

## Posudek oponenta dizertační práce

**Autor:** MUDr. Jarmila Kruseová

**Název:** Metalothioneiny a další biomarkery v terapeutickém rozhodování u dětských onkologických pacientů

**Studijní obor:** Preventivní medicína

**Školitel:** prof. MUDr. Tomáš Eckschlager, CSc.

**Oponent:** Mgr. Martina Raudenská, PhD.

### **Zvolené téma**

Téma je velmi aktuální a v rámci onkologické medicíny prioritní. Predikce progresu či relapsu onkologického onemocnění na základě hladin jednoduše stanovitelného sérového biomarkery by mohla výrazně přispět ke zlepšení prognózy dětských onkologických pacientů. Testování nových biomarkerů vidím jako velmi přínosné, zvláště pak, jsou-li výsledky potencionálně přenositelné do klinické praxe.

### **Použité metody**

Metodika použitá k detekci metalothioneinu v séru pacientů patří mezi progresivní elektrochemické metody a v práci bylo dokázáno, že její výsledky jsou reprodukovatelné a srovnatelné s rutinně používanými metodikami imunodetekce, jako je například ELISA. Soubor pacientů N=172 a počet změřených sér N=865 je rovněž dostatečný pro zvolenou statistickou analýzu a lze z něj s jistou opatrností odvozovat autorkou uváděné závěry.

### **Formální zpracování**

Ačkoliv se předložená práce zabývá velmi aktuálním a zajímavým tématem a rovněž výsledky jsou přínosné a zajímavé, její úroveň je snížena kvalitou a grafickým výstupem českého textu. Celá práce tak působí poněkud nedotaženě.

V česky psané části práce je k vidění řada překlepů a gramatických chyb (zmatená interpunkce ve větách, chybné skloňování, či hrubka na str. 41: „*Glioblastomy měli*“). Dále se v textu vyskytuje poměrně mnoho nejednoznačných formulací, či dokonce formulace úsměvné (např. str. 40: „*Díky tomu, že metalothionein je termostabilní protein, mohli jsme pro jeho měření využít séra zbylá po rutinním biochemickém vyšetření, která by se jinak po dvou dnech automaticky zničila*“ či str. 22: „*U dětí jsou nádorová onemocnění také druhou nejčastější příčinou smrti po úrazech.*“). Některé formulace jsou bohužel zavádějící až nesprávné (viz str. 16: „*Metalothionein 1 má nejvyšší efekt na angiogenezi.*“ To je poměrně odvážné tvrzení, nebo str. 18: „*Tato práce prokázala statisticky signifikantní pozitivní korelaci mezi hladinou sarcosinu a hladinou metalothioneinů stanovovanou kapilární elektroforézou a Brdičkovou reakcí, což potvrzuje předpoklad, že sarcosin a metalothioneiny se zapojují do karcinogeneze nádorů prostaty.*“ Korelace výsledků dvou metod neznamená, že byl prokázán jakýkoli vliv na karcinogenezi.). Typografické chyby jsou tak časté, že je zde nebudu jednotlivě komentovat. Popisy obrázků jsou nedostatečné, protože u většiny z nich chybí legenda a pokud se legenda vyskytuje, je psána anglicky, což mi v českém textu vadí. Podle obecných zvyklostí se název obrázku i legenda umísťují pod obrázky, což autorka nedodržuje.

