

Oponentský posudek disertační práce

Téma: „Individualizace léčby pacientů s karcinomem prostaty na základě molekulární a imunocytochemické detekce cirkulujících nádorových buněk.“
(Individualization of the treatment of prostate cancer patients based on the immunocytochemical detection of circulating tumor cells.)

Doktorand: Ing. Markéta Škereňová

1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Praze

Obor: Biochemie a patobiochemie

Školitel: prof. MUDr. Tomáš Zíma, DrSc., MBA

Předložená disertační práce se zabývá problematikou cirkulujících nádorových buněk, a to zejména z pohledu jejich možného použití v klinické praxi v roli komplexního biomarkeru, který by dokázal plnit jak diagnostickou, tak i prognostickou a prediktivní funkci. V onkologii se jedná o velmi aktuální téma, neboť právě zde je současná medicína se svými znalostmi a technickou vyspělostí nejbližší konceptu individualizované (personalizované) medicíny, kdy pomocí klasických a molekulárních biomarkerů již dokážeme významně individualizovat poskytovanou preventivní a léčebnou péči ve vztahu k jednotlivým pacientům. Na straně druhé jsme však v uplatňování tohoto konceptu stále limitováni, což v případě biomarkerů je nejčastěji způsobeno jejich nedostatečnou specificitou či senzitivitou vůči sledovanému jevu, funkční omezeností (např. se jedná pouze o prognostický ale nikoliv prediktivní biomarker) nebo nemožností stanovit daný biomarker opakovaně, tj. v reálném čase ve vztahu k potřebnému lékařskému rozhodnutí. Vše navíc komplikuje značná heterogenita solidních nádorů. Z tohoto pohledu se cirkulující nádorové buňky mohou jevit jako ideální biomarker, který lze molekulárními analýzami charakterizovat pro různé funkce a současně tak činit prakticky kdykoliv, neboť jsou získávány neinvazivním způsobem. Toto se snažila prokázat i doktorandka ve své disertační práci, ve které použila metodu AdnaTestu za účelem detekce a selekce cirkulujících nádorových buněk u pacientů s metastatickým „kastračně rezistentním“ karcinomem prostaty. Takto získané nádorové buňky pak podrobněji molekulárně charakterizovala co do exprese 25 genů, přičemž tento panel si sama sestavila na základě biologické a klinické relevance. Pro vlastní měření genové exprese zavedla speciální čipovou

metodu „BioMark HD Chip“. Před zavedením AdnaTestu do laboratorní praxe pak navíc v *in vitro* „spike-in“ experimentu provedla jeho validaci. To obzvláště oceňuji, neboť prosté přejímání certifikovaných metodik bez bližší snahy o poznání jejich principu a funkce, vede často ke zbytečným chybám, ať již v analýze nebo při interpretaci výsledků. Všech šest hlavních cílů, které si doktorandka stanovila, se jí podařilo splnit a dosažené výsledky dávají předpoklad, že pracoviště bude schopné detekci cirkulujících nádorových buněk, včetně analýzy jejich genové exprese, zavést i do rutinní klinické praxe v okamžiku, kdy ze strany onkologů vznikne reálná poptávka. Na doložené disertační práci a publikační aktivitě současně doktorandka prokázala své vědecké kvality a schopnost samostatné i týmové spolupráce, což považuji za stejně důležité.

A) Hodnocení formální stránky disertační práce

Disertační práce je psána v anglickém jazyce, má celkem 122 stran, nepočítaje přílohy, je standardně členěná na obecnou úvodní část a část věnující se vlastní práci, kde na 53 stranách autorka popisuje cíle práce, zvolené metody a výsledky. Cíle práce jsou jednoznačně formulovány, uvedeny a srozumitelně popsány jsou všechny použité metody. Dosažené výsledky jsou přehledně zpracovány, vyhodnoceny pomocí relevantních statistických metod a diskutovány. V rámci odborně velmi dobře vedené diskuze jsou vlastní výsledky konfrontovány i s podobnými pracemi jiných autorů. Text je názorně doplněn 32 obrázky a 13 tabulkami, jejichž kvalitní a zpracování významně přispívá k pochopení studované problematiky a získaných výsledků. Bohatá je rovněž literatura, na kterou se v práci autorka odkazuje, celkem 259 citací, přitom více jak polovina (53 %) citačních odkazů představují publikace vydané v posledních 6 letech. Oceňuji dodržování struktury členění textu a jednotnou grafickou úpravu. Angličtina je na vysoké úrovni, pravopisné chyby nebo překlepy jsem zaznamenal skutečně jen vzácně, a to v českém abstraktu.

Připomínky k formální stránce disertační práce:

1. V seznamu citované literatury se několikrát opakují stejné práce. Např. ***Danila DC, Heller G, Gignac GA et al.*** nebo ***de Bono JS, Scher HI, Montgomery RB et al.*** nebo ***Miyamoto DT, Lee RJ, Stott SL et al.***
2. Je otázkou, zda je správné označení „***spiking experiment***“, které používá autorka ve své práci, nebo „***spike-in experiment***“. Osobně preferuji druhou formu.

