V Praze dne 5.11.2012

Oponentský posudek na disertační práci Mgr. Kláry Klimešové „Role of microbiota and gut inflammation in the pathogenesis of experimental colorectal cancer"

Práce je pokračováním a doplněním projektů, týkajících se slizniční imunity a interakcí střevní mikroflóry s imunitním systémem, dlouhodobě a úspěšně řešených na Oddělení imunobiologie a gnotobiologie Mikrobiologického ústavu AV ČR. Hlavním tématem práce byla důležitá otázka, jak střevní mikroflóra ovlivňuje střevní homeostázu a následně patologické procesy, jako je chronický a akutní střevní zánět a vznik kolorektálního karcinomu. Byl studován pozitivní i negativní vliv střevní mikroflóry na rozvoj kolitidy a následného karcinomu tlustého střeva a práce přináší nové poznatky o modulačních účincích střevní mitkroflóry na patologické procesy ve střevě podle jejího druhového složení.

Byl prokázán protizánětlivý účinek orálního podání membránové frakce komensální bakterie *Parabacteroides distasonis* a lyzátu probiotické bacterie *Lactobacillus casei* na myších modelech akutního i chronického střevního zánětu, což bylo předmětem dvou kvalitních publikací. Průkaz navození tolerance orální cestou má potenciální klinický význam. Práce jsou také zajímavé z metodického hlediska, kdy vedle využití bezmikrobních modelů, je použita metoda analýzy druhového zastoupení ve střevní mikroflóře moderními sekvenačními metodami.

V rámci studia mechanismů propojujících zánětlivé procesy ve střevě se vznikem kolorektálního karcinomu byla pozornost věnována regulaci toll-like receptor (TLR) signalizace a dopadu na regulaci zánětu a vzniku nádorů. V práci, kde je Mgr. Klimešová prvním autorem, byla demonstrována role střevní mikroflóry v indukci nádorů na modelu, kdy indukce nádorů byla provedena podáním azoxymethanu (AOM) a dextransulfátu (DSS). Dále byla prokázána důležitá protektivní role IRAK-M, negativního regulátoru signalizační dráhy TLR, pomocí experimentů s IRAK-M-deficientními myšmi. V případě prokázání benefičního účinku antibiotik na rozvoj nádorového onemocnění by bylo zajímavé studovat jejich účinek také v uspořádání, kdy je pro indukci nádorů použit jiný karcinogen než azoxymethan, jehož karcinogenní/genotoxický účinek je zvýšen metabolickým účinkem bakterií. Autoři dále došli k závěru, že u IRAK-M–deficientních myší účinek antibiotik nemá vliv na rozvoj závažných forem nádoru, nicméně u myší, kterým byla společně s azoxymethanem a DSS podána antibiotika, je dokumentováno signifikantní snížení četnosti invazivního karcinomu, ve srovnání s myšmi, kterým antibiotika podána nebyla (Obr. 4D).

Výše zmíněné tři původní práce, přinášející nové výsledky o interakcích střevní mikroflóry s imunitním systémem hostitele a dopadech jejich modulace na vznik a rozvoj experimentálního střevního zánětu a kolorektálního karcinomu, jsou vhodně doplněny přehledným článkem o roli střevní mikroflóry v protinádorové odpovědi s důrazem na práce využívající bezmikrobní modely a studií o regulaci Wnt signalizace, hrající důležitou roli při vzniku kolorektálního karcinomu (role proteinu TROY).

Práce je velmi obsáhlá (215 stran), 5 publikací je doplněno rozsáhlým úvodem se 179 citacemi a diskusí (dalších 49 citací), kromě citací u jednotlivých publikací. Celkem je Mgr. Klimešová spoluautorem 12 prací, z nichž pět bylo zahrnuto do disertační práce. U jedné z nich je Mgr. Klimešová prvním autorem. Není však nikde uvedeno, jaký byl podíl Mgr. Klimešové na jednotlivých publikacích, což by vzhledem k velkému počtu autorů i objemu presentovaných dat bylo žádoucí. Disertační práce působí velmi koncisně a dobře se čte, přestože je sestavena z jednotlivých publikací. Je doplněna velmi dobře strukturovaným a napsaným úvodem, který je zaměřen na řešenou problematiku. Všeobecná diskuse je kratší (10 stránek textu) a je strukturována podle jednotlivých publikací. Asi by bylo lepší, kdyby byly výsledky publikované v sadě článků diskutovány ve vzájemných souvislostech. Práce je velmi pečlivě napsána s minimem chyb a s velmi kvalitní obrazovou dokumentací.

Dotazy k diskusi

- Práce je složena z pěti kvalitních, obsáhlých a metodicky náročných publikací, které mají od 10 do 21 spoluautorů. Můžete specifikovat svůj podíl na jednotlivých publikacích a metodiky, které jste používala?
- Složení a účinky střevní mikroflóry jsou ovlivněny genetickým pozadím hostitele; analyzovali jste účinky orální bakterie *Parabacteroides distasonis* a lyzátu probiotické bacterie *Lactobacillus casei* také na jiných kmenech myší než odvozených z BALB/c, případně můžete uvést data z podobných publikovaných experimentů?
- Inhibiční účinek perorálního podání komponent *P. distasonis* byl srovnán s účinkem preparátů z dalších anaerobních baktérií, u kterých nebyly inhibiční účinky pozorovány. Můžete diskutovat možné příčiny tohoto rozdílu u těchto konkrétních bakterií ?
- Můžete komentovat, jaký je vztah mezi podáním lyzátu *L. casei* a zastoupením bakterií rodu *Parabacteriodes* ve střevní mikroflóře během zánětu?
- Je něco známo o změnách ve složení střevní mikroflóry ve vašem modelu v průběhu zánětu v důsledku deficience IRAK-M, máte nejaká data o změnách?

– Můžete úvést některé příklady polymorfismu TLR nebo regulatorů TLR signalizace, jako prognostických markerů pro kolorektální karcinom?

Závěr

Mgr. Klára Klimešová potvrdila, že je schopna samostatně vědecky pracovat a získala množství prioritních výsledků, které byly publikovány v mezinárodních časopisech s IF a také mají potenciální klinický dopad. U jedné publikace je prvním autorem. Celkově práce přispěla k hlubšímu pochopení, jaké mechanismy ovlivňují zánětlivé procesy ve střevě a následný vznik a rozvoj kolorektálního karcinomu. Doporučuji, aby práce byla přijata jako podklad pro udělení titulu PhD.

RNDr. Milan Reiniš, CSc.

Laboratoř nádorové imunologie
Ústav molekulární genetiky AV ČR, v.v.i.
Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4