

Universita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta  
a Všeobecná fakultní nemocnice  
**Ústav dědičných metabolických poruch**  
Přednosta: Doc. MUDr. Viktor Kozich, CSc.  
Ke Karlovu 2, budova D, 1. patro, 128 08 Praha 2  
tel.: 224 967 679, fax: 224 967 168  
Viktor.Kozich@lf1.cuni.cz

Posudek disertační práce Mgr. Lindy Kideryové,  
**"Použití vícekanálové průtokové cytometrie v biomedicíně a experimentální biologii"**

Práce Mgr. Lindy Kideryové je tvořena stručným, ale výstižným komentářem a příloženými separátními výtisky 8 publikací (v anglickém jazyce), které se týkají tématu disertace. V úvodu je stručně popsána metodika průtokové cytometrie a výčet všech použitých protilátek k detekci sledovaných buněčných typů, ať již v solidních nádorech, nebo jako cirkulující endoteliální elementy. Zároveň je podán i přehled sledovaného problému s definicí procesů, které byly studovány (solidní nádory: fibrosní histiocytom (benigní i maligní varianta), basocelulární a spinocelulární karcinomy, klon endoteliálních buněk: endotelie zralé a jejich prekursorů při vybraných stavech. Zároveň je podán i souhrn výsledků v daném tématu.

Ve zmíněných 8 publikacích je Mgr. Kideryová 2x první autorkou, ve 4 pracích je na 2. místě a na zbylých dvou je jako jeden ze spoluautorů ve vzdálenější posici. Všechny práce jsou publikovány v mezinárodně distribuovaných časopisech. V publikacích, kde je na prvním místě, jde o řešení tematicky odlišných problematik.

Metodika vícekanálové průtokové cytometrie použitá pro řešení je moderní. Představuje standardní, všeobecně přijímaný postup. Použité protilátky patří mezi ověřené monoklonální nebo polyklonální typy používané zavedeným nebo výrobcem doporučeným postupem. Tato technika byla korelována s testováním endoteliálních klonogenních prekursorů v tkáňové kultuře.

Celou tematiku lze rozdělit na dvě části:

**V první části** je výzkum věnován velmi zajímavému a závažnému tématu vztahu stromálních buněk nositele a ve vztahu k nádoru. Studovány byly fibroblasty ze stromatu basocelulárního karcinomu, spinocelulárního karcinomu a nádorové buňky tzv. fibrosního histiocytomu, a to jak benigní, tak maligní varianty tohoto nádoru. V případě fibroblastů stromatu basocelulárního karcinomu bylo zjištěno, že jsou trvale transformované a vykazují schopnost

ovlivnění fenotypu normálních epidermálních keratinocytů v prostředí tkáňové kultury. Tento změněný fenotyp se vyznačuje zejména indukcí určitých forem cytokeratinu a některých markerů, kompatibilních s představou, že jde o počáteční fázi epiteliálně mesenchymální transformace (mimo jiné indukce vimentinu, nukleosteminu a vazebných míst pro galektin-1). V případě stromálních fibroblastů ze stromatu spinocelulárního karcinomu byla zjištěna podobná vlastnost, to jest indukce abnormálního fenotypu v kontrolních epidermálních keratinocytech ve společné tkáňové kultuře. Experimenty ukázaly, že jde o parakrinní efekt solubilními mediátory. Tuto vlastnost nevykazovaly kontrolní dermální fibroblasty ani fibroblasty standardně dostupných linií. Vysvětlení těchto vlastností je podáváno na obecnější úrovni – nádor i stroma nádoru tvoří jeden ireversibilně transformovaný celek a vzájemné vztahy lze pravděpodobně interpretovat jako vzájemné přechody epitel – mesenchym, což je v onkologické literatuře široce diskutováno. Takto transformované stromální fibroblasty karcinomů mohou do určité míry ovlivnit normální, tedy nenádorové keratinocyty.

Pokud jde o nádorové buňky tzv. fibrosního histiocytomu, byla jejich schopnost indukce změny fenotypu epidermálních keratinocytů shledána rozdílná. Byla prokázána v nádorových buňkách benigní varianty nádoru, nikoliv však v maligní variantě nádoru.

