

**Posudek oponenta
na dizertační práci Mgr. Kateřiny Caltové s názvem**

„Testování chemosenzitivity u buněk lidského ovariálního karcinomu a jeho modelového systému, buněčné linie A2780“

Předložená dizertační práce se zabývá ne zcela novou, ale stále aktuální problematikou, která se vztahuje k optimalizaci léčby nádorových onemocnění a to jsou testy chemosenzitivity *in vitro*. Autorka se zaměřila na ovariální karcinomy a experimenty byly prováděny jednak na souboru klinických vzorků a jednak na buněčné linii odvozené od ovariálního karcinomu A2780.

Po formální stránce je dizertační práce klasicky členěna a jednotlivé části mají rozsah odpovídající tomuto typu prací. V současném stavu problematiky autorka podává stručný přehled epidemiologie, patogeneze a léčby ovariálního karcinomu. Věnuje se zde problematice rezistence a podává přehled testů používaných pro testování chemosenzitivity *in vitro*. Autorka využila širokou řadu experimentálních metod, které jsou velmi podrobně popsány spolu se zdrojovým materiálem v kapitole Materiál a metody.

Vlastním cílem práce bylo zodpovědět s využitím testů *in vitro* několik otázek souvisejících s testováním klinických vzorků a dále je ověřit u standardní buněčné linie A2780. V experimentech bylo použito 6 chemoterapeutik s odlišnými mechanismy účinků a dle stanoveného klíče byla hodnocena reaktivita poměrně rozsáhlého souboru 83 vzorků ze solidních nádorů a 61 vzorků ascitů. Výsledky jsou doloženy řadou tabulek a grafů se statistickým vyhodnocením a snímky z časosběrné a fluorescenční mikroskopie. Přínosem jsou zejména výsledky, které porovnávaly reaktivitu čerstvých a zamražených vzorků, což může být významné pro rutinní využití v klinické laboratoři. Také srovnání reaktivity solidního nádoru a ascitu téže pacientky (19 párových vzorků) ukázala poměrně velkou shodu (73%), což by také mohlo usnadnit testování. Zde je však nutné ověřit tuto skutečnost na větším počtu vzorků. Zajímavé je rovněž dynamické sledování reaktivity nádorů v čase, avšak tato problematika je poněkud komplexnější a je také potřeba ověřit výsledky na větším souboru pacientek a s ohledem na další parametry.

Druhá část práce porovnává účinky sledovaných chemoterapeutik na sensitivní buněčné ovariální linii A2780 s využitím několika testů *in vitro* včetně dynamického měření v reálném čase (systém xCELLigence) a morfologických studií. Tyto výsledky ukázaly poměrně dobrou shodu jednotlivých testů a největší citlivost právě u měření buněčného indexu. V této části práce se autorka částečně zaměřila i na některé mechanismy působení cytostatik jako jsou změny buněčného cyklu a některých proteinů spojených s jeho regulací i na proteiny spojené s indukci apoptózy (Bax, XIAP, aktivita kaspázy-3).

Na závěr jsou výsledky asi na 15 stránkách diskutovány a shrnuty. Celý text je doplněn seznamem zkratk a asi 140 citacemi.

K práci mám následující připomínky a dotazy:

- Vzhledem k tomu, že se celá práce zabývá působením chemoterapeutik je kapitola v Úvodu věnovaná léčbě ovariálního karcinomu velmi stručná. Více pozornosti mělo být věnováno také molekulárním mechanismům působení chemoterapeutik s ohledem na zástavu buněčného cyklu a indukci buněčné smrti, což bylo v práci studováno u buněčné linie A2780.

