



Praha, 10.11.2023

Oponentský posudek na disertační práci MUDr. Štěpána Nováka

Název práce: Vzájemná komunikace a vztah mezi nádorovými buňkami a nádorovým mikroprostředím

Autor v práci popisuje roli nádorového mikroprostředí (tumor microenvironment, TME) v patogenezi karcinomu pankreatu (pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC) a karcinomů hlavy a krku (head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC). Detailněji se zabývá klíčovou složkou TME, a to nádorově asociovanými fibroblasty, které mohou přispívat k malignímu fenotypu onemocnění.

Téma práce je velmi vhodně zvoleno vzhledem k nutnosti lepšího porozumění vzájemných mezibuněčných interakcí a následného promítnutí těchto znalostí do možného zlepšení diagnostických přístupů a léčby pacientů.

Předložena disertační práce má 2 hlavní cíle:

- 1) Popsat chování a vzájemnou interakci mezi fibroblasty, nádorově asociovanými fibroblasty a komerčními liniemi buněk karcinomu pankreatu.
Vzájemné srovnání fenotypů nádorových buněk buněčných linií PDAC s nádorovými buňkami z ascitické tekutiny u pacientů v terminálním stádiu PDAC.
Stanovení genetického profilu fibroblastů a nádorově asociovaných fibroblastů.
- 2) Srovnání fenotypu a genetického profilu mezi tzv. „Normal mucosa cells, NM“, „Surgical resection margin cells, MSR“ a „Squamous cell carcinoma, SCC“ u pacientů s karcinomem hlavy a krku (HNSCC).

Členění práce je standardní, práce obsahuje všechny požadované části. Jedná se o přehledně napsanou práci v českém jazyce. Práci po jazykové stránce jako Slovenka, bohužel, nemůžu úplně detailně posoudit, ale celkově je práce psaná srozumitelným a čtivým jazykem s minimem překlepů. K formální stránce práce mám několik připomínek. V práci se vyskytuje pár anglicismů, v některých případech nejsou zkratky vysvětleny při první zmínce v textu, v několika případech chybí uvedení symbolu v popisu jednotek. V některých případech zkratky genů nejsou psány kurzivou, a také u některých grafů chybí popisy y-ové osi. Jako hlavní připomínku bych chtěla zmínit nedostatečné popisy obrázků. Popis obrázků musí být samovysvětlující.

Přírodovědecká fakulta UK
Katedra buněčné biologie

Mgr. Valéria Grobárová, Ph.D.

Viničná 7, 128 00 Praha

valeria.grobarova@natur.cuni.cz

telefon: 221 951 795



Literární přehled odpovídá tématu práce a je rozdělen do 4 hlavních podkapitol, a to: 1.1 Karcinom pankreatu, 1.2 Karcinomy hlavy a krku, 1.3 Nádorové mikroprostředí a 1.4 Nádorová genetika. Jeho součástí jsou i dvě přehledné tabulky, které sumarizují biologicky aktivní látky produkované nádorově asociovanými fibroblasty a potencionální terapeutické cíle protinádorové léčby. Celkově je literární přehled napsán přehledně a srozumitelně, ale podle mého názoru by některé části mohly být podrobněji popsány. Z hlediska získaných výsledků v literárním přehledu chybí zmínka o roli proteinu tzv. Milk fat globule-EGF factor 8 (MFGE8), transkripčních faktorů Slug a Snail a taktéž proteinu cadherinu v procesu epitelomezenchymální tranzice (EMT). Částečně se autor věnuje této oblasti v diskusi, ale podle mého názoru by bylo vhodnější začlenit danou část do literárního přehledu.

Autor v práci citoval 363 literárních zdrojů, z toho 85 literárních zdrojů je recentních (od roku 2018). V literárním přehledu je jednou uvedena citace v jiném formátu (jako číslovka [24] na str. 25). V seznamu použité literatury je na str. 92 nesprávně uvedená citace (označená „---.2008b“) a dvě citace jsou uvedeny duplicitně (Kolar, M. a Strnad, H.) V popisu k Obr. 1 chybí uvedení citace, odkud byl obrázek převzat.

