

Posudek na doktorskou disertační práci MUDr. Alžběty Jechové nazvanou „Studium mezibuněčných interakcí v nádorech“

Disertační práce MUDr. Alžběty Jechové se zabývá studiem mezibuněčných vztahů v nádorech. Toto téma je vysoce aktuální, nejen díky faktu, že nádorová onemocnění jsou druhou nejčastější příčinou úmrtí, ale zejména díky tomu, že podpůrné buňky nádoru tvoří často velmi početné populace buněk a mohou významnou mírou přispívat k regulaci proliferace vlastních maligních buněk, růstu a vývoje nádoru. Role stromálních buněk ve vývoji maligních onemocnění byla donedávna spíše přehlížena a současná protinádorová léčba je cílena převážně na vlastní maligní buňky. Terapeutické zasažení některé vedlejší složky nádorového mikroprostředí však může mít dalekosáhlou odezvu i u vlastních buněk nádoru a vést k mnohem lepšímu terapeutickému efektu u pacienta. Nádorové mikroprostředí patří mezi žhavá témata současného medicínského výzkumu.

Disertační práce byla zpracována pod vedením vysoce erudovaného školitele prof. MUDr. Karla Smetany ml., DrSc. Pracoviště školitele je jedním z celosvětově uznávaných průkopníků výzkumu mezibuněčných vztahů v nádorovém mikroprostředí, zejména pak studiu interakcí mezi fibroblasty a vlastními maligními buňkami, ale i okolními buňkami (např. keratinocyty u nádorů kůže). Pracoviště školitele se zabývá zejména studiem melanomu a nádorů hlavy a krku a publikovalo několik stěžejních studií, např. průkaz vlivu faktorů sekretovaných fibroblasty na růst a invazivitu nádorových buněk.

Předložená disertační práce se konkrétně zabývá sledováním:

- (i) genové exprese u dlaždicových karcinomů hlavy a krku a porovnáním genové exprese ve vlastním nádoru, na jeho okraji a v kontralaterální zdravé tkáni,
- (ii) vlivu keratinocytů ozářených UVB zářením na nádorové fibroblasty a invazivitu melanomových buněk,
- (iii) vlivu nádorově asociovaných fibroblastů na buňky glioblastomu,
- (iv) a v neposlední řadě studiu vlivu syntetických polyaminů na nádorově asociované fibroblasty.

V rámci disertační práce autorka využívala celou řadu laboratorních technik, od *in vitro* kultivace širokého spektra buněk (zejména pak lidské kožní fibroblasty, nádorově asociované fibroblasty, keratinocyty, maligní buňky glioblastomu a melanomu, včetně ustanovení primárních kultur z tkání), přes sledování senescence a viability buněk po působení syntetického polyaminu, přípravu kondicionovaných médií, sběru vzorků a zpracování primárních tkání odebraných pacientům, zpracování vzorků pro izolaci RNA, až po přípravu kryožezů, imunocytochemické a imunohistochemické barvení proteinů a fluorescenční a konfokální mikroskopii. Studium genové exprese v nádorech bylo provedeno ve spolupráci s Ústavem molekulární genetiky AV ČR či Institute of Applied Biotechnologies v Praze.

Jako vynikající hodnotím publikační aktivitu autorky disertační práce. Výsledky její práce byly zveřejněny v celkem 5 publikacích v časopisech s impakt faktorem. U všech těchto prací se jedná o primární experimentální vědecké publikace a všechny zveřejněné výsledky lze považovat za nové vědecké poznatky. Autorka se podstatnou měrou (v podstatě v celém rozsahu experimentů) podílela na studiu vlivu polyaminů na nádorově asociované fibroblasty a tato studie vyústila v prvoautorskou publikaci v časopise ChemBioChem, IF 3,088. Dále se podílela jako spoluautor na dalších 4 publikacích v mezinárodně uznávaných časopisech (výše impakt faktoru se pohybuje okolo 2-3). Kromě recenzovaných impaktovaných prací je MUDr. Jechová i hlavní autorkou jedné původní práce a jedné kazuistiky v časopise Otorinolaryngologie a foniatrie.

Autorka ve své práci popsala mezibuněčné interakce v různých typech nádorů (dlaždicové karcinomy hlavy a krku, glioblastom, melanom) a to nejen na úrovni jednotlivých buněk, ale studovala i extracelulární matrix. Role fibroblastů v mikroprostředí nádoru, ať už jako sekrečně aktivních buněk produkujících řadu cytokinů, chemokinů, růstových a jiných faktorů, jakož i buněk produkujících složky extracelulární matrix, stejně tak jako mezibuněčné vztahy v nádoru si jednoznačně zaslouží další výzkum. Ovlivnění nádorového stromatu může být v budoucnu podkladem pro vývoj nových léčebných přístupů.

Z formálního hlediska je disertační práce MUDr. Alžběty Jechové zpracována v rozsahu 33 stran odborného textu, 16 stran přehledu citované literatury a dále obsahuje reprints 5 publikací autorky, které jsou pro disertační práci stěžejní. Dizertační práce je velmi kvalitně zpracovaná, s jasně, zřetelně a výstižně formulovaným úvodem, hypotézami a cíli práce, dále jsou uvedeny materiál a metodika, popis výsledků, diskuze, závěr a seznam citované literatury. Práce je připravena velmi kvalitně s minimem překlepů. Jediná výtka k formě předkládané práce je k pořadí reprintů publikací, které jsou zařazeny v jiném pořadí, než jak jsou komentovány v cílech, výsledcích, diskuzi a závěrech práce a některé detailní informace jsou tak obtížně dohledatelné.

