

Oponentský posudek dizertační práce

Vztah nádorového genotypu a fenotypu k diagnostice, prognóze a predikci kolorektálního karcinomu

Autor: **Mgr. Pavel Pitule**, Ústav histologie a embryologie Lékařské fakulty v Plzni, Univerzity Karlovy v Praze

Oponent: doc. RNDr. Ondřej Slabý, Ph.D., Masarykův onkologický ústav, Brno

Předkládaná dizertační práce je tvořena dvěma nezávislými studii: (i) studiem tkáňových hladin proteinů CD133 a CD44 jako znaků nádorových kmenových buněk a jejich korelací s klinicko-patologickými znaky pacientů s kolorektálním karcinomem, (ii) studiem exprese sady genů literárně spojených s metastazováním kolorektálního karcinomu a vyhodnocením jejich vlivu na prognózu onemocnění.

Práce o rozsahu 122 stran je členěná standardním způsobem, psána bez překlepů, čtivě a koncizně, je doplněna úctyhodnými 267 literárními odkazy, vesměs recentními a přílohami, které představují originální práce, ve kterých je student prvním autorem, případně spoluautorem.

Publikační aktivita související s tématem dizertace je tvořena pěti původními pracemi in extenso s IF (2x první autor, 3x spoluautor), dvěma přehledovými pracemi v recenzovaném časopise, z toho jedenkrát v časopise s IF (2x jako první autor) a dále třemi originálními pracemi in extenso s IF mimo téma dizertační práce (3x jako spoluautor). Publikační aktivitu celkově hodnotím jako vysoce nadstandardní.

„Teoretická část“ o rozsahu 39 stran je přehledná, vystihuje podstatu dizertační práce, je logicky členěná na kapitoly zaměřené na epidemiologii kolorektálního karcinomu, charakteristiku nejčastějších hereditárních forem kolorektálního karcinomu, popis základních drah kancerogeneze u karcinomu sporadického, význam zánětu a nádorových kmenových buněk v patogenezi kolorektálního karcinomu, současné ale i nově zaváděné metodiky v diagnostice, molekulární taxonomii, léčebné postupy, prognostické a prediktivní znaky. Čtenáři umožňuje komplexní pohled na studovanou problematiku a bezproblémové pochopení následujících kapitol. Snad jen kapitola věnovaná problematice kmenových buněk mohla být zpracována více detailně, především pak se zaměřením na studie prováděné u karcinomu rekta léčeného neoadjuvantní chemoradioterapií. Jedná se o ideální model, protože u těchto pacientů je k dispozici tkáň před zahájením a po ukončení léčby a lze tak studovat vliv selekce právě na populaci tzv. nádorových kmenových buněk. Z hlediska jazykového nepovažuji za úplně šťastné slovní spojení „prediktivní znak pro léčbu...“, jedná se určitě o prediktivní znak odpovědi na léčbu. „...prognostické znaky pro anti-angiogenní léčbu“ jsou v přímém rozporu s definicí prognostického znaku. Prognóza je definována jako ukazatel vývoje onemocnění nezávislý na podávané léčbě.

„Cíle“ jsou explicitně definovány ve čtyřech hlavních bodech, zjednodušeně: (i) popsat vztahy mezi hladinami CD133 a CD44 v tkáni primárního a sekundárního nádoru téhož

pacienta, (ii) ověřit prognostický význam CD133 a CD44 u pacientů s kolorektálním karcinomem, (iii) popsat rozdíly v expresi sady vybraných genů v nádorové a párové nenádorové tkáni, (iv) ověřit korelaci exprese těchto genů s klinicko-patologickými znaky pacientů s kolorektálním karcinomem, především parametry přežívání.

