

V Plzni dne 25. 9. 2006

Oponentský posudek na doktorskou disertaci Mgr. Martina Pešty „Sledování biologické aktivity kolorektálního karcinomu metodou Real-Time PCR“

Práce Mgr. Martina Pešty je věnována problematice kolorektálního karcinomu, jednoho z nejčastějších zhoubných novotvarů v populaci České republiky. Cílem disertace bylo vyvinout diagnostické metody na úrovni molekulární biologie, které umožní vyhodnotit metabolické vlastnosti vyšetřované nádorové tkáně a tím umožnit klinikům aplikovat cíleně vybraná cytostatika či jejich kombinace z možností, které jsou v současnosti pro léčbu kolorektálního karcinomu Českou onkologickou společností doporučovány. Vyšetřování genových expresí mRNA je metoda velice náročná a hodnotitel nemá informace, že by tato technologie byla k uvedeným účelům na některých z pracovišť v naší republice zavedena a využívána. Přitom se dle zahraničních zkušeností tyto metody využívají k předpovědi vhodné terapie zhoubných novotvarů zatím sice v rámci klinických studií, nicméně s velmi nadějnými výsledky. Téma práce proto pokládám za vysoce aktuální a očekávané výsledky za velmi důležité pro kliniky zabývající se problematikou kolorektálního karcinomu.

Úvodní kapitoly dizertace jsou věnovány obecné biologii nádorového procesu, zejména procesu onkogeneze. Autor pohlíží na rakovinu jakožto na autoakcelerační proces, kdy se v průběhu nemoci fenotyp i genotyp nádorových buněk podstatně vyvíjí. Značnou pozornost věnuje problematice buněčného cyklu, a prognóze, a nádorově prognostickým genům. Mutace antionkogenů jsou zodpovědné za některé syndromy, jejichž podstatou je dědičný výskyt různých kombinací zhoubných novotvarů. Autor věnuje pozornost zejména mutacím genu p53 (tzv. strážce genomu) a syndromu zvaném Li Fraumeni syndrom, nezapomíná na mutace genů BRCA-1 a BRCA-2, APC gen, genů NF-1 a NF-2, WT1, VHL a DCC genu. Z genů různých faktorů, které působí jako onkogeny, věnuje pozornost tzv. rodině EGFR, genům jaderných transkripčních faktorů a genům cyklinů a cyklin-dependentních kináz, které mohou fungovat jakožto onkogeny.

V další části práce se autor věnuje problematice matrixových metaloproteináz, které hrají významnou roli v progresi řady nádorových onemocnění. Jejich tkáňové inhibitory smají rovněž význam v patogeneze nádorových onemocnění, proto se jeví logické vyšetřovat exprese matrixových metaloproteináz i jejich tkáňových inhibitorů u konkrétních nádorových linií kolorektálního karcinomu i u tkáňových vzorků vyšetřovaných pacientů.

Metabolismus fluoropyrimidinů může být u nádorů od různých pacientů velmi odlišný, což je patrně jednou z příčin rozdílných výsledků protinádorové terapie. Proto se autor zamsěřil na geny metabolismu pyrimidinů – thymidilát syntázy, thymidin fosforylázy a dihydropyrimidin dehydrogenázy.

Další kapitoly dizertace jsou věnovány epidemiologii a formám kolorektálního karcinomu, odlišuje zde formy sporadické a hereditární. Je dobře popsána patogeneze uvedených nádorů, jejich klinická klasifikace a detailně jsou popsány i nádorové markery u těchto onemocnění.

Úvod k Metodice práce seznamuje čtenáře s různými technologiemi měření genové exprese.

K vlastním cílům disertace patřilo celkem 6 bodů (vypracovat metody stanovení genové exprese genů matrixových metaloproteináz a jejich tkáňových inhibitorů, stanovit

