

V Praze dne 2. 9. 2014

Oponentský posudek na disertační práci MUDr. Jaroslava Betky „Směřovaná polymerní léčiva u karcinomů v oblasti hlavy a krku“

Práce je z větší části věnována problematice nádorů karcinomu hlavy a krku, a to z různých aspektů od populační studie, ve které byla analyzována souvislost mezi závislostí na kouření/nikotinu a incidencí nádorů hlavy a krku přes *ex vivo* studii interakce nádorových buněk s fibroblasty po srovnávací analýzu zastoupení jednotlivých subpopulací lymfocytů u pacientů se spinocelulárním karcinomem hlavy a krku se zdravými jedinci a korelaci s časnou recidivou onemocnění. Další práce, ze které vznikla publikace, kde je MUDr. J. Betka prvním autorem, je částečně metodická. V rámci této studie byla zavedena metodika aspirační biopsie tenkou jehlou pro získání vzorků z myších nádorů a pomocí této metody bylo analyzováno zastoupení jednotlivých subpopulací lymfocytů v mikroprostředí experimentálních nádorů léčenými různými preparáty doxorubicinu ve formě směrovaných polymerních léčiv. V této studii byl použit myší model pro T lymfomy EL-4, nikoliv model pro karcinom hlavy a krku. Název disertační práce je tudíž zavádějící, protože se jedná o souhrn prací zaměřených na nádory hlavy a krku, ale nikoliv na polymerní směrovaná léčiva a jedné práce s tématem polymerních směrovaných léčiv, kde však nebyl použit model pro nádory hlavy a krku.

Po formální stránce je disertační práce pojatá spíše netradičně. Není členěna na literární úvod, výsledkovou část (s příloženými pracemi) a diskusi, ale místo toho je podán literární přehled o vybraných kapitolách onkologie a nádorové imunologie, do kterého jsou na relevantních místech vložena abstracta jednotlivých publikací. Kopie celých článků jsou na konci jako přílohy. Tento způsob odpovídá tomu, že tematický záběr jednotlivých publikací je poměrně široký. Takto je práce celkem logicky koncipovaná, a protože je i dobře napsaná s minimem chyb a překlepů, dobře se čte. Nicméně literární přehled, který vychází z 229 citací, mohl být více specifický a úžeji zaměřený. Některé kapitoly by mohly být kratší (Incidence nádorových onemocnění, Diagnostické metody používané při odhalování nádorů) a naopak, vzhledem k publikaci č. 3 o analýze tumor infiltruujících lymfocytů ze vzorků získaných aspirační biopsií tenkou jehlou, by v práci měly být kapitoly o mikroprostředí nádoru a tumor infiltruujících leukocytech. Připomínku mám však k abstraktu práce, který je spíše stručným úvodem a chybí v něm stručný přehled výsledků.

V rámci analýz v oblasti patogeneze nádorových onemocnění jsou prezentovány výsledky dvou studií publikované ve dvou pracích. V první z nich, multicentrické studii uveřejněné v International

Journal of Cancer, je MUDr. J. Betka jedním ze spoluautorů. V této práci bylo za pomoci analýzy dat získaných z dostatečně velkého souboru jedinců zjištěno, že pacienti s vyšším stupněm závislosti na nikotinu mají také vyšší riziko výskytu nádorů hlavy a krku a jako pravděpodobné vysvětlení byla nalezena závislost na vykouření první ranní cigarety. Tyto poznatky rozšiřují naše znalosti o vlivu kouření a konzumace alkoholu na vznik nádorů hlavy a krku a mohou přispět k účinnější prevenci onemocnění. Ve druhé práci se autor obrátil k problematice nádorových kmenových buněk a interakci nádorových buněk s buňkami stromatu. Na modelovém systému, kdy byly kokultivovány buňky lidské nádorové linie FaDu s fibroblasty získanými z pacientů s nádory hlavy a krku a fenotypovou analýzou pomocí průtokové cytometrie bylo zjištěno, že jak přímá tak nepřímá kokultivace fibroblastů s buňkami nádorové linie vedla k expresi znaků nádorových kmenových buněk na buňkách nádorové linie. Důležité je zjištění, že k navození fenotypu kmenových nádorových buněk u části buněk stačí i nepřímá kokultivace s fibroblasty, což ukazuje na parakrinní regulaci. Tyto výsledky jsou důležité, byť ne zcela nové a spíše předběžné a musí být interpretovány ve spojení s výsledky dalších studií (i ze stejného pracoviště), např. těch, které prokázaly roli IL-6, IL-8 a CXCL-1 v parakrinní regulaci. Vzhledem k tomu, že tyto cytokiny hrají důležitou roli v regulaci proliferace nádorových buněk a indukcii buněčné senescence, vyvstává řada otázek týkajících se proliferace a dalšího osudu nádorových buněk exprimujících znaky kmenovosti.

