

Oponentský posudek disertační práce Mgr. Veroniky Mikulové

„Laboratorní diagnostika mikrometastáz u pacientek s karcinomem prsu“

Předložená disertační práce má 106 stran včetně 16 tabulek a 29 obrázků a grafů, autorka v práci cituje 102 recentních publikací. V příloze jsou uvedeny 2 práce in extenso, které byly publikovány v časopisech s vysokým impakt faktorem (Folia Biologica, Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation). Práce byla vypracována na Ústavu klinické biochemie a laboratorní diagnostiky 1. lékařské fakulty UK a VFN pod vedením Prof. MUDr. Tomáše Zimy, DrSc. a Doc. MUDr. Petry Tesařové, CSc.

Disertační práce nese podtitul **Detekce a molekulární charakterizace cirkulujících nádorových buněk pomocí imunomagnetické separace v kombinaci s kvantitativní polymerázovou řetězovou reakcí**. Práce je členěna tradičně. V úvodu na 31 stranách autorka zpracovala základní informace o epidemiologii, etiopatogenezi, klinických projevech, diagnostice a léčbě karcinomu prsu. Dále se autorka v úvodu podrobně věnovala přehledu informací o cirkulujících nádorových buňkách a metodám jejich detekce. Cíle práce Mgr. Mikulová formulovala do 4 bodů a formulovala také 4 základní hypotézy, které vycházejí z molekulárně genetické detekce a charakterizace CTC.

Kapitola Materiál a metody je zpracována na 10 stranách textu přehlednou formou. Jsou popsány základní soubory pacientek, uvedeny jsou klinické a laboratorní údaje. Do prospektivní studie bylo zařazeno 54 pacientek v časném stadiu karcinomu prsu. V kapitole je popsán algoritmus odběrů periferní žilní krve pro detekci CTC (4x u pacientek s inoperabilním, 3x u pacientek s operabilním tumorem), pacientky podepsaly informovaný souhlas, studie byla projednána a schválena etickou komisí VFN. Izolace a detekce CTC byla provedena komerční soupravou na principu imunomagnetické separace kombinované s multiplexovou RT-PCR. Získaná cDNA z izolovaných CTC byla použita pro studium genových expresí 6 vybraných

genů pomocí nově navržených a autorkou optimalizovaných postupů kvantitativní PCR. Popis vyhodnocovacích a statistických metod a počítačových programů je podrobně uveden, použité metody jsou správné.

Stěžejními částmi práce jsou výsledky (32 stran) a diskuse (4 strany), v kterých autorka kriticky analyzuje zjištěné a naměřené výsledky v jednotlivých souborech pacientek, v experimentální části práce a ve 4 konkrétních kazuistikách. Výsledky jsou také vhodně zpracovány do číselných tabulek, grafů a barevných obrázků. Za zdařilou kapitolu považuji diskusi, kde autorka podrobně a kriticky hodnotí dosažené výsledky a diskutuje je s ohledem na jiné publikované práce. V kapitole Závěry autorka jasně a přehledně formuluje dosažené výsledky, z kterých vyplývá, že cíle práce byly splněny. Autorka vyšetřila celkem 195 vzorků žilní krve, zjistila přítomnost CTC před zahájením léčby u 31 % pacientek, pozitivitu CTC po ukončení léčby prokázala u 10 % pacientek. Autorka navrhla a optimalizovala kvantitativní PCR pro studium genové exprese vybraných genů a zjistila, že se expresní profily v jednotlivých CTC značně lišily. Nejvíce exprimovanými geny byly MUC1, HER2 a EpCAM. Mgr. Mikulová také prokázala 20% diskrepanci mezi expresí HER2 v primárním nádoru a v CTC.

Po formální, jazykové a grafické stránce je práce napsána na velmi dobré úrovni. V práci se objevuje chybné psaní % (jako substantivum by mělo být s mezerou, jako adjektivum bez mezery) a chybné vyjádření molárních koncentrací (např. na str. 55 by mělo být 60 $\mu\text{mol/l}$ a 1 mmol/l místo 60 μM a 1 mM).

Závěrem lze konstatovat, že práce Mgr. Veroniky Mikulové se zabývá velmi aktuální problematikou aplikovaného výzkumu se vztahem ke klinické medicíně. Práce splňuje všechny požadavky disertační práce a přináší celou řadu nových poznatků, které byly publikovány v impaktovaných časopisech. Mgr. Mikulová prokázala schopnost samostatné vědecké práce.

Otázky k obhajobě:

Jaký byl přesný postup k ověření kvality izolované RNA a jaké byly konkrétní výsledky RIN v souboru 195 analyzovaných vzorků?

Dle výše uvedených skutečností doporučuji, aby byl Mgr. V. Mikulové na základě úspěšné obhajoby disertační doktorské práce udělen titul Ph.D.

Praha, 28. 8. 2016

Prof. MUDr. Richard Prusa, CSc.

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
2. lékařská fakulta
Ústav lékařské chemie a klinické biochemie
V Úvalu 84, 150 06 Praha 5
IČ: 00216208 DIČ: CZ00216208