



Urologická klinika LF UK a FN v Plzni
přednosta: prof. MUDr. Milan Hora, Ph.D., MBA
E. Beneše 13, 305 99 Plzeň
tel. 377402225, e-mail horam@fnplzen.cz
sekretariát tel. 377402745, fax 377402171,
e-mail sekretariat.urologie@fnplzen.cz

Vážená paní

ThDr. Jitka Sýkorová, PhD.

2. Lékařská fakulta Univerzity Karlovy

V Úvalu 84

150 06 Praha 5 – Motol

jitka.sykorova@lfmotol.cuni.cz

Věc: Oponentský posudek dizertační práce

MUDr. Antonín Brisuda, FEBU, Urologická klinika 2. LF UK a FN Motol, Praha

Název práce: Neinvazivní diagnostika uroteliálního karcinomu močového měchýře stanovením volné DNA a microRNA v moči

Školitel: prof. MUDr. Marek Babjuk, CSc.

Hodnocení práce:

Práce má 104 stran, obsahuje 181 citací. Vlastní text s. 8-81, zbytek úvod, obsah a poté citace, souhrn. Obrázky, grafy a tabulky jsou řazeny chronologicky přímo v textu. Do s. 23 (kapitola 1) se jedná o obecný úvod o problematice nádorů měchýře s přihlédnutím k tématu práce. Kapitola 2 (s. 24 – 43) se více méně věnuje problematice nádorových markerů a je nutnou součástí dané práce.

Kapitola 3 se věnuje experimentálnímu stanovení volné DNA v moči (s. 44-63) se závěrem (viz s. 63), že je nutno výsledky postupu kvantifikace volné DNA validovat na větším počtu pacientů. TA (Total amount) DNA koreluje se stádiem onemocnění. Rozhodně není TA DNA vhodný k detekci pTa a LG a to ani v kombinaci s cytologií moče. Vhodnější je TA DNA u high-risk nádorů zejména v kombinaci s cytologií, výsledky však nutno validovat na větším počtu nemocných. Zde tato kombinace dosahovala senzitivity 91,9 %.



Urologická klinika LF UK a FN v Plzni
přednosta: prof. MUDr. Milan Hora, Ph.D., MBA
E. Beneše 13, 305 99 Plzeň
tel. 377402225, e-mail horam@fnplzen.cz
sekretariát tel. 377402745, fax 377402171,
e-mail sekretariat.urologie@fnplzen.cz

Kapitola 4 (64-80) se věnuje poté mikro RNA (krátké nekódující molekuly RNA). Konkrétně po iniciační fázi s 381 miRNA bylo dále detekováno 13 z nich - stanovovány miR-99a, let-7c, miR-125b, miR-532-3p, miR-30b, miR-16, miR-204, miR-425, miR-93, miR-372, miR-519a, miR-301a, miR-199a-3p. Signifikantní výsledky dosaženy u 5 z nich. Viz závěr s. 81 – miR-125b, miR-30b, miR-204, miR-99a, miR-532-3p. Kombinace miR-125b, miR-204, miR-99a, miR-532-3p dosahuje v ROC analýze senzitivity 80 %, při specifitě 71 % a AUC 0,836.

Práce byla podpořena grantem IGA MR ČR, NT12417 (FNMG5260).

Odpověď na vyřčené otázky položené v žádosti o posudek:

