuje vztah mezi NLRP3 molekulou a expresí kontrolního bodu imunity, molekulou PD-L1, která je v klinické praxi u některých diagnóz cílena.

Cíl: Naším cílem je hodnocení vlivu NLRP3 inhibitoru na senzitivizaci nádorových buněk ke zvýšení účinnosti in vitro eliminace nádorových buněk pomocí ex vivo připravených nádorově specifických T buněk, a tím posouzení potenciálu strategického kombinování těchto terapií v klinické praxi.

Materiál a metody: V in vitro experimentech byla jako model využita prostatická nádorová linie PC3 exprimující červený reporterový fluorescenční protein FP635 (FP635-PC3), buňky byly ovlivňovány specifickým inhibitorem NLRP3 (MCC950). Takto ovlivněné buňky byly dále kultivovány s předem ex vivo připravenými PC3-specifickými T buňkami. Sledován byl 1) vliv MCC950 na PC3 buňky, 2) citlivost MCC950 ovlivněných buněk na simulovanou T buněčnou imunoterapii, což bylo hodnoceno skrze analýzu obrazu fluorescenčního signálu FP635-PC3 buněk. Expres PD-L1 molekuly byla analyzována metodou průtokové cytometrie.

Výsledky: Naše výsledky ukázaly, že samotný NLRP3 inhibitor MCC950 potlačuje růst FP635-PC3 buněk a snižuje u nich povrchovou expresi PD-L1 molekuly. Následující ko-kultivační experimenty ukázaly, že FP635-PC3 buňky předem ovlivněné pomocí MCC950 byly v buněčné kultuře lépe eliminovány specifickými T buňkami v porovnání s FP635-PC3 buňkami, které neprošly předchozím ovlivněním.

Závěr: Provedené in vitro experimenty naznačují možnost kombinování terapií pomocí NLRP3 inhibitoru MCC950 a ACT. Předchozí ovlivnění nádoru pomocí MCC950 tak může představovat nový potenciální nástroj senzitivizace nádorů pevných tkání k účinkům ACT.

Podpora projektu: AZV MZ: NU22-03-00300, NU23-08-00071

IPE 2 Institucionální podpora excelence Univerzity Karlovy 2. lékařské fakulty

C3 STEJNÁ NEBO JINÁ? MAPOVÁNÍ IMUNITY UVNITŘ VELKÝCH LEIOMYOSARKOMŮ

Benešová I.(1), Ozaniak A.(2), Balko J.(3), Rataj M.(1), Galová D.(2), Lischke R.(2), Bartůňková J.(1), Střížová Z. (1)

1 Ústav imunologie, 2. LF UK a FN Motol 2 III. Chirurgická klinika, 1. LF UK a FN Motol 3 Ústav patologie a nukleární medicíny, 2. LF UK a FN Motol

Školitel: MUDr. Zuzana Střížová, Ph.D.

Úvod: Měkkotkáňové sarkomy jsou heterogenní a vzácnou skupinou nádorů. Pacienti mají velmi špatnou prognózu a mnozí jsou diagnostikováni v metastatickém stádiu onemocnění. Současná léčba se primárně skládá z chirurgické resekce nádoru, nicméně u pacientů s metastázemi jsou léčebné možnosti omezené. Právě proto je nezbytné hledat léčebné modalita, které by zlepšily přežívání pacientů. V léčbě nádorů je na vzestupu imunoterapie. Jejím cílem je nabuzení imunitního systému za účelem eradikace nádorových buněk. Doposud nejvýznamnějších výsledků bylo dosaženo při léčbě imunitními checkpoint inhibitory (ICI). Bohužel u měkkotkáňových sarkomů jsou výsledky stále nepřesvědčivé.

Cíl: Cílem studie bylo zjistit, jak se liší zastoupení T buněk a makrofágů uvnitř obrovských leiomyosarkomů. Dále jsme studovali expresi imunitních checkpoint molekul (ICM), neboť právě jejich přítomnost a míra exprese rozhoduje o úspěšnosti a samotném podání ICI u mnohých nádorových onemocnění. V neposlední řadě jsme porovnali, jak se in vitro liší reakce na anti-LAG-3 protilátku napříč různými místy nádoru.

Materiál a metody: Naše kohorta čítala čtyři neléčené retroperitoneální leiomyosarkomy odebrané během operace na III. chirurgické klinice, 1. LF UK a FNM. Všichni pacienti podepsali informovaný souhlas o využití materiálu k výzkumným účelům a projekt byl schválen Etickou komisí FNM. Z každého nádoru bylo patologem odebráno a popsáno 10 vzorků (vitální i nekrotická tkáň z centra i periferie nádoru). Prostřednictvím průtokové cytometrie provedené na buňkách izolovaných z nádorů, jsme měřili T buňky, makrofágy a přítomnost ICM. Komplementární metodou byla imunohistochemie prováděná na FFPE vzorcích. Dále jsme analyzovali supernatanty z nestimulovaných, stimulovaných a anti-LAG-3 stimulovaných vzorků metodou multiplexové luminexové imunoeseje.

