



ÚSTAV EXPERIMENTÁLNEJ
ONKOLÓGIE

BIOMEDICÍNSKE CENTRUM
Slovenská akadémia vied

OPONENTSKÝ POSUDOK

Doktorandskej dizertačnej práce Ing. Michaely Kripnerovej:

“Úloha bunčného metabolizmu v karcinogenezi *Molekulárni patofyziologie chemorezistence karcinomu močového mechúra*”

Doktorandská dizertačná práca Ing. Michaely Kripnerovej študuje na molekulárnej úrovni biologické procesy súvisiace s chemorezistenciou pri nádoroch močového mechúra. V práci boli použité primárne a derivované bunkové línie tejto malignity, vhodnou kombináciou ktorých sa dosiahla špecifická adreznosť pri jednotlivých študovaných biologických aspektoch. Práca prináša viaceré nové poznatky o vzťahu medzi mnohopočetnou liekovou rezistenciou a proliferačnou aktivitou, bunkovým metabolizmom a nádorovým mikroprostredím, ktoré určite prispievajú k hlbšiemu pochopeniu molekulárnych mechanizmov determinujúcich tento závažný terapeutický problém častokrát pozorovaný práve pri pokročilom invazívnom urotelovom karcinóme močového mechúra.

Práca je napísaná v češtine na slušnej štylistickej úrovni. Je členená do štandardných kapitol, predpísaných pre tento typ prác. Po úvodných kratších kapitolách *Úvod* a *Ciele práce* sa autorka v následnej kapitole *Popis súčasného stavu poznání* venuje popisu normálneho urotelu, incidencii, etiológii, klasifikácii a liečbe karcinómu močového mechúra, modelovým bunkovým kultúram nádorov močového mechúra a ich využitiu pri štúdiu mechanizmov terapeutickkej rezistencie a iných aspektov nádorovej biológie močového mechúra. Ďalej táto kapitola všeobecne pojednáva o nádorovom mikroprostredí a metabolizme. Táto kapitola je dobre čitateľná a primeraným spôsobom uvádza čitateľa do problematiky. Spracovanie tejto kapitoly svedčí o autorkinej orientácii sa v relevantnej literatúre. K tejto kapitole mám zopár otázok/komentárov/námetov do diskusie:

1. Na str. 29 autorka pojednáva o incidencii nádorov močového mechúra. Spomína, že u mužov je to štvrtá, zatiaľ čo u žien jedenásta najčastejšia malignita. Ďalej autorka uvádza údaje z ČR, kde sa výskyt tohto ochorenia pohybuje okolo 35 prípadov na 100 000 mužov a 12 prípadov/100 000 žien. Z uvedeného vyplýva, že incidencia tohto ochorenia je u mužov približne trikrát vyššia ako žien. Dva najvýznamnejšie etiologické faktory pri tejto malignite sú vek a fajčenie. Ženy sa však dožívajú priemerne dlhšieho veku ako muži a v dnešných časoch fajčia približne rovnako (pravdepodobne len o niečo menej) ako muži. Je teda evidentné, že pohlavnú rozdielnosť v incidencii nádorov močového mechúra spôsobujú primárne iné etiologické faktory. Vedela by autorka spomenúť etiologické faktory, ktoré by selektívnym spôsobom výrazne znevýhodňovali mužov oproti ženám v zmysle incidencie tohto ochorenia?
2. Obr. 4: Je zamenená incidencia a mortalita. Nesúhlasím s tvrdením, že za posledných 30 rokov sa takmer nezmenil počet pacientov, ktorý tomuto ochoreniu podľahol. Minimálne sa dá hovoriť o zdvojnásobení.

3. V texte tejto kapitoly (ale platí to v menšej miere aj pre celú dizertačnú prácu) sa nachádzajú viaceré preklepy a na viacerých miestach vrátane obrázkov chýba uvádzanie zdrojov. Takisto by bolo potrebné zjednotiť používanie skratiek, kde by malo byť platiť, že po zavedení skratky je táto už používaná naprieč celým ďalším textom.

Experimentálnym cieľom práce, ako je uvedené v jednej z jej úvodných kapitol, bola hlbšia charakterizácia molekulárnych mechanizmov zodpovedných za vznik mnohopočetnej liekovej rezistencie pri nádoroch močového mechúra. Autorka si predsavzala odvodiť model(y) chemorezistencie na báze komplexnej patofyziologickej charakterizácie nádorového mikroprostredia a tento (tieto) korelovať s bunkovým metabolizmom. Na dosiahnutie vytýčených cieľov bola zvolená korešpondujúca metodológia a boli využité existujúce a novozałożené modelové bunkové línie spomenutej malignity. Metódy použité v doktorandskej dizertačnej práci svojou pestrosťou a náročnosťou nepochybne spĺňajú experimentálne nároky kladené na doktorandské štúdium. Pri ich popise mi však na viacerých miestach chýbajú hlbšie detaily, ako aj lepšie zdôvodnenie prečo daná metodika bola zvolená a akým spôsobom mala prispieť k získaniu údajov odpovedajúcich na kladenú/študovanú otázku. K ďalším formálnym nedostatkom tejto časti patrí neúplnosť tabuľky 11.