- Aktuálnost tématu – vysoce aktuální. Práce se zabývá neinvazivní diagnostikou nádorů močového měchýře. Ve své vlastní vědecké části je cílena na volné nukleové kyseliny v moči resp. supernatantu moči jako potenciálních nádorových biomarkerů – volná DNA (ucfDNA) a microRNA (miRNA). Časná a spolehlivá diagnostika recidiv nádorů močového měchýře by umožnila nahradit velmi nepříjemné a drahé sledování nemocných s anamnézou tumorů močového měchýře pomocí pravidelných cystoskopií. Zcela zásadní by bylo i u sledování konzervativně léčených nádorů horních cest močových.
- Použité metody a postupy
 - Aktuální, moderní, vyzdvihnout lze pro kliniku důležité spojení experimentální práce včetně kvalitního statického zpracování s prací klinickou
- Nové vědecké poznatky
 - Viz níže význam práce pro další rozvoj vědního oboru
- Formální zpracování – technicky výtečné (tisk, vazba), téma systematicky zpracováno, logické a chronologické dělení. Připomínky:
 - **V práci mi chybí zcela opomínuté mapování problematiky miRNA v onkourologii v ČR, přičemž mapování miRNA bylo v ČR prováděno u nádorů prostaty, ledvin a dokonce i uroteliálních tumorů a zabývají se jí minimálně 2 další česká akademická pracoviště, níže jsou uvedeny práce z ČR, které se daného tématu dle mého názoru velmi dotýkají a určitě by část z nich měla být v práci zmíněna*.**
 - Souhrn práce (viz s. 100) : Jedná se o obecné pojednání a v podstatě postrádá vědecké závěry z vlastní práce.



Urologická klinika LF UK a FN v Plzni
přednosta: prof. MUDr. Milan Hora, Ph.D., MBA
E. Beneše 13, 305 99 Plzeň
tel. 377402225, e-mail horam@fnplzen.cz
sekretariát tel. 377402745, fax 377402171,
e-mail sekretariat.urologie@fnplzen.cz

- Význam práce pro další rozvoj vědního oboru
 - Práce v podstatě standardizuje metodiku stanovení volné DNA V moči a v pilotní studii mapuje její využití k neinvazivní diagnostice nádorů močového měchýře, u miRNA posunuje práci ještě dále a typizuje 5 vhodných miRNA pro další klinické použití s uvedením jejich klinických charakteristik (specifita, senzitivita, ROC křivka a AUC)
- Zhodnocení úrovně publikací, které jsou součástí práce
 - Součástí práce nejsou žádné publikace. Na PubMed lze dohledat několik prací na dané téma, kde je dr. Brisuda autorem či spoluautorem**.

***Několik příkladů prací českých autorů na dané téma publikovaných v ČR či v zahraničí:**

- Juráček J, Staník M, Peltanová B, Adamcová S, Doležel J, Fedorko M, Radová L, Slabý O. [Urinary MicroRNAs as Potential Biomarkers of Bladder Cancer]. *Klin Onkol.* 2018 Spring; 31(Supplementum1): 155-157. Czech.
- Juracek J, Peltanova B, Dolezel J, Fedorko M, Pacik D, Radova L, Vesela P, Svoboda M, Slaby O, Stanik M. Genome-wide identification of urinary cell-free microRNAs for non-invasive detection of bladder cancer. *J Cell Mol Med.* 2018 Mar;22(3):2033-2038. doi: 10.1111/jcmm.13487. Epub 2018 Jan 24.
- Fedorko M, Juracek J, Stanik M, Svoboda M, Poprach A, Buchler T, Pacik D, Dolezel J, Slaby O. Detection of let-7 miRNAs in urine supernatant as potential diagnostic approach in non-metastatic clear-cell renal cell carcinoma. *Biochem Med (Zagreb).* 2017 Jun 15;27(2):411-417. doi: 10.11613/BM.2017.043.
- Iliev R, Fedorko M, Machackova T, Mlcochova H, Svoboda M, Pacik D, Dolezel J, Stanik M, Slaby O.
- Expression Levels of PIWI-interacting RNA, piR-823, Are Deregulated in Tumor Tissue, Blood Serum and Urine of Patients with Renal Cell Carcinoma. *Anticancer Res.* 2016 Dec; 36(12): 6419-6423.
- Fedorko M, Pacik D, Wasserbauer R, Juracek J, Varga G, Ghazal M, Nussir MI. MicroRNAs in the pathogenesis of renal cell carcinoma and their diagnostic and prognostic utility as cancer biomarkers. *Int J Biol Markers.* 2016 Feb 28;31(1):e26-37. doi: 10.5301/jbm.5000174.