Kapitola „Materiál a metodika“ je charakterizována popisem klíčových metod, včetně detailního popisu souboru pacientů, imunohistochemické detekce a kvantifikace, metodiky izolace RNA, reverzní transkripce, designu primerů a kvantitativní PCR. Pečlivě je popsána rovněž statistická analýza dat. Kapitola tak umožňuje bezproblémové opakování všech prováděných analýz včetně jejich hodnocení. Zde postrádám především detailnější popis způsobu kvantifikace genové exprese (viz otázky do diskuze).

„Výsledky“ jsou uvedeny zcela konkrétně, doplněny řadou grafů, většinou charakteru Kaplan-Meierových křivek přežití. Autor zde popsal pozorování, která učinil v souladu s naplňováním jednotlivých cílů svojí dizertační práce. Zde bych uvítal detailnější zpracování, především se zaměřením na základní popis získaných dat formou přehledných tabulek: distribuce hodnot v souboru u imunohistochemických měření, relativní exprese studovaných genů u jednotlivých podskupin pacientů (medián, 25-75 percentil). Při korelačních analýzách muselo být získáno veliké množství negativních dat, které téměř nejsou prezentovány.

V „Diskuzi“ jsou postupně interpretovány a kriticky hodnoceny výsledky jednotlivých cílů dizertace v souvislosti s nejnovějšími pracemi v dané oblasti. Diskuze je dostatečně detailní a poskytuje čtenáři možnost dobře zařadit výsledky práce do kontextu současného stupně poznání. Je diskutován jak metodický přístup, tak konkrétní výsledky. Kromě originálních poznatků, autor ve většině případů potvrdil dřívější a obecně akceptované, což naznačuje nejen reprezentativnost zkoumané kohorty pacientů, ale také správnost používaných metodických přístupů. Pozorování, která byla kontradiktorní ve vztahu k dřívějším studiím jsou dostatečně diskutována.

Z formálního hlediska jsem nenalezl žádné závažné nedostatky a ani při důkladném čtení žádné překlepy. Zmínil bych snad jen ne zcela systematické používání s a z v odborných termínech (např. sensitivita versus cytoplazma, intensita jinde intenzita) případně používání nesprávné vazby jako například „CD133 protein“ nebo „CD44 pozitivitou“ namísto protein CD133 nebo pozitivitou CD44. Rovněž zkrácené označení skupiny pacientů podstupujících radikální chirurgický zákrok jako „radikální skupina“ není úplně šťastné. Pojmy jako overall survival (OS) neboli celkové přežití, případně disease-free interval (DFI) neboli interval přežití bez příznaků nemoci mají svoje definice a nelze je používat mimo rámec této definice. Není proto možné stanovit celkové přežití dvakrát jednou od operace primárního nádoru a po druhé od operace metastázy (str. 62).

Nové poznatky

V souladu s definovanými cíli autor

- 1) popsal korelaci znaků nádorových kmenových buněk CD44 a CD133 v tkáních primárního a sekundárního nádorů u pacientů s kolorektálním karcinomem a identifikoval významnou korelaci mezi pozitivitou znaku CD133 v primárním nádoru a v nádoru metastatickém,

- 2) popsal pozitivní korelaci hladin CD133 s přežíváním pacientů s kolorektálním karcinomem, což je v rozporu s dosavadním vnímáním funkce tohoto proteinu v patogenezi kolorektálního karcinomu,
- 3) popsal vztah proteinů CD133 a CD44 ke gradu, tedy stupni dediferenciace kolorektálního karcinomu,
- 4) u 10 ze 12 studovaných genů popsal signifikantně rozdílně hladiny exprese v nádorové a nenádorové tkáni tlustého střeva,
- 5) u genů VSNL1, SLC26A2, CLDN23, ACSL5 a LRG5 pozoroval signifikantní vztah k prognóze onemocnění.