**V druhé části** je pojednáno o systému (klonu) endoteliálních buněk zralých a jejich prekursorů, které byly detekovány zmíněnou společnou technikou vícekanálové průtokové cytometrie v periferní krvi. Počty prekursorů (klonogenních) byly korelovány s počty endoteliálních kolonií v tkáňové kultuře. Je cenné, že byly v tomto smyslu zjištěny rozdíly mezi standardní technikou detekce cirkulujících prekursorů s počty klonogenních buněk v tkáňové kultuře. Tato diskrepance naznačuje, že komplexní „biologické“ hodnocení klonogenních prekursorů poskytuje velmi pravděpodobně relevantnější závěry než detekce cirkulujících prekursorů na základě jejich imunofenotypu, neboť odráží spoluúčast dalších kooperujících buněk. Techniky sledování endotelových buněk byla aplikována u pacientů, kterým byla provedena transplantace kostní dřeně, a u pacientů s poruchami mikrocirkulace. Dosavadní výsledky ukázaly změny v počtech a proporcích mezi prekursory a zralými endoteliemi. Tyto výsledky nelze v současnosti jednoznačně hodnotit, ale lze je považovat za velmi přínosné pro další studia patologie endoteliálních klonů.

## Otázky

1. Lze předpokládat, že indukované změny v keratinocytech stromálními fibroblasty karcinomů nebo buňkami benigního FH jsou reversibilní? (předpokládám, že jsou reversibilní)
2. Analyzoval a srovnával někdo genotyp nádorových stromálních fibroblastů a buněk karcinomu?
3. Lze předpokládat indukci srovnatelných změn normálních epidermálních keratinocytů kultivovanými buňkami karcinomu, tak jak jsou toho schopné stromální karcinomové buňky?
4. Jak vysvětlujete rozdílné chování nádorových buněk benigního fibrosního histiocytomu (FH), schopných indukovat fenotyp epidermis proti maligní variantě nádoru, která tento vliv nemá. Tyto nepochybně zajímavé výsledky však podle mého soudu pouze naznačují možnost rozdílného působení. Od každého nádoru (benigního a maligního) byl k dispozici pouze jediný vzorek, takže těžko může jít o biologicky zcela relevantní závěry.
5. Cirkulující endotelové buňky a cirkulující endotelové prekursorů atd. str.7. Uvažujete o korelaci endoteliálních mikropartikulí s cirkulujícími endoteliemi nebo sledoval tento parametr někdo v publikované literatuře?
6. Byl někdy učiněn pokus analyzovat izolované klastry endotelových buněk (zralých nebo prekursorových) elektronovým mikroskopem nebo obecně mikroskopicky?
7. Tzv. zralé cirkulující endoteliální buňky (CEC) máme chápat jako deskvamované endotelie, a tedy jejich počet jako ukazatel poškození? nebo lze předpokládat i jejich vznik vyžíváním z cirkulujících prekursorů?

## Poznámky

- a) Positivita SCC (spinaliomů) v detekci EMA na rozdíl od basaliomu - bylo by podle mého soudu informativní definovat, že EMA představuje mucin 1 (MUC 1), což jinak v záplavě zkratk zaniká.
- b) Je jasné, že dnešní věk je charakterizován zkratkami, které při větší kumulaci v textu začínají smysl věty zastírat. Uvítal bych, kdyby v úvodu disertace byla těmto zkratkám přiřčena biologická podstata sledovaného antigenu.
- c) Na obrázku 1c,d,e v práci o fibrosním histiocytomu by bylo jistě vhodné označit, jaké keratiny byly použity k charakterizaci epidermis. Přesně definováno je to pouze v následující sekvenci c1, d1, e1, kde je znázorněn K19 (jako chybějící).
- d) Na obr. 3 v práci o FH je obr.C označen jako výsledek použití CD36, ale jde o CD14.

e) Jako poměrně závažný nedostatek vidím, že v diskusi na str. 19, oddíl 3.1 je na začátku druhého odstavce shrnuto, že fibroblasty basocelulárního a spinocelulárního nádoru (BCCF i SCCF) *v kokultuře významně transformovaly normální dermální fibroblasty v buňky nižšího diferenciálního stupně ...* atd. Vzhledem k celému kontextu práce by místo italikem vyznačených normálních dermálních fibroblastů mělo být *epidermální keratinocyty*. Toto opominutí považuji za hrubou formální chybu. Tato chyba je přítomna nejen v stručném úvodu, ale i v autoreferátu, který je podstatě kopií stručného úvodu.

Závěr: Osobně hodnotím disertaci kladně. Jde o využití progresivní techniky v řešení několika významných projektů, které jsou řešeny na společné úrovni buňky. Pro definitivní názor komise bych uvítal vyjádření školitele, jaký byl podíl Mgr. Kideryové celkově a na jednotlivých projektech. Myslím, že jsou předpoklady ke kladnému hodnocení ve smyslu udělení titulu PHD.

15. ledna 2010

Prof. MUDr. Milan Elleder, DrSc