Kapitola *Výsledky výskumu a diskuse* prináša autorkine vlastné výsledky, ako aj výsledky iných skupín, resp. výsledky ktoré vznikli v rámci spoluprác, pričom posledne menovaný typ výsledkov tvorí podstatnú časť výsledkov doktorandskej dizertačnej práce. Je ocenené, že autorka oddeľuje vlastné výsledky od iného typu výsledkov. Je však na zváženie, či v zmysle úplnej korektnosti by pri výsledkoch vzniknutých vďaka spoluprácam nemali byť aj kvantitatívne vyjadrené príspevky jednotlivých strán.

Je evidentné, že experimentálne ciele splnené boli. Autorke sa podarilo odvodiť dva unikátne modely urotelového karcinómu a pomocou nich ukázať spätosť medzi fenotypom mnohopočetnej liekovej rezistencie na jednej strane a proliferačnou aktivitou a mitochondriálnym metabolizmom na strane druhej, ako aj nepochybniteľný vplyv stromálnych buniek na kmenovosť, proliferáciu, motilitu, metabolizmus, terapeutickú odpoveď a imunomodulačné vlastnosti nádorových buniek. Dosiahnuté výsledky majú charakter nových zistení a čas ukáže ako budú prijaté komunitou z relevantnej vednej oblasti. K tejto časti práci mám nasledovné otázky/komentáre/námety do diskusie:

1. V tabuľke 18 nie jasné, čo uvedené čísla presne znamenajú. Čitateľ sa to nemá ako dozvedieť, dokonca ani z popisu korešpondujúcej metodiky uvedenej na str. 65 (4.3 *Genetická identita bunčných línií*).
2. Vyjadrenie, že bunkové línie RT112 a RT112Heidelberg sú v porovnaní s bunkovou líniou RT112D21 citlivejšie na metotrexát, gemcitabin a doxorubicín, ale rezistentnejšie na cisplatinu, je odvážne, keďže sa opiera o pilotné výsledky, ktoré nie sú štatisticky vyhodnotené (pravdepodobne ide o výsledok jedného experimentu, keďže grafy neobsahujú ani smerodatné odchýlky). Okrem toho, priebehy grafov na obrázku 20 tomu nie veľmi nasvedčujú, resp. dané tvrdenia platia len pre veľmi zúžené koncentračné okná daných látok.

3. Čo znamená údaj *číslo vzorky* na grafoch v rámci obrázka 23?
4. Tabuľka 19 (str. 99) neuvádza hodnoty IC_{50} ako sa tvrdí na str. 90.
5. Priebehy grafov prežitia pre bunkové línie BC44 a BC44DoxoR ovplyvnené gemcitabinom, metotrexátom a vinblastinom sú pomerne neštandardné (obrázok 29). Je prekvapivé, že bunková línia BC44 nevykazuje takmer žiadnu koncentračnú závislosť v prežívaní po ovplyvnení týmito látkami. Ako štandardný/klasický prípad odpovede senzitívnej a rezistentnej bunkovej línie k určitej látke považujem výsledky MTT testu pre bunkové línie BC44 a BC44DoxoR ovplyvnené doxorubicínom. Mohla by autorka komentovať tento fakt?
6. Na to, aby sa mohlo tvrdiť, že *buňky SW780 kokultivované s BC44Fibr* jsou k TRAIL mnohe více rezistentní než samotně kultivované buňky SW780 by údaje prezentované na obrázku 45 mali obsahovať štatistické vyhodnotenie.
7. Obrázok 49 je nedostatočne označený. Nie je z neho zrejmé, čo jednotlivé stĺpce reprezentujú.
8. Rozdiel v oxidatívnom metabolizme medzi bunkovými líniami BC44 a BC44DoxoR je ukázaný na obrázku 71A a B a nie obrázku 70A a B, ako sa tvrdí na str. 122 (5.3.1 *Buněčný model BC44 a BC44DoxoR*). Podobne chybný odkaz na obrázok je aj pri spotrebe kyslíku bunkovými líniami BC44 a BC44Fibr (str. 124, správne má byť obrázok 72A a B).

Záverom konštatujem, že doktorandka splnila vytýčené ciele. Výsledky uvedené v dizertačnej práci sú súčasťou piatich publikácií, pričom doktorandka je na troch z nich prvý autor, čo dokumentuje jej výrazný podiel na nich. Na základe všetkých týchto skutočností konštatujem, že predložená doktorandská dizertačná práca spĺňa kritéria kladené na práce tohto typu a s kľudným svedomím ju odporúčam k obhajobe. Po úspešnej obhajobe odporúčam udeliť Ing. Michaele Kripnerovej akademický titul „philosophiae doctor“ (PhD.) vo vednom odbore *Fyziologie a patologická fyziologie*.

Bratislava, 9. august 2019

Mgr. Miroslav Chovanec, PhD.