Význam pro společenskou praxi a další rozvoj vědy

Výsledky práce byly publikovány v recenzovaných časopisech s IF – lze tedy očekávat citovanost a především zájem odborníků zabývajících se danou problematikou. Je pravděpodobné, že některé ze studovaných genů budou v budoucnu vyhodnoceny jako potenciální biomarkery umožňující prognostickou stratifikaci pacientů a po dostatečně rozsáhlé validaci získaných výsledků na nezávislých souborech pacientů s kolorektálním karcinomem v prospektivních studiích, lze očekávat i transfer získaných poznatků do klinické praxe, a to především s cílem definovat pro pacienty optimální léčebný plán na základě individuálního rizika progresu onemocnění po kurativním chirurgickém zákroku. Pokročilá diagnostika tohoto typu by umožnila přizpůsobit režim sledování a celkovou péči o pacienty s kolorektálním karcinomem a následně by vedla i ke zlepšení léčebných výsledků.

Otázky do diskuze

- 1) Do studie zaměřené na analýzu proteinů CD44 a CD133 měli být zařazeni pacienti podstupující chirurgický zákrok pro primární tumor a následně pro jaterní metastázy. V tabulce č.10 zmiňujete zařazení 94 pacientů, přičemž 45 mělo M0 a 49 z nich pak M1. Kolik tedy bylo do studie zařazeno pacientů a kolik vzorků?
- 2) Jaký je rozdíl mezi DFI a DFS? Ověřovali jste na Vašem souboru také vztah proteinů CD44 a CD133 na délku bezpříznakového přežití po operaci primárního tumoru u pacientů s M0 (v klinickém stádiu I-III)?
- 3) U jaké podskupiny pacientů s CRC má největší klinický význam stanovení prognózy? To znamená u jaké skupiny by informace o individuálním riziku časného relapsu mohla ovlivnit klinické rozhodování a proč?
- 4) Na str. 62 definujete DFI jako čas od operace metastázy do další recidivy onemocnění, jak si potom vysvětlujete vliv hladin proteinu CD133 v primárním tumoru na takto definované DFI, když navíc hladina v metastáze žádný vliv na toto DFI neměla?

- 5) Jak si vysvětlujete skutečnost, že hladiny CD133 jsou vyšší v nádorech vyššího gradu a současně pozitivně korelují s DFI?
- 6) Proč jste jako prahovou hodnotu pro binomické dělení exprese jednotlivých genů pro K-M analýzu zvolil medián? Pokoušel jste se pomocí ROC analýzy nalézt vhodnější prahovou hodnotu umožňující citlivější rozdělení pacientů do dvou skupin?
- 7) Co přesně myslíte senzitivitou, specificitou a efektivitou PCR reakce (str. 67), jak jste tyto parametry ověřoval a jaká kritéria jste si pro ně nastavil?
- 8) Na str. 68 uvádíte, že k hodnocení exprese jste použil software REST2009, jakým způsobem (vzorcem) přesně byla prováděna kvantifikace genové exprese? Pokud byly použity referenční geny GAPDH a POLR2A pomocí jakých algoritmů byly v práci Hlavata et al. vybrány a proč? Ověřoval jste na Vašem souboru pacientů míru jejich variability, případně jak ovlivní výsledky například použití jen jednoho z těchto referenčních genů?

Závěr

Dizertační práce Mgr. Pavla Pituleho předkládá nové originální vědecké poznatky v oblasti molekulární patologie a diagnostiky kolorektálního karcinomu. Autor dospěl k výsledkům, které mohou zpřesnit diagnostiku a vést k vyšší míře individualizace léčby tohoto závažného onemocnění. Svým významem představuje tato práce hodnotné dílo potenciálně využitelné jak v klinické praxi tak při dalším studiu patogeneze kolorektálního karcinomu.

Student prokázal tvůrčí schopnosti, práce splnila požadavky kladené na dizertační práci v daném oboru. **Doporučuji proto práci podle paragrafu 47 VŠ zákona 111/98 Sb. k obhajobě a získání titulu Ph.D.**

V Brně 10/09/2014



doc. RNDr. Ondřej Slabý, Ph.D.