Kapitola Výsledky přehledně shrnuje výstupy z 2 publikací, kde u jedné z nich je Štěpán Novák prvním autorem a u jedné spoluautorem dané publikace. Kapitola je podle toho rozdělena na 2 hlavní cíle. V první části autor popsal vliv nádorově asociovaných fibroblastů na jednotlivé buněčné linie karcinomu pankreatu. Dále analýzou transkriptomu nádorově asociovaných fibroblastů byla prokázána zvýšená exprese některých genů, které mohou přispívat k nádorové progresi a agresivitě. V druhé části byl prokázán statisticky významný rozdíl v expresi markerů pro tenascin (Ten), fibronektin (Fn) a galektin 1 (Gal-1) mezi vzorky SCC, NM i MSR. Získaná data byla porovnávána s klinickými údaji o přítomnosti uzlinových metastáz a také s přežitím pacientů. Analýzou genové exprese autor zjistil zvýšenou expresi několika genů souvisejících s nádorovou progresí u Ten⁺ SCC a s metabolismem lipidů v MSR Ten⁻ SCC.

K výsledkové části mám několik připomínek. V první řadě autor v práci neuvádí počet opakování jednotlivých experimentů. Grafy týkající se velikosti a počtu kolonií (Obr. 2 a 3) nemají směřodátné odchylky, a proto je obtížné posoudit statistickou signifikanci získaných výsledků. Pro korektní zobrazení získaných hodnot by bylo vhodnější namísto sloupcového zobrazení vynášet do grafů jednotlivé hodnoty za konkrétní experiment (za jednotlivá měření). Podobně je to i u podkapitoly 1.7 ELISA detekce IL6, IL8 a MFGE8 linií PDAC a HF/PANF, kde není zřejmé, kolikrát byla daná analýza provedena, jaký je počet opakování a také nejsou data statisticky zobrazena v grafu.

Co se týče metody Western blot, chybí její kvantitativní vyhodnocení (a taktéž nejsou uvedeny molekulární hmotnosti pro jednotlivé proteiny), a proto je obtížné posoudit rozdíly v expresi jednotlivých proteinů.



Pomocí imunofluorescenčního barvení byla na fenotypové úrovni hodnocena diferenciace epiteliálních buněk, EMT a rychlost proliferace. Autor dané výsledky shrnuje v přehledné tabulce, ale pro korektnost je nutné uvádět i samotná primární data z mikroskopie. Podobně je to i u podkapitoly 4.2.1 Imunofluorescenční detekce Ten, Fn a Gal-1 u SCC, NM a MSR. V podkapitole 4.1.6 Imunohistochemická a Western blot analýza PANF chybí výsledky z WB analýzy.

K práci mám následující dotazy:

- 1) Jelikož to v práci není uvedeno, chtěla bych se zeptat, jaký byl podíl autora na jednotlivých publikacích?
- 2) Jaký byl počet opakování (biologických a technických replikátů) u jednotlivých experimentů?
- 3) U Western blot analýzy proteinu E-cadherin je v některých případech uveden jeden proužek a v některých dva (Obr. 4). Můžete daný výsledek komentovat, má to nějakou biologickou relevanci?
- 4) Jaké nové poznatky přinesla single-cell RNAseq analýza nádorového mikroprostředí vzorků PDAC od pacientů? Současný výzkum s využitím této metody poukazuje na to, že chemoterapie může ovlivnit TME a následně imunoterapii. Můžete to blíže komentovat?

Předložená práce celkově přispívá k propojení poznatků ze základního výzkumu s klinickou praxí. Lepší pochopení komplexnosti vzájemných mezibuněčných vztahů v nádorovém mikroprostředí je předpokladem ke zlepšení přístupů v diagnostice a následné léčbě. V neposlední řadě výzkum v této oblasti vede k přechodu od univerzálních k individuálním léčebným postupům a celkově k lepší stratifikaci pacientů a zavedení personalizované medicíny do praxe.

Posuzovaná práce splňuje požadavky na disertační práci v doktorském studijním programu Experimentální chirurgie na 1. LF UK, doporučuji její přijetí a po úspěšné obhajobě udělení titulu „Ph.D.“ za jménem.

Mgr.  ria Grobárová, Ph.D.

Přírodovědecká fakulta UK
Katedra buněčné biologie

Mgr. Valéria Grobárová, Ph.D.

Viničná 7, 128 00 Praha

valeria.grobarova@natur.cuni.cz

telefon: 221 951 795