Urologická klinika LF UK a FN v Plzni
přednosta: prof. MUDr. Milan Hora, Ph.D., MBA
E. Beneše 13, 305 99 Plzeň
tel. 377402225, e-mail horam@fnplzen.cz
sekretariát tel. 377402745, fax 377402171,
e-mail sekretariat.urologie@fnplzen.cz

- Pesta M, Klecka J, Kulda V, Topolčan O, Hora M, Eret V, Ludvikova M, Babjuk M, Novak K, Stolz J, Holubec L. Importance of miR-20a expression in prostate cancer tissue. *Anticancer Res.* 2010 S
- Pivovarcikova K, Pitra T, Vanecek T, Alaghebandan R, Gomolcakova B, Ondic O, Peckova K, Rotterova P, Hora M, Dusek M, Michal M, Hes O. Comparative study of TERT gene mutation analysis on voided liquid-based urine cytology and paraffin-embedded tumorous tissue. *Ann Diagn Pathol.* 2016 Oct;24:7-10.ep;30(9):3579-83.
- Tomáš Pitra, Marie Dikanová, Milan Hora, Michal Michal, Ondřej Hes, Kristýna Pivovarčíková. Porovnání výsledků invazivních vyšetření a močové cytologie: Zkušenosti jednoho urologického centra po prvním roce užívání Pařížské klasifikace pro hodnocení močových cytologií. *Ces Urol*, v tisku
- Michael Pešl, Viktor Soukup, Marko Babjuk, Otakar Čapoun, Zuzana Vařová, Pavel Dundr, Tomáš Hanuš. Význam stanovení močové hladiny TATI (tumour associated trypsin inhibitor) pro diagnostiku a prognózu tumorů močového měchýře. *Ces Urol* 2015, 19(1):44-50
- Viktor Soukup, Marko Babjuk, Jaroslava Dušková, Michael Pešl, Monika Szakácsová, Libor Zámečník, Jan Dvořáček, Ctibor Povýšil. Prognostický význam exprese p53, Ki-67 ve tkáni uroteliálního karcinomu a nenádorové sliznici močového měchýře. *Ces Urol* 2009, 13(2):161-167
- M. Babjuk, V. Soukup, MUDr. Michael Pešl, M. Koštířová, L. Pecen, J. Dvořáček. Využití kvantitativní detekce proteinu blízkého faktoru H komplementu (BTA TRAK) v moči ke sledování pacientů s Ta a T1 uroteliálními nádory močového měchýře. *Ces Urol* 2006, 10(3):5-9
- M. Louda, E. Malířová, J. Pacovský, P. Morávek, B. Dlabalová. Diagnostika recidivujícího nádoru močového měchýře pomocí stanovení hladin cytokeratinu 8 a 18 v moči, *Ces Urol* 2003, 7(2):7-10
- J. Klečka, R. Pikner, P. Toufarová, L. Holubec, O. Topolčan, L. Pecen. Cytokeratiny TPA, TPS, CYFRA 21-1 a UBC v séru a moči jako možné nádorové markery karcinomu močového měchýře. *Ces Urol* 2001, 5(1):32-36



Urologická klinika LF UK a FN v Plzni
přednosta: prof. MUDr. Milan Hora, Ph.D., MBA
E. Beneše 13, 305 99 Plzeň
tel. 377402225, e-mail horam@fnplzen.cz
sekretariát tel. 377402745, fax 377402171,
e-mail sekretariat.urologie@fnplzen.cz