## Připomínky

1. Na str. 19 je uvedeno, cituji: „*V další studii (Kanda et al., 2009) prokázali, že metalothioneiny stanovené metodou RT PCR v hepatocelulárním karcinomu působí jako tumor supresorové geny, které ovlivňují hypermethylaci.*“ V citovaném článku však, dle mého názoru, chtěli říct něco jiného. Je zde uvedeno, že hypermetylace promotoru MT1G je zřejmě zodpovědná za umlčení genu *MT1G* a ne, že *MT1* ovlivňuje hypermetylaci. Anglický text citovaného článku zní takto: „*Our results indicated that MT1G acts as a tumor suppressor gene in HCC. Moreover, findings suggested that the mechanisms of MT1G silencing are related to promoter hypermethylation.*“
2. V tabulce 1 je uvedeno rozdělení metalothioneinů. Publikace, ze které byla tabulka převzata (Peterlová et al., 2004) není uvedena v seznamu literatury, takže nelze zjistit, zda chyby v tabulce se vyskytující vznikly vinou chybného přepisu, nebo jsou již součástí citované publikace. Každopádně, názvy jednotlivých izoform nejsou v několika případech v souladu s uváděným swiss-prot označením (např.: P80297 není *MT1L*, jde o *MT1X*, viz výstup z databáze (**P80297** (*MT1X\_HUMAN*) Reviewed, UniProtKB/Swiss-Prot)). V tabulce je rovněž několik překlepů a dalších nepřesností. Klasifikace metalothioneinů je však velmi obtížná a chyby jsou pochopitelné. Pro lepší přehled o klasifikaci a nomenklatuře metalothioneinů doporučuji navštívit databázi HGNC (<http://www.genenames.org/genefamilies/MT>).
3. V tabulce 2 autorka uvádí sekvenci aminokyselin v metalothioneinu 1 a 2. Tato sekvence však není lidská, jak by se dalo očekávat v práci o lidských biomarkerech, jde o sekvenci králíci.
4. Údaje o relapsu v tabulce 6 si protiřečí s větou uvedenou na str. 36: „*Průměrná hladina metalothioneinů během sledování u pacientů, kteří recidivovali před zjištěním recidivy byla 2,34 μM, pacienti, kteří zůstali v dlouhodobé kompletní remisi, měli hladiny 2,67 μM.* V tabulce je v kategorii relaps-ano uvedeno 2,67 a relaps-ne 2,34.
5. Na str. 10 je uvedeno, cituji: „*Reverzně transkripční polymerázová řetězová reakce /RT-PCR/ a Northern blotting stanovuje hladinu mediátorové ribonukleové kyseliny (mRNA) jednotlivých metalothioneinů....*“ Autorka cituje článek z roku 1996. V dnešní době se ke stanovení hladin exprese mRNA běžně používá qRT-PCR (kvantitativní real-time polymerázová řetězová reakce) s využitím fluorescenčních sond a uvedené metodiky jsou spíše okrajové.
6. Na str. 37 je tabulka 6 nadepsána jako: „*Korelace aktivity nádorového onemocnění s hladinou metalothioneinů.*“ Pokud se tabulka jmenuje korelace, lze očekávat nějaký test na zjištění korelací. Výsledky v tabulce jsou však hodnoceny t-testem, který korelace nezjišťuje.
7. Při psaní práce většího rozsahu doporučuji používat nějaký citační manažer např. Endnote, lze se tak vyhnout zbytečným chybám (neúplný seznam literatury, komolení jmen autorů viz Kyvaati Z. je ve skutečnosti Kayaalti Z., Kizek je ve skutečnosti Kizek atd.).

## Otázky

1. V závěru práce uvádíte, že dětští pacienti s různými typy solidních nádorů mají vyšší hladinu sérových metalothioneinů ve srovnání s kontrolní skupinou zdravých mladých dospělých jedinců, se skupinou dětí s onemocněním ledvin a také ve srovnání se skupinou zdravých dětí popsanych v literatuře. Lze stanovit nějakou konkrétní hladinu sérového metalothioneinu, jejíž překročení již znamená riziko? Jaká by byla senzitivita a specificita takového markeru ve Vašich analyzovaných skupinách?
2. V textu je volně zaměňován pojem relaps a recidiva onemocnění, někdy se však tyto pojmy rozlišují (viz <http://www.fnbrno.cz/nemocnice-bohunice/interni-hematologicka-a-onkologicka-klinika/slovnicek-pojmu/t1278>). „*Termínu “relaps” je podobný termín recidiva. Ten se však používá hlavně pro označení znovuobjevení nemoci (nádoru), který se pokládal za zcela vyléčený.*“

*Třeba po operaci karcinomu konečníku, kdy byl odstraněn totálně celý nádor, a choroba byla pokládána za vyléčenou, se po letech objeví zhoubný nádor v jiné části tlustého střeva. V těchto případech mluvíme o recidivě nádoru.*“

Šlo tedy u konkrétních pacientů o relaps, nebo o recidivu nádorového onemocnění (nový nádor se objevil třeba v jiné lokalizaci)? Pokud se tyto pojmy ve Vaší skupině pacientů nepřekrývají, byl nějaký rozdíl v hladinách metalothioneinu u skupiny s relapsem a s recidivou nádorového onemocnění jako takového?

3. Co konkrétně chtěla autorka vyjádřit větou na str. 20? Cituji: *„Další multivariantní studie u nádorů prsu také nepotvrdila souvislost mezi expresí metalothioneinů jak na úrovni mRNA tak ani na úrovni proteinů a horší prognózou, vzhledem k silné asociaci metalothioneinů s dalšími faktory negativně ovlivňující prognózu tohoto onemocnění.*“
4. Co myslela autorka nerovnováhou ROS a oxidativního stresu v tvrzení ze str. 27? Cituji: *„Nejen septický šok, ale i řada dalších pediatrických onemocnění má souvislost s nerovnováhou mezi ROS a oxidativním stresem.*“
5. Jaký byl podíl autorky na experimentální části práce?

### ***Doporučení k obhajobě***

Vzhledem ke skutečnosti, že je MUDr. Jarmila Kruseová autorkou a spoluautorkou několika publikací v zahraničních časopisech s impakt faktorem a odvedla kvalitní a náročnou práci při sběru klinických dat, předloženou práci doporučuji k obhajobě.

V Brně dne 11.6.2014

---

Mgr. Martina Raudenská, Ph.D.