

Oponentský posudek disertační práce

Název práce: Biologická charakteristika buněk kolorektálního karcinomu v modelech in vitro a jejich využití při individualizaci terapie

Autor: MUDr. Stanislav John

Školící pracoviště: Univerzita Karlova, Lékařská fakulta v Hradci Králové, Ústav lékařské biologie a genetiky.

Aktuálnost zvoleného tématu:

Kolorektální karcinom patří k nejčastějším nádorovým onemocněním v naší populaci a jeho incidence narůstá. Diagnostika i léčba tohoto onemocnění prodělává v současné době dramatický vývoj. Optimální využití dostupných léčebných modalit (chirurgického zákroku, radioterapie, chemoterapie a biologické léčby) by mělo zajišťovat zlepšení výsledků ve smyslu snížení rizika návratu onemocnění i ve smyslu minimalizace nežádoucích účinků léčby. Disertační práce se zabývá základním laboratorním výzkumem. Autor se zaměřil na studium vlivu irinotekanu na růstové charakteristiky a faktory ovlivňující mechanismy buněčné smrti dvou stabilizovaných nádorových linií kolorektálního karcinomu (SW-620 a HCT 116) a dvou nenádorových linií buněk běžně se vyskytujících v tlustém střevě (NCM-460 a NCF-CCD-18) v podmínkách in vitro. Předkládaná práce tak může přispět k pochopení mechanismů spojených s protinádorovým účinkem, rezistencí a rizikem nežádoucích účinků irinotekanu.

Stanovené cíle a jejich splnění

Autor si stanovil následující cíle:

1. Obecně určit citlivost nádorových i nenádorových střevních buněk k irinotekanu. Určit vhodné koncentrační a časové rozmezí, při kterém irinotekan negativně ovlivňuje buněčnou proliferaci, navozuje stres a indukuje buněčnou smrt. U nenádorových střevních buněk tyto účinky hlouběji pochopit.

2. Zjistit vliv irinotekanu na růstové parametry a viabilitu pokročilého kolorektálního karcinomu s mutovaným TP53. Určit a posoudit vliv klíčových mediátorů stresové signalizace a buněčné smrti zvoleného nádorového modelu.

3. Vliv irinotekanu na růstové parametry, viabilitu a buněčnou smrt nádorových střevních buněk s odstraněným TP53. Objasnit význam mutace tohoto proteinu v širším kontextu stresové signalizace a buněčného přežívání.

4. Ze zjištěných výsledků určit vhodné terapeutické cíle k možnému prohloubení účinku cytostatické léčby či zmírnění nežádoucích účinků na normální buněčné populace.

Lze konstatovat, že všechny tyto cíle autor naplnil. Na základě předložené práce lze konstatovat, že:

1. Efekt irinotekanu byl dávkově závislý a již od koncentrace 20 μ g/ml způsoboval detekovatelné změny buněčného chování a signalizace. Ovlivnění nenádorových buněčných linií mělo za následek indukci apoptózy a/nebo senescence. Linie NCM odpovídala TP-53 závislou mitochondriální cestou apoptózy s účastí kinázy p38, linie NCF prokazovala preferenčně znaky senescence cestou aktivace proteinů TP53 a p16 s možnou účastí některých microRNA.
2. U modelu pokročilého kolorektálního karcinomu způsoboval irinotekan v nižších koncentracích pomalý nárůst aktivity kinázy p38, což mělo za následek aktivaci intracelulárních mechanismů přežití a inhibici apoptózy. Vyšší koncentrace způsobovaly rychlou aktivaci kinázy p38 a následné spuštění mitochondriální cesty apoptózy.
3. Buňky linie kolorektálního karcinomu s inaktivovaným TP 53 reagovaly na ovlivnění irinotekanem buněčnou smrtí v podobě apoptózy pouze v omezené míře. Vzrostl význam autofagie. Potvrdila se klíčová a zároveň komplikovaná úloha TP53 v odpovědi nádorových buněk na stresové podněty.
4. Ovlivnění nitrobuněčné signalizace odhalilo zajímavé terapeutické možnosti.

Zvolené metody zpracování:

Parametry pro studium jednotlivých buněčných procesů, buněčné smrti a molekulárně biologické parametry a metodiky stanovení byly vhodně zvoleny. Metody statistického zpracování jsou adekvátní charakteru získaných dat.

Formální úprava a členění:

Formálně dobře zpracovaná práce o 142 stranách je členěna obvyklým způsobem a je doplněna 60 obrázky, které jsou přehledné a instruktivní. Celkově je práce přehledná a srozumitelná, nechybí seznam zkratk. Vlastní práce včetně úvodu je publikována na 118 stranách. Výsledky jsou podloženy obsáhlou obrazovou dokumentací, popis výsledků je veden systematicky. V diskusi autor konfrontuje své výsledky s dostupnou literaturou. Literatura obsahuje 155 relevantních odkazů. V práci se vyskytují ojediněle překlepy (např. na str. 88 je dávka/koncentrace uvedena v $\mu\text{l/ml}$ místo v $\mu\text{g/ml}$), které v žádném případě neovlivňují srozumitelnost práce.

Výsledky a nové poznatky:

Získané výsledky rozšiřují naše poznání o důsledcích účinku irinotekanu na různé typy buněk a jejich „obránných“ mechanismech. Mohly by vést k identifikaci molekul zaměřených na nové cíle, které by zvýšily protinádorový efekt irinotekanu. Tyto poznatky by mohly v budoucnosti ovlivnit péči o nemocné s kolorektálním karcinomem a ve svém důsledku by mohly vést ke zlepšení léčebných výsledků a kvality života nemocných s tímto onemocněním.

Připomínky a dotazy:

1. Naznačují výsledky práce, že by bylo vhodné podrobněji sledovat účinek navýšení koncentrace irinotekanu cestou regionálního/intraarteriálního podání?
2. Má některý ze studovaných parametrů potenciál sloužit v budoucnu jako prediktivní znak pro protinádorový účinek nebo riziko toxicity?

Závěr:

Jedná se o kvalitní disertační práci, která splňuje podmínky stanovené zákonem. Z předložené práce je zřejmé, že předkladatel je prvním autorem 2 publikací a spoluautorem 5 publikací v časopisech s IF věnovaných studované problematice a spoluautorem řady publikací v časopisech s IF či recenzovaných časopisech bez sledovaného IF s onkologickou tematikou. Autor prokázal schopnost systematicky a cílevědomě řešit vědecký problém s aktuální problematikou, což vypovídá o jeho tvůrčí schopnosti, erudici a znalosti problematiky. Práce splnila požadavky kladené na disertační práci v oboru.

Z důvodů uvedených v tomto posudku doporučuji komisi pro obhajobu disertačních prací v doktorském studijním programu v oboru Lékařská biologie předloženou práci přijmout k obhajobě a po úspěšné obhajobě navrhnout MUDr. Stanislavu Johnovi udělení titulu Ph.D. dle § 47 Zákona o vysokých školách č. 111/98 Sb.

V Olomouci 12. srpna 2019

MUDr. Karel Čwierka, Ph.D.