

# Rozbor dizertační práce Mgr. Šárky Šantorové „Analýza volných nukleových kyselin v moči urologických pacientů“

1. LF UK Praha

Dizertační práce, zaměřená na volné nukleové kyseliny v moči jako neinvazivní biomarker rakoviny močového měchýře, se snažila zodpovědět na tyto otázky:

- **Lze pomocí miRNA v moči identifikovat pacienty s nádorem močového měchýře?**
- **Lze pomocí miRNA v moči provést staging pacientů s nádorem močového měchýře?**
- **Lze pomocí cfDNA v moči provést staging pacientů s nádorem močového měchýře?**

Na tyto otázky odpověděla dvěma studiemi: první studie byla zaměřena na miRNA (publikace v časopise Neoplasma, IF=1,87), druhá na volnou DNA (publikace v časopise Urologia Internationalis, IF=1,61).<sup>1</sup>

V miRNA studii bylo zanalyzováno celkem 36 kontrol a 73 pacientů s rakovinou močového měchýře. Napřed bylo vyšetřeno 381 miRNA u 13+46 jedinců TaqMan array kartami, z toho byl výsledek pro 13 miRNA potvrzen jednotlivými RT PCR testy. Vybrané miRNA byly pak testovány u 23 kontrol a 27 pacientů s rakovinou močového měchýře. Výsledky byly normalizovány třemi miRNA, vybranými algoritmem geNorm v programu qBase+: miR 191, miR-28-3p a miR 200b. Byly nalezeny signifikantně snížené miRNA u pacientů miR-125b, miR-99a, miR-30b, miR-204, miR-532-3p.

V circulating free DNA studii bylo zanalyzováno celkem 34 kontrol a 66 pacientů s rakovinou močového měchýře. Koncentrace cfDNA byla vztažena k objemu moči a byla zjištěna metodická vhodnost odběru druhé ranní moči.

## Doktorandka prokázala:

- **znalosti genetiky, molekulární biologie, nádorové biologie;**
- **schopnost kriticky studovat odbornou literaturu;**
- **laboratorní dovednosti;**
- **schopnost rozpoznat vědecky zajímavé otázky, formulovat hypotézy a formulovat také způsob testování hypotéz;**
- **schopnost dosáhnout vědecky relevantní výsledky, obhajitelné v mezinárodním měřítku;**
- **schopnost prezentovat výsledky vědecké práce písemnou formou.**

---

<sup>1</sup> Pozn.: Doktorandka do dizertační práce nezařadila čtyři další metodicky a tématicky příbuzné práce, jichž je spoluautorem.

## **Aktuálnost řešeného tématu**

- V současnosti je výrazná snaha přecházet od invazivních diagnostických postupů k neinvazivním, což se projevuje například sledováním vzniku mutace T790M v genu *EGFR* v krevní plazmě. Tato mutace přináší rezistenci k EGFR inhibitorům první generace u nemalobuněčného plicního karcinomu.
- Karcinom močového měchýře vyžaduje opakovanou diagnostiku, takže neinvazivnost ve srovnání s cystoskopií je zásadním přínosem ohledně finanční náročnosti i pohodlí pacienta. **Odběr moči patří mezi nejméně invazivní metody a nese s sebou ani reziduální riziko odběru krve. Téma je proto navýsost aktuální.**

## **Použité metody a postupy**

- Doktorandka sama vypracovala rešerši podle kombinace klíčových slov „miRNA“, „bladder cancer“, „urine“. K 24.4.2019 našla 99 článků, po vynechání nepůvodních prací zbylo 41 článků. **Vzhledem k tomu, jak velké množství práce rešerši věnovala, mohla použít kritéria pro metaanalýzu dle Cochrane, přinejmenším do výsledné tabulky dát také počty testovaných, hodnoty senzitivity a specifity a informaci o tom, zdali byly biomarkery z původní práce opakovaně detekovány v jiné laboratoři.** Výsledek této metaanalýzy by se pak dal srovnat třeba s metaanalýzou Kutwina (1).
- Z tabulky 1 se nabízí, že ve fázi designu experimentu bylo možno buď vybrat marker miR-152 pro normalizaci a miR-126 spolu s miR-182 pro testování nebo vybrat vícegenový panel na základě publikovaných dat. Ohledně normalizace je možná i jiná úvaha: podle článku (3) je nejlepším normalizátorem pro měření RNA u rakoviny močového měchýře RPS23, který však nebyl použit u žádné z 41 prací. Studie zaměřená na referenční cíle přímo pro miRNA (4) našla pro krevní sérum jako nejvhodnější kombinaci hsa-miR-193a-5p a hsa-miR-16-5p, která opět nebyla použita v žádné z 41 prací. Rater et al. (5) uvádí výběr normalizačních RNA, validovaných nejen programem geNorm, ale také NormFinder a BestKeeper (čtyřkombinace miR-101, miR-125a-5p, miR-148b, miR-151-5p a trojkombinace miR-148b, miR-181b, miR-874), přičemž doktorandka použila originální trojkombinaci miR-191, miR-28-3p a miR-200b. **Shoda mezi výsledky při použití normalizace programem geNorm a normalizace na globální průměr je dostatečně robustní postup, přesto mi připadá s ohledem na standardizaci vhodné provést pro srovnání i normalizaci na dvojkombinaci hsa-miR-193a-5p a hsa-miR-16-5p a výše zmíněnou trojkombinaci a čtyřkombinaci dle Ratera.**
- Výběr kontrol je jednou z nejsložitějších částí studie, viz doporučení STROBE ([https://www.strobe-statement.org/fileadmin/Strobe/uploads/checklists/STROBE\\_checklist\\_v4\\_case-control.pdf](https://www.strobe-statement.org/fileadmin/Strobe/uploads/checklists/STROBE_checklist_v4_case-control.pdf)). **Vzhledem k neinvazivitě odběru moči bylo možné získat více kontrolních vzorků zdravých dárců.** U každé studie případů a kontrol svědčí síle testu, pokud počet kontrolních vzorků převyšuje počet vzorků pacientů (nyní je nižší počet kontrol než počet pacientů jak u miRNA, tak u cfDNA v každé fázi studie). Doposud byly do kontrol jako benigní onemocnění zavzaty spermatokéla, hyperplazie prostaty a striktura uretry. Počet kontrolních vzorků by mohl být rozšířen o další dárce bez malignity a nemaligní nemocní by mohli stratifikováni podle nemoci