jejich expresi metodou kvantitativní PCR u nádorových linií buněk kolorektálního karcinomu, ve vzorcích zdravé tkáně, ve vzorcích biopsií odebraných nádorů a u nezhoubných novotvarů. Dále se autor zaměřil na stanovení exprese genů metabolismu pyrimidinů, rovněž metodou RT-PCR ve vzorcích nádorové i nenádorové tkáně a výsledky plánoval porovnat s klinickým stavem a vývojem onemocnění a s biologickými vlastnostmi nádorových linií. Také se zaměřil na stanovení přítomnosti mutace K-ras genu kodon 12 v odpovídajících vzorcích nádorové i nenádorové tkáně. Vyšetřil celkem tři lidské nádorové linie primárního či metastazujícího kolorektálního karcinomu a dále pak soubor 38 pacientů s touto chorobou. Vlastní metodologie je velmi podrobně popsána včetně návrhů parametrů pro stanovení jednotlivých genů a house-keeping genu. Dále jsou popsány přípravy standardů, sekvence klonovaných standardů a vlastní provedení polymerázové řetězové reakce v reálném čase. V práci je zahrnuta i bohatá dokumentace tvořená konkrétními záznamy PCR v reálném čase. Autor si ověřil dobrou reprodukovatelnost použitých metodik, než přistoupil k vlastnímu měření v práci sledovaných parametrů. Soubor nemocných byl podrobně definován podle klinické klasifikace a statistická analýza byla provedena s využitím adekvátních testů.

Výsledky dizertace, které autor porovnal s dalšími literárními údaji v obsáhlé diskusi, jsou vyjmenovány v závěrech dizertace:

1. Navrhl primery a optimalizoval podmínky provedení kvantitativní PCR pro stanovení exprese genů MMP-7, TIMP-1, MMP-2 a TIMP-2.
2. Zaznamenal přítomnost exprese genů GAPDH, TIMP-1 a TIMP-2 u nádorových linií HT-29, SW480 a SW620. Zaznamenal vysokou hladinu exprese MMP-7 u linie HT-29. Exprese je o 2-3 řády vyšší než u linií SW480 a SW620. Expresi mRNA MMP-2 u linie HT-29 nezaznamenal. Expresi mRNA MMP-2 detekoval u linií SW480 a SW620.
3. Zjistil, že stanovení exprese absolutně a relativně je u nádorových linií ekvivalentní.
4. Prokázal signifikantně vyšší expresi mRNA MMP-7, TIMP-1, MMP-2 a TIMP-2 v nádorové tkáni oproti normální tkáni. Lze využít při terapii.
5. Nezaznamenal korelaci přítomnosti exprese genů MMP-7, TIMP-1, MMP-2 a TIMP-2 s celkovým přežitím a DFI.
6. Zjistil, že vyšší stadium nádorového onemocnění odpovídá vyššímu mediánu hodnot poměru MMP-2/TIMP-2.
7. Nezaznamenal rozdíl mezi expresí genů TS, TP a DPD v kontrolní a nádorové tkáni.
8. Zaznamenal hraničně signifikantní zvýšení exprese TS u nádorů kolon ve srovnání s tumory rektosigmoidea a rekta. Toto zjištění lze využít při volbě terapie.
9. Zaznamenal hraničně signifikantní korelaci mezi expresí TS a DPD. Toto zjištění lze využít při volbě terapie.
10. Nezaznamenal korelaci hladiny exprese mRNA TS, TP a DPD s celkovým přežitím a DFI.

Dotazy oponenta pro autora dizertace:

Pane magistře, v závěrech dizertace, konkrétně v bodech 4, 8 a 9, zmiňujete, že zjištění zde prokázaná lze využít v terapii kolorektálního karcinomu. Otázka zní, jaká konkrétní léčebná schémata byste na základě uvedených výsledků doporučoval podat.

Další dotaz je z oblasti literárních odkazů, zdali máte informace o tom, že se takto cíleně podávána chemoterapie u kolorektálního karcinomu již používá a jaké jsou její výsledky.

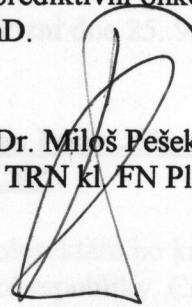
Závěr oponenta:

Autor dizertace splnil vytýčené cíle a vypracoval technologii kvantitativní PCR a využil ji ke konkrétním vyšetřování biologických vlastností nádorových buněk kolorektálního

karcinomu. Práce zasluhuje ocenění nejen za konciznost a vyváženost částí literárních a částí metodické, ale je třeba zvláště ocenit zvládnutí vysoce náročné špičkové technologie. Tato dizertace dokládá připravenost laboratoře, dizertanta i týmu, se kterým dizertant spolupracoval, pro účast plnění výzkumných úkolů v oblasti prediktivní onkologie.

Doporučuji oborové komisi udělit dizertantovi titul PhD.

prof. MUDr. Miloš Pešek, CSc.
přednosta TRN kl. FN Plzeň



UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Lékařská fakulta v Plzni

klinika nemocí plicních a tuberkulózy

přednosta: Prof. MUDr. Miloš Pešek, CSc.

Dr. E. Beneše 13, 305 99 Plzeň