Výsledky: Infiltrace imunitních buněk a exprese ICM se v rámci jedné nádorové tkáně výrazně lišila. Mezi největší rozdíly lze zařadit 63 % expresi TIM-3 u CD3+ T buněk v centru vitálního nádoru a 7 % expresi na volném okraji. Ostatní data jsou momentálně analyzována a diskutována v rámci multidisciplinárního výzkumného týmu.

Závěr: Naše prozatimní výsledky poukazují na intratumorální heterogenitu leiomyosarkomů a naznačují, že pro analýzu imunitních infiltrátů a exprese ICM je vhodné provádět biopsii z různých lokalit nádorového ložiska. Tento přístup poskytuje vyšší vypovídající hodnotu v diagnostice a umožňuje lépe přistupovat k výběru optimální léčebné strategie.

Podpora projektu: AZV ČR (NU23J-08-0031) a GAUK (94323)

C4 VLIV NEOADJUVANTNÍ CHEMOTERAPIE NA IMUNITNÍ INFILTRÁT NÁDOROVÉHO MIKROPROSTŘEDÍ A IMUNOTERAPII U METASTAZUJÍCÍHO KARCINOMU OVARIA

Láníčková T.(1,2), Kašíková L.(1), Raková J.(1), Hensler M.(1), Angelidou A.(1), Pasulka J.(1), Drozenová J.(3), Laco J.(4), Dundr P.(5), Kocián R.(6), Brtnický T.(7), Škapa P.(8), Kovář M.(9), Práznovec I.(10), Lischke R.(11), Vachtenheim Jr. J.(11), Halaška J.M.(12), Rob L.(12), Ryška A.(4), Cibula D.(6), Špišek R.(1,2) a Fučíková J.(1,2)

1-Sotio Biotech, Praha, 2-Ústav imunologie, 2. lékařská fakulta UK a FN Motol, Praha, 3-Ústav patologie, 3. lékařská fakulta UK a FN Královské Vinohrady, Praha, 4-Fingerlandův ústav patologie, Lékařská fakulta v Hradci Králové UK a FN Hradec Králové, 5-Ústav patologie, 1. lékařská fakulta UK a VFN, Praha, 6-Onkogynekologické centrum Gynekologicko-porodnické kliniky, 1. lékařská fakulta UK a VFN, Praha, 7- Gynekologicko-porodnická klinika, 1. lékařská fakulta UK a FN Bulovka, Praha, 8-Ústav patologie a molekulární medicíny, 2. lékařská fakulta UK a FN Motol, Praha, 9-Laboratoř nádorové imunologie, Mikrobiologický ústav AV, Praha, 10-Porodnická a gynekologická klinika, Lékařská fakulta v Hradci Králové UK a FN Hradec Králové, 11-III. chirurgická klinika, 1. lékařská fakulta UK a FN Motol, Praha, 12-Gynekologicko-porodnická klinika, 3. lékařská fakulta UK a FN Královské Vinohrady, Praha

Školitel: prof. PharmDr. Jitka Palich Fučíková, Ph.D.

Úvod: Ovariální karcinom (OC) je ve vyspělých zemích druhým nejčastějším typem gynekologického karcinomu. Standardní léčebný postup u pacientek s OC zahrnuje chirurgickou cytoredukcí spojenou s chemoterapií (kombinace platiny a taxanových derivátů). Chemoterapie nejenže navozuje cytotoxickou aktivitu proti maligním buňkám, ale má také imunomodulační účinky na nádorové mikroprostředí. Ve srovnání s jinými solidními nádory, imunoterapie inhibitory imunitních kontrolních bodů (ICIs) u OC vykazuje v monoterapii pouze omezený terapeutický přínos. Jako jedna z možných variant účinné strategie léčby high-grade serózního karcinomu ovaria (HGSOC) se jeví kombinace ICIs se standardní cytotoxickou chemoterapií.

Cíl: Cílem této studie bylo zjistit vliv neoadjuvantní chemoterapie (NACT) na imunitní infiltrát nádorového mikroprostředí pokročilého HGSOC a jeho klinickou relevanci pro odpověď na léčbu ICIs.

Materiál a metody: Ve studii jsme využili sekvenování primárních (P-TME) a metastatických (M-TME) vzorků od 88 pacientek s HGSOC bez předchozí aplikace NACT, anebo s NACT léčbou; průtokovou cytometrií na čerstvě resekovaných 120 vzorcích HGSOC; imunohistochemii a multiplexní imunofluorescenční barvení na 220 vzorcích P-TME a M-TME HGSOC a 30 vzorcích nemalobuněčného karcinomu plic (NSCLC). K experimentálnímu posouzení vlivu NACT na odpověď na ICIs (a-PD1) byl použit FVB-syngenní myší model metastatického OC s buněčnou linií BR5.