(proteinurie/albuminurie, benigní hyperplazie prostaty, diabetická nefropatie, hyperaktivní močový měchýř, cystitida, pyelonefritida, ketonurie, ledvinové kameny, postitida, autoimunitní onemocnění, nekróza, infekce) a relevantních fyziologických stavů jako je úraz, fyzická námaha a těhotenství. Množství diagnóz je příliš velké na jednu laboratoř, natožpak na jednu doktorandku. Z klinického pohledu dává smysl soustředit se **na diferenciální diagnostiku bezbolestné makroskopické hematurie u karcinomu močového měchýře, hyperaktivního močového měchýře a dysurie.**

### ***Výsledky práce (novost)***

- **Práce přináší nové výsledky nejen pro českou populaci, ale i v celosvětovém kontextu.** Novost však není takovým pozitivem, za které bývá někdy požadována. V roce 2018 byla o miRNA jako biomarkeru karcinomu močového měchýře publikována práce brněnského pracoviště (7). S prací doktorandky se neshoduje ani metodicky, ani výsledkově. Vzhledem ke krizi reprodukovatelnosti v biomedicině (8,9) by bylo záhodno věnovat se spíše opakování a potvrzení již publikovaných výsledků než hledání biomarkerů, kterou jsou „lab-specific“. Nález, že endokontrola doktorandky miR-191 byla brněnskými kolegy nalezena ve vyšší koncentraci v moči pacientů s karcinomem močového měchýře, je alarmující, přestože zdůvodnění doktorandky je validní.

### ***Formální zpracování***

**Práce je zpracována na požadované formální úrovni, přehledně a čtivě, s pěknými ilustrativními fotografiemi, bez logických a pravopisných chyb. Mám jen tyto poznámky:**

- Standarta je speciální prapor vojenské jednotky nebo hlavy státu; standard je skutečnost, která odpovídá platným normám na vhodnost a správnost. V textu dizertační práce má být vždy slovo „standardní“ místo „standartní“.
- Pojem „rasa“ má od dob eugeniky negativní konotace, proto je lépe používat neutrální a biologicky definovatelnější termín „biogeografický původ“.
- Některé anglické výrazy je lépe nepřekládat do češtiny. U slova „non translated/not translated“ to však neplatí: místo „netranslatovaná“ lze s výhodou použít český výraz „nepřekládaná“.
- Ve větě „Při cut-off hodnotě 65 055 ng“ s jedná hned dvojí chybu – chybí desetinná čárka za číslem 65 a chybí omezení počtu uvedených číslic. Nemá smysl zabývat se jakoukoliv číslicí za třetí platnou, protože každé měření je zatíženo chybou, která je větší o několik řádů než čtvrtá či vyšší platná číslice.
- Tabulka 9 zobrazuje jako výsledek první fáze studie takové miRNA, které mají jak pacienti, tak kontroly a pak miRNA, kterou nemají ani pacienti ani kontroly. Větší smysl však má až tabulka 10 s miRNA, která popisuje miRNA se zásadním rozdílem mezi pacienty a kontrolami. Pro lepší přehlednost by však bylo možno zobrazit poměr expresí zlomkem a seřadit zlomky od největšího u zvýšené exprese a od nejmenšího u snížené exprese.

- V dizertační práci je ostýchavě málo prostoru věnováno cfDNA studii, přičemž pokrytí tématu miRNA se jeví jako adekvátní.