- Popis experimentálních postupů je vyčerpávající, jen mi vadí stylizace ve formě „vzorek se roztříhal, suspenze se pipetovala, buňky se naředily, preparáty se prohlížely“ atd. Vhodnější formou je např. trpný způsob.
- Popis reaktivity vzorků pod obrázky 5-1-1, 5-1-2 a 5-1-3 není úplně ideální. Srozumitelnější by bylo napsat u všeho, kolik % cytostatikum zabíjí nebo naopak kolik % přežívá. Co je myšleno „vysokou koncentrací cytostatika“?
- MTT test je založen na reakci mitochondriálního enzymu a může být problematický u látek, jejichž mechanismus účinků zahrnuje mitochondrie (zejména látek, které indukují produkci reaktivních kyslíkových radikálů). To se týká i např. indukce vnitřní (mitochondriální) dráhy apoptózy. Lze u některého z použitých cytostatik takové účinky předpokládat nebo byly prokázány?
- V Diskusi se dle mého názoru opakují některé obecné věci (výskyt ovariálních nádorů, mechanismy účinků cytostatik), které jsou v Úvodu nebo by tam spíše patřily. Naopak mohly být zmíněny podrobněji další možnosti či metody využitelné pro zjišťování citlivosti nádorových buněk na léčbu.
- Na str. 81 mi chybí citace k uváděné klinické studii s trojkombinací cytostatik.
- Na str. 81 jsou také zmiňovány příčiny rozdílné reaktivity klinických vzorků. Nemůže se na ní podílet i heterogenita vzorků s ohledem na zastoupení nádorových a jiných buněk?
- Opravdu nejsou známe žádné markery, které by identifikovaly ovariální nádorové buňky?
- U buněk získaných ze solidního nádoru lze předpokládat přítomnost vlastních nádorových buněk a dále buněk stromálních příp. imunitních. Jak je tomu u ascitu?
- Jaké mohou být možné příčiny rezistence ovariálních buněk ke karboplatině ve srovnání s cisplatinou?
- Linie A5780 je velmi často používána jako experimentální objekt a existuje řada prací o účincích zejména platinových cytostatik. Této části výsledků by prospělo detailnější studium způsobu buněčné smrti a molekul s ní spojených a v Diskusi vymezení, jaké nové poznatky přinášejí předložené výsledky. Zde mi také chybí hlubší rozbor a srovnání, co již bylo s využitím této linie zjištěno jinými autory o působení sledovaných cytostatik na buněčný cyklus, příp. buněčnou smrt. K této linii rovněž existuje partnerská linie rezistentní k cisplatině A2780cis, která mohla být použita pro srovnání právě s ohledem na rezistenci ovariálních nádorů.
- Kolikrát byly opakovány experimenty měření buněčného cyklu a exprese proteinů?
- U výsledků z western blotů by měla být uvedena molekulová hmotnost proteinů. Byly uvedené proteiny měřeny na tomtéž gelu? Proč byla stanovena zrovna jen exprese proteinu Bax a XIAP? Který ze dvou proužků pro XIAP byl měřen?
- Jaký hypotetický postup léčby by preferovala autorka na základě výsledků své práce (monoterapie či případně nějaká kombinace cytostatik)?

Závěr

Je zřejmé, že problematika řešená v rámci dizertační práce je velmi složitá a komplexní a zahrnuje řadu dalších aspektů, které autorka také zmiňuje a které nemohly být pochopitelně v rámci dílčí práce zahrnuty. Také práce s klinickými vzorky je náročná a má svá úskalí. I když mohla být větší pozornost věnována některým molekulárním mechanismům a případným korelacím s citlivostí buněk na

vybraná cytostatika, autorka zvládla širokou škálu experimentálních metod a prokázala schopnost samostatné tvůrčí práce. Její výsledky přinášejí některé nové poznatky, které přispívají k dlouho diskutované problematice testování citlivosti na léčbu s využitím testů *ex vivo*.

Přes uvedené připomínky lze tedy shrnout, že vytýčené cíle dizertační práce byly splněny, dosažené výsledky mohou přispět k optimalizaci léčby ovariálního karcinomu a jsou přínosem pro obor Lékařská biologie. Práci proto doporučuji k obhajobě.

V Brně dne 22. 11. 2013

prof. RNDr. Jiřina Hofmanová, CSc.