Výsledky: NACT navyšuje imunogenicitu maligních buněk a zvýšením počtu CD8+ T lymfocytů, B buněk a rozvojem a zráním terciárních lymfoidních struktur (TLS) podporuje adaptivní protinádorovou imunitu v M-TME HGSOC. NACT pozitivně ovlivňuje fenotypové a funkční vlastnosti přítomných T lymfocytů v nádorové tkáni. Dochází k významnému snížení terminálně vyčerpaných TIM3+PD1+CD8+ T lymfocytů, a naopak jsou navyšovány klinicky

relevantní progenitorové TCF1+PD1+CD8+ T buňky. I přes příznivý vliv NACT na vývoj adaptivní protinádorové imunity však nedochází k synergickému efektu mezi chemoterapií a imunoterapií v experimentálním myším modelu, což může být spojeno s fenotypovým rozdílem T buněk u imunologicky „cold“ (HGSOC) a „hot“ (NSCLC) karcinomů, které jsou ovlivněny rozvojem TLS a myeloidního kompartmentu.

Závěr: Naše studie ukazuje, že NACT pozitivně ovlivňuje imunogenicitu a antigenicitu metastatického HGSOC a podporuje rozvoj adaptivní protinádorové imunity. Pro lepší pochopení těchto imunomodulačních procesů v nádorovém mikroprostředí a zlepšení míry odezvy na ICIs je však zapotřebí dalších výzkumů.

Podpora projektu: Sponzorováno společností Sotio Biotech, Praha

C5 INTERFERONOPATIE, VYČERPÁNÍ A SENESCENCE T LYMFOCYTŮ U PACIENTŮ S VROZENÝMI PORUCHAMI IMUNITY

Vladyka O.1, Reitrová M.2, Thurner D.2, Vrabcová P.1, Kužílkova D.2, Šedivá A.1, Kalina T.2, Klopperk A.1

1 - Ústav imunologie 2. LFUK a FN Motol 2 - Klinika dětské hematologie a onkologie 2. LF UK a FN Motol

Školitel: MUDr. Adam Klopperk PhD.

Úvod: Primární imunodeficity jsou skupina vzácných onemocnění manifestujících se zvýšenou náchylností k infekcím, častějším výskytem autoimunitních onemocnění a dysregulací imunitní odpovědi. Tato skupina čítá více než 450 geneticky podmíněných onemocnění postihujících kteroukoli složku imunity. V naší práci se zaměřujeme na poruchy thymu a T lymfocytů a konkrétně na syndrom delece 22q11.2 (syndrom DiGeorge, 22q11DS) způsobující dysplázii thymu a s tím spojenou vrozenou lymfopenií. Ta je během života korigována procesem homeostatické proliferace.

Cíl: Cílem je zjištění stavu aktivace, vyčerpání, proliferační schopnosti a produkce funkčních molekul a cytokinů v jednotlivých subpopulacích T lymfocytů u pacientů s tímto syndromem a zhodnocení efektu interleukinu 7 na jejich funkci a fenotyp.

Materiál a metody: S využitím průtokové cytometrie a sekvenace RNA jsme zmapovali fenotyp T lymfocytů v periferní krvi 12 pacientů s 22q11DS ve věku mezi 10 a 20 let a kontrol stejného věku a pohlaví. U této kohorty jsme dále provedli funkční esej produkce cytokinů ve stimulovaných periferních mononukleárních krevních buňkách (PBMC). U 6 pacientů a 6 kontrolních vzorků jsme kultivovali PBMC po dobu 72 hodin spolu s interleukinem 7 a následně zhodnotili jeho efekt na T lymfocyty za použití spektrální průtokové cytometrie.

Výsledky: Naše měření ukazují zesílenou Th1 odpověď oproti zdravým kontrolám ve všech modalitách: zvětšení populace Th1 lymfocytů, produkce IFN-g a IL-2 i zvýšenou expresi RNA genů spojených s těmito drahami. Dále popisujeme zvětšenou populaci Tfh lymfocytů. Technika dimenzionální redukce fitSNE ukazuje cluster senescentních, vysoce maturovaných cytotoxických lymfocytů dosahující více než 10% všech patientských lymfocytů, ale téměř nedetekovatelný u zdravých kontrol. Patientské T lymfocyty také vykazují zvýšenou expresi checkpoint-inhibitorů a znaků vyčerpání, IL-7 tento fenotyp dále zvýrazňuje.

Závěr: Pacienti se syndromem 22q11.2DS vykazují vyšší stupeň maturace T lymfocytů spojený s vyčerpáním a funkční senescencí. IL-7, který se ukazuje jako slibný lék pro jiné stavy spojené s lymfopenií tento fenotyp dále podporuje a proto nevykazuje velký potenciál pro léčbu tohoto onemocnění, jelikož další stimulace nepřispívá k expanzi populace T lymfocytů ale naopak k jejich většímu vyčerpání.

Podpora projektu: AZV NU20-05-00282, AZV NU23-05-00097