B) Hodnocení obsahové (vědecké) části disertační práce.

Prvně musím velmi ocenit kvalitu zpracování přehledové části i vlastní práce. Předložené dílo zcela jistě patří mezi nejlepší disertační práce, které jsem posuzoval.

Doktorandka doložila seznam 4 vlastních peer-review recenzovaných publikací, které všechny mají vztah k tématu disertační práce, z nichž 2 byly otištěny v časopisech s impakt faktorem (IF) a u obou je první autorkou. Další práce byla recentně odeslána. Kromě toho byly výsledky prezentovány i na řadě domácích a mezinárodních konferencích (Izrael, Německo, Francie, Řecko).

Připomínky k vědecké části disertační práce:

Jediné, kde nejsem zcela v souladu s doktorandkou, je její tvrzení, že „cirkulující nádorové buňky jsou běžně používané v klinické praxi k monitoraci metastatického karcinomu prsu, plic, kolorektálního karcinomu a karcinomu prostaty“ (str. 35, 2. odst.). Důvody, proč tomu tak není, jsou v disertační práci přitom uvedeny.

C) Dotazy na doktorandku:

1. K experimentům byly použity i vzorky primárních nádorů pocházejících z resekátů a biopsií prostaty. Doktorandka na řadě míst poukazuje na problémy při měření genové exprese, které mohly být způsobeny archivováním těchto vzorků v podobě formálním fixované tkáně zalité do parafinu. Navrhuje možnost fixace a archivace vzorků v látkách uchovávajících mRNA v dostatečné kvalitě. Je však tento postup u karcinomu prostaty plně realizovatelný u bioptických vzorků? ***Nevznikne riziko, že oddělením části materiálu pro účely molekulární diagnostiky dojde ke znehodnocení diagnostického procesu, při kterém se, mimo jiné, musí určit rozsahu nádoru a Gleason Score?***

2. U třech genů nebyla detekována jejich exprese v primárních tumorech ve srovnání s cirkulujícími nádorovými buňkami. Přestože vysvětlení je doloženo, minimálně v případě genu IGFR je absence jeho genové exprese v primárním nádoru pro mě překvapením. Jedná se o zcela základní buněčnou signální dráhu, která kromě metabolismu hraje významnou roli v proliferaci a životaschopnosti buněk, nádorových obzvláště. Kromě toho byl prokázán význam IGF1 a 2 v patogenezi prostatické hyperplázie, a to jak ve vztahu ke stromálním buňkám tak prostatickým. Navíc, vzorky nádorů byly před izolací RNA homogenizovány, tj.

musela zde být i určitá „kontaminace“ stromálními buňkami. Ostatně to dokazuje i vyšší exprese FN1 ve vzorcích primárních tumorů. ***Je doktorandkou diskutovaná příčina skutečně jediným možným vysvětlením absence exprese IGFR ve vzorcích primárních nádorů?***

3. Doktorandka souhrnem literatury i vlastními výsledky dokazuje význam detekce sestřihové varianty 7 androgenního receptoru (AR-V7) ve stanovení prognózy a predikce na ARTA (androgen receptor targeted agents) u pacientů s „kastračně rezistentním“ karcinomem prostaty. Dále udává, že výskyt AR-V7 je u primárních, tj. nepředléčených, nádorů minimální, ne-li žádný, a proto se metoda detekce AR-V7 na cirkulujících nádorových buňkách nabízí k zavedení do klinické praxe. Současně jsou diskutovány i nedostatky metod založených na detekci cirkulujících nádorových buněk. ***Existují i jiné metody pro stanovení přítomnosti AR-V7, kterých by bylo možno využít u pacientů před zahájením a při monitoraci průběhu léčby ARTA, aniž by bylo nutné izolovat cirkulující nádorové buňky?*** Jaké jsou jejich přednosti nebo nedostatky ve srovnání s metodami vyžadujícími detekci a izolaci cirkulujících nádorových buněk?

V závěru svého hodnocení disertační práce Ing. Markéty Škereňové konstatuji, že práce splnila požadované parametry na ni kladené v daném oboru, má vysokou úroveň po stránce obsahové a předkládá nové originální vědecké poznatky pro možné využití nových laboratorních metod k individualizovanému přístupu k onkologicky nemocným. Na doložené disertační práci a publikační aktivitě prokázala doktorandka své vědecké kvality a schopnost samostatné i týmové spolupráce. Doporučuji disertační práci Ing. Markéty Škereňové k obhajobě a udělení titulu Ph. D.

V Brně, dne 16. 11. 2017.

Marek Svoboda

doc. MUDr. Marek Svoboda, Ph.D.
Masarykův onkologický ústav
Klinika komplexní onkologické péče
a Oddělení epidemiologie a genetiky nádorů
Žlutý kopec 7, 656 53 Brno
E.mail: msvoboda@mou.cz, tel.: 543134231