Do statí Závěr by kromě uvedených konkrétních komentářů k jednotlivým cílům práce bylo vhodné zařadit i obecnou shrnující větu či odstavec sumarizující zjištěné poznatky v obecnějších souvislostech.

K vlastní disertační práci a jejím výsledkům mám několik doplňujících dotazů, které ale nijak nesnižují kvalitu předkládané práce:

- (i) V nádorech hlavy a krku byly vaším kolektivem zjištěny rozdíly v genové expresi i charakteru extracelulární matrix. Expresí genů v okraji chirurgického resektátu byla spíše podobná expresi genů v nádorové tkáni než v nepostižené kontralaterální tkáni.
Můžeme z toho usuzovat, že vliv nádorového mikroprostředí dosahuje i mimo makroskopicky viditelnou oblast nádoru?
Zvýšená exprese galektinu-7 je v literatuře často uváděna ve stratifikovaných epitelech a u dlaždicových karcinomů hlavy a krku. Zatímco exprese galektinu-1 a 3 je spíše negativní prognostický faktor nádorů, názory na galektin -7 jako pozitivní či negativní prognostický faktor se různí. Ve vaší studii byly poměrně jednoznačně prokázány nižší hladiny mRNA pro galektin-7 v nádorech v porovnání se zdravou tkání stejného pacienta. Pozorovali jste na histologických řezech expresi galektinu-7 vázanou spíše na stratifikované oblasti tkáně a normální epitel a naopak absenci stratifikovaného epitelu u nádorové tkáně, která by mohla se sníženou expresí galektinu-7 souviset?
- (ii) Z vaší studie mikroprostředí melanomu vyplynulo, že v nádorových fibroblastech (ustavené linie od 3 pacientů s melanomem) v porovnání s fibroblasty z normální kůže dochází ke zvýšení exprese genů pro IL-6, IL-8 a CXCL-1. V předchozích studiích pracoviště školitele bylo prokázáno, že IL-6 a IL-8 stimulují invazivitu melanomových buněk *in vitro* (Jobe a kol. 2016). Samotné ozáření keratinocytů UVB zářením mělo ve vaší studii zanedbatelný vliv na invazivitu melanomových buněk. Pokud však byly do společné kultury přidány i fibroblasty, docházelo k významnému nárůstu invazivity melanomových buněk.
Sledovali jste, zda dochází ke zvýšení exprese či sekrece IL-6 a IL-8 u fibroblastů, které jsou v kontaktu s keratinocyty ozářenými UVB? IL-8 je chemokin podporující chemotaxi buněk a tento faktor sekretovaný fibroblasty by mohl přispívat ke stimulaci migrace a invazivity melanomových buněk.

Komentář: I v normální nenádorové kůži jsou fibroblasty sekrečně aktivní buňky produkující řadu faktorů ovlivňujících melanocyty (viz např. Y. Wang a kol., Journal of Dermatological Science 88 (2017) 159–166), které podporují nejen tvorbu pigmentu melaninu, ale i proliferaci či přežívání melanocytů. Zdá se, že fibroblasty v nádoru jsou jedním z klíčových zdrojů sekretovaných faktorů ovlivňujících celý nádorový ekosystém.

- (iii) U gliomů nebyla dosud jednoznačně prokázána přítomnost nádorově asociovaných fibroblastů. Proto byl ve vaší studii sledován vliv fibroblastů izolovaných z melanomu na růst a invazivitu glioblastomových buněk. Bylo zjištěno, že médium kondicionované nádorovými fibroblasty i fibroblasty z normální kůže podporuje dělení buněk gliomu, ale pouze médium z nádorových fibroblastů podporuje i invazivitu gliomových buněk.
Zdá se tedy, že fibroblasty izolované z melanomu produkují jiné chemokiny či další faktory v porovnání s fibroblasty ze zdravé tkáně. Jakými metodami by šlo obsah chemokinů v kondicionovém médiu sledovat?
- (iv) V prvuautorské publikaci kandidátky bylo zjištěno, že syntetický polyamin může snížit tvorbu myofibroblastů indukovanou TGF- β 1 a galektinem-1, ale nemá efekt na již vytvořené myofibroblasty. Zamezení tvorby myofibroblastů, aktivní formy nádorově asociovaných fibroblastů, by mohlo představovat jeden z cílů nových terapeutických zásahů.
Prosím okomentujte, jaká je role myofibroblastů v nádorech a proč předcházet jejich vzniku? Tato informace není v disertační práci uvedena, přestože je pro problematiku podstatná.

Závěrem mohu konstatovat, že disertační práce MUDr. Alžběty Jechové jednoznačně dokazuje vysoký autorčin odborný přehled a experimentální zkušenost.

Předložená disertační práce prokazuje předpoklady autorky k samostatné tvořivé vědecké práci a k udělení titulu Ph.D. za jménem.

V Liběchově dne 21.3.2019


Mgr. Helena Kupcová Skalníková, Ph.D.