- Michael Pešl, Marko Babjuk, Viktor Soukup, Monika Szakácsová, Pavel Dundr, Tomáš Hanuš. Význam stanovení survivinu v moči pro neinvazivní diagnostiku uroteliálních karcinomů močového měchýře. *Ces Urol* 2010, 14(2):99-103
- M. Babjuk, M. Koštířová, K. Mudra, S. Pecher, H. Smolová, L. Pecen, E. Slavkovská, J. Cejnarová, Z. Ibrahim, J. Dvořáček, L. Jarolím, J. Novák, T. Zima. Stanovení proteinu blízkého faktoru H komplementu (BTA TRAK A BTA STAT), fragmentů cytokeratinů 8 a 18 (UBC IRMA A UBC RAPID) a cytologie moči při neinvazivní detekci nádorů močového měchýře. *Ces Urol* 2001, 5(3):4-8
- M. Babjuk, M. Koštířová, K. Mudra, S. Pecher, H. Smolová, L. Pecen, E. Slavkovská, J. Cejnarová, Z. Ibrahim, J. Dvořáček, L. Jarolím, J. Novák, T. Zima. Místo neinvazivních testů (BTA STAT, BTA TRAK, UBC RAPID, UBC IRMA) a cytologie při sledování pacientů s povrchovými nádory močového měchýře. *Ces Urol* 2001, 5(3):9-13

** Práce z PubMed na dané téma, kde je dr. Brisuda autorem či spoluautorem.

- Brisuda A, Háček J, Čechová M, Škapa P, Babjuk M. Clinical and cytopathological factors affecting the cellularity of urinary cell blocks and the implication for diagnosis and follow-up of urinary bladder urothelial carcinoma. *Cytopathology*. 2018 Dec;29(6):537-544.
- Pazourkova E, Pospisilova S, Svobodova I, Horinek A, Brisuda A, Soukup V, Hrbacek J, Capoun O, Mares J, Hanus T, Babjuk M, Korabecna M. Comparison of MicroRNA Content in Plasma and Urine Indicates the Existence of a Transrenal Passage of Selected MicroRNAs. *Adv Exp Med Biol*. 2016;924:97-100.
- Pospisilova S, Pazourkova E, Horinek A, Brisuda A, Svobodova I, Soukup V, Hrbacek J, Capoun O, Hanus T, Mares J, Korabecna M, Babjuk M. MicroRNAs in urine supernatant as potential non-invasive markers for bladder cancer detection. *Neoplasma*. 2016;63(5):799-808.



Urologická klinika LF UK a FN v Plzni
přednosta: prof. MUDr. Milan Hora, Ph.D., MBA
E. Beneše 13, 305 99 Plzeň
tel. 377402225, e-mail horam@fnplzen.cz
sekretariát tel. 377402745, fax 377402171,
e-mail sekretariat.urologie@fnplzen.cz

Závěr:

Práce se věnuje experimentální problematice neinvazivní diagnostiky nádorů močového měchýře a snaží se získané poznatky zavádět dle možností do klinické praxe resp. alespoň jasně definovat další směry vědeckého bádání. Práce je velmi dobře technicky i metodologicky zpracována a jasně ukazuje, že je MUDr. Brisuda schopen provádět samostatně kvalitní výzkum.

Za negativum práce považuji, že zcela opominula řešení dané problematiky v ČR. Citace českých prací doma i v zahraničí se omezují na epidemiologická data (citace 5. Mužík a 6. Dušek) a obecnou učebnici onkourologie (citace 20. Dvořáček). Považoval bych za přínosné, aby autor v rámci obhajoby prezentoval přehled pracovníků v ČR, zabývajících se diagnostikou tumorů močového měchýře a využitím mikroRNA i u jiných urologických nádorů a tím ukázal, že je schopen zařadit jím prováděný výzkum do kontextu celé ČR. A tím mj. v budoucnu provádět multicentrické studie v rámci ČR.

Přes uvedenou limitaci je ale zcela jasné, že se autor seznámil s metodologickými postupy systematické vědecké práce založené na principech medicíny založené na důkazech (EBM). To mu umožní v budoucnu dále provádět další kvalitní výzkum. **Doporučuji proto práci k obhajobě** (podle § 47 VŠ zákona 111/98 Sb.) a po eventuální úspěšné obhajobě udělit titul PhD.

V Plzni 22.11.2018

Milan Hora