Další dvě práce jsou zaměřeny na nádorovou imunologii. V první z nich, studii na myším modelu T lymfomu, publikované v J. Drug Target, kde je MUDr. J. Betka prvním autorem, byla nejprve zavedena metodika aspirační biopsie tenkou jehlou pro získání vzorků z myších nádorů v daném modelu. V následujících experimentech bylo analyzováno zastoupení jednotlivých subpopulací lymfocytů v mikroprostředí experimentálních nádorů léčenými různými preparáty doxorubicinu ve formě směrovaných polymerních léčiv (volného, navázaného na HPMA amidickou nebo hydrazinovou vazbou). Metoda se ukázala být velmi užitečná a s její pomocí byla prokázána souvislost mezi infiltrací CD3⁺ T buněk a účinnější terapií doxorubicinem v komplexu než volným. Otázkou je, zda vyšší účinnost terapie komplexovaným doxorubicinem je dána jeho vyšší koncentrací v mikroprostředí nádoru ve srovnání s terapií volným doxorubicinem nebo vyšší účinností komplexovaného doxorubicinu v buňkách.

Ve druhé práci z oblasti nádorové imunologie bylo analyzováno procentuální zastoupení lymfocytů u pacientů se spinocelulárním karcinomem hlavy a krku. Zde je nejdůležitější zjištění, že byla zjištěna korelace počtu Treg lymfocytů v periferní krvi v době stanovení diagnózy a časnou recidivou onemocnění a také signifikantní zvýšení Treg populace u pacientů ve srovnání se zdravými

jedinci. Tyto výsledky jsou důležité, protože otázka prognostické hodnoty procenta Treg v periferní krvi u nádorových onemocnění je dosud nejasná a kontroverzní.

MUDr. Jaroslav Betka prokázal, že je schopen samostatně vědecky pracovat a v rámci práce zvládl náročné metodiky, práci s lidským materiálem i experimenty na myším modelu a získal nová data, která byla publikována ve čtyřech článcích. Doporučuji proto, aby práce byla přijata jako podklad pro udělení titulu PhD.

Dotazy k diskusi:

1. Práce je složena z obsáhlých a metodicky náročných publikací, které mají velký počet spoluautorů (až 29 u článku v International Journal of Cancer). Můžete specifikovat svůj podíl na jednotlivých publikacích a metodiky, které jste používal?
2. Studovali jste nebo budete dále studovat vliv kokultivace nádorových buněk s fibroblasty na proliferaci nádorových buněk a rozdíly v proliferaci u většinové populace a buněk exprimujících znaky kmenovosti, případně vedlejší populace?
3. Co je známo o vlivu kokultivace fibroblastů s nádorovými buňkami na indukci produkce IL-6, IL-8 a CXCL1?
4. Máte nějaké výsledky dokumentující vliv terapie komplexy doxorubicinu na procento apoptotických buněk, případně buněk v genotoxickém stresu v nádoru a také na procento myeloidních buněk (makrofágů, myeloidních supresorických) infiltrujících nádor?
5. Jaký je váš názor obecně na možnosti využití stanovení procenta Treg lymfocytů v periferní krvi nebo mikroprostředí nádoru jako prognostického znaku?


RNDr. Milan Reiniš, CSc.

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