## **Dotazy**

- 1) V tabulce 12 lze u normalizace na globální průměr vidět výrazně snížené hodnoty u patientských miR-548b-3p, miR-302c, miR-208, miR-519d, miR-521 a výrazně zvýšené hodnoty u patientských miRNA miR-210, miR-16, RNU48. Červeně vyznačené jako vybrané k dalšímu testování je však devět miRNA, pro které v tabulce 12 marně hledám jednoznačný klíč výběru, stejně jako mi není jasné, proč byly pro další testování byly vybrány ještě miRNA miR-199a, miR-301a, miR-372 a miR-519a. **Jaký byl přesný algoritmus výběru miRNA pro druhou a třetí fázi studie?**
- 2) Z tabulky 1 je zřejmá variabilita vstupního materiálu (celá moč, supernatant, sediment, exozómy), způsobu normalizace výsledku i metody stanovení miRNA, vedoucí k obrovské variabilitě nalezených miRNA. Jediný cíleně mezilaboratorně validovaný prognostický biomarker uroteriálního karcinomu je miR-31-5p (6), zatímco jediný překryv v tabulce vidím u kombinace celá moč – normalizace miR-152 – biomarkery miR-126+miR-182 u článků Hanke 2010 a Cheng 2017, přičemž miR-126 byla nalezena také v moči při RNU6B normalizaci Snowdonem v roce 2013 a miR-182 byla nalezena také v moči v článku Wei 2015 při normalizaci na „common positive“. **Jak vysvětlujete tuto shodu mezi různými studii, když vezmete v úvahu i fakt, že RNU6b není vhodným normalizátorem, protože to není miRNA, ale malá jaderná RNA?**
- 3) **Pomohla by normalizaci výsledků spike-in kontrolou**, například přidáním cel-miR-39-3p před extrakcí miRNA (10) ?
- 4) **Jak vysvětlujete technické rozdíly mezi první a druhou fází testů** (potvrzení 10 výsledků z 13)?
- 5) Stejně jako v jiných oblastech nádorových biomarkerů lze i při vyšetření miRNA v moči sledovat postupný příklon k multiplexingu (sedmibodový miRNA panel dosahuje AUC=0,916 ve validačním setu (2)). Jako zajímavé se jeví i data z NanoStringu, protože nejsou zatížené zkreslením, vzniklým při amplifikaci cíle u metod založených na PCR nebo využívajících preamplifikaci jako je doktorandkou použitý MegaPlex preAmp. **Jaké jsou možnosti zkombinovat vyšetření cfDNA a miRNA**, popřípadě další molekulárně genetická vyšetření z jednoho odběru moči?

## Závěr

Autorka ve své dizertační práci **prokázala** schopnost samostatní tvůrčí práce v daném oboru. Práce **splňuje** požadavky standardně kladené na dizertační práce v daném oboru. **Práci doporučuji k obhajobě** a v případě úspěšné obhajoby a uspokojivých odpovědí na dotazy **doporučuji udělení akademického titulu Ph.D.** za jménem dle §47 Zákona o vysokých školách č.111/98 Sb.

Prof. Mgr. Jiří Drábek, PhD.

Oponent

V Olomouci, 12.8.2019

- (1) Kutwin P, Konecki T, Borkowska EM, Traczyk-Borszynska M, Jablonowski Z. Urine miRNA as a potential biomarker for bladder cancer detection - a meta-analysis. Central European Journal of Urology 2018; 71(2):177-185.
- (2) Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: A model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. Cancer Res 2004; 64(15):5245-5250.
- (3) Zhang CX, Wang YQ, Jin GY, Wu S, Cui J, Wang RF. Selection of reference genes for gene expression studies in human bladder cancer using SYBR-Green quantitative polymerase chain reaction. Oncology Letters 2017; 14(5):6001-6011.
- (4) Wang LS, Liu YM, Du LT, Li J, Jiang XM, Zheng GX et al. Identification and validation of reference genes for the detection of serum microRNAs by reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction in patients with bladder cancer. Molecular Medicine Reports 2015; 12(1):615-622.
- (5) Ratert N, Meyer HA, Jung M, Mollenkopf HJ, Wagner I, Miller K et al. Reference miRNAs for miRNAome Analysis of Urothelial Carcinomas. P ONE 2012; 7(6).

- (6) Izquierdo L, Montalbo R, Ingelmo-Torres M, Mallofre C, Ramirez-Backhaus M, Rubio J et al. Prognostic microRNAs in upper tract urothelial carcinoma: multicenter and international validation study. *Oncotarget* 2017; 8(31):51522-51529.
- (7) Juracek J, Peltanova B, Dolezel J, Fedorko M, Pacik D, Radova L et al. Genome-wide identification of urinary cell-free microRNAs for non-invasive detection of bladder cancer. *J Cell Mol Med* 2018; 22(3):2033-2038.
- (8) Reed WR. A Primer on the "Reproducibility Crisis" and Ways to Fix It. *Australian Economic Review* 2018; 51(2):286-300.
- (9) Drabek J. ( Ne) reprodukovatelnost vysledku v biomedicine. Reprodukovatelnost vysledku v biomedicinskem vyzkumu - prekazky a jejich mozne prekonani. *Postgradualni Medicina* 2018; 20(2):227-230.
- (10) Mestdagh P, Van Vlierberghe P, De Weer A, Muth D, Westermann F, Speleman F et al. A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalization. *Genome Biology* 2009; 10(6).