

Oponentský posudek disertační práce

Téma: „Laboratorní diagnostika mikrometastáz u pacientek s karcinomem prsu.“

Doktorand: Mgr. Veronika Mikulová

1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Praze

Obor: Biochemie a patobiochemie

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

Školitel konzultant: doc. MUDr. Petra Tesařová, CSc.

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 BreastCancer AdnaTestu za účelem detekce a selekce cirkulujících nádorových buněk u dvou nezávislých, prospektivně vytvářených kohort pacientek s lokalizovaným a lokálně pokročilým karcinomem prsu. Před zavedením metody do laboratorní praxe pak v *in vitro* studii provedla vlastní validaci testu. 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. Většinu z pracovních hypotéz, které si doktorandka stanovila, se jí podařilo potvrdit a dosažené výsledky dávají předpoklad, že pracoviště bude schopné metodu 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 má celkem 106 stran, je standardně členěná na obecnou úvodní část a část věnující se vlastní práci, kde na 51 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 29 obrázky a 16 tabulkami, bohatá je rovněž literatura, na kterou se v práci autorka odkazuje, celkem 102 citací, přitom 30 % citačních odkazů představují publikace vydané v posledních 5 letech. Velmi oceňuji dodržování struktury členění textu a jednotnou grafickou úpravu, stejně tak i to, že se v práci nevyskytují žádné hrubé pravopisné chyby, překlepy jsem zaznamenal skutečně ojediněle.

Připomínky k formální stránce disertační práce:

1) Způsob uvádění bibliografických údajů o citované literatuře ve výčtu použité literatury neodpovídá příslušné české státní normě ČSN ISO 690 (01 0197). Protože mi s žádostí o oponentský posudek nebyly doručeny žádné pokyny stran nároků 1. LF UK na formát a obsah disertačních prací, nemohu posoudit, zda 1. LF UK připouští i jiné možnosti uvádění použité literatury.

2) Nejednotný způsob prezentace číselných výsledků v rámci popisné statistiky. Například tabulka č. 6 obsahuje jak absolutní, tak relativní počty, tabulka č. 2 nikoliv. Stejně tak v textu. Ve stejném odstavci jsou jednou počty pacientek uvedené v absolutních číslech, následně pouze v procentech (např. viz str. 47).

B) Hodnocení obsahové (vědecké) části disertační práce.

Doktorandka doložila seznam 8 vlastních peer-review recenzovaných publikací, které všechny mají vztah k tématu disertační práce, z nichž 7 bylo v časopisech s impakt faktorem (IF) a u dvou takových je první autorkou. Kromě toho byly výsledky práce prezentovány i na řadě domácích a mezinárodních konferencích.

Připomínky k vědecké části disertační práce:

1) Některé informace si v různých částech textu protirečí, případně jsou napsány tak, že jejich interpretace je nejednoznačná, nebo jsou uvedeny nesprávně. Jako příklady uvádím:

a) Str. 19: „Pro léčbu pacientek s pokročilým (generalizovaným) neléčitelným nádorem prsu neexistuje standardní léčebný postup.“ Str. 20: „Všechny výše zmíněné léčebné modalita jsou vzájemně kombinovány a sestavovány do standardních léčebných postupů, které navazují na světový a evropský standardní postup.“ Přitom tato věta navazuje právě na výčet preparátů pro léčbu generalizovaného onemocnění.

b) Str. 19: „Karcinom prsu nepatří mezi radiosenzitivní nádory, i přesto se k jeho léčbě používá adjuvantní radioterapie.“ S takto napsaným textem nemohu souhlasit, neboť karcinom prsu patří mezi radiokurabilní onemocnění, tj. radioterapií v kurativní dávce lze dosáhnout eradikace ložiska nádoru prsu, tj. není radiorezistentní, ale radiosenzitivní.

c) Na straně 14 jsou mezi vysoce penetrujícími geny pro riziko vzniku karcinomu prsu uvedeny i geny CHEK2 a ATM, na straně 16 jsou tyto geny v kategorii středně penetrujících, což je ostatně i správně.

d) Na straně 20 je v souvislosti s hormonální léčbou blokující tvorbu estrogenů uveden pojem „inhibitory aromatáz“, přitom je známý pouze jediný takový enzym, jediná aromatáza.

e) Str. 43: „Pomocí nových technologií, jako je Next Generation Sequencing (NGS) a proteomika, bude možné odhalit heterogenní mutaci a sledovat vývoj jednotlivých subpopulací nádorových buněk.“ Proteomika jistě nepatří do technologií, jedná se o vědeckou disciplínu.

f) Str. 59: Tabulka č. 4 ukazuje hodnocení přítomnosti genové exprese CTC na základě naměřené koncentrace PCR fragmentů jednotlivých genů. V řádku u 2 nádorových buněk na 5 ml krve je hodnocení pozitivní, a to i přesto, že dosažené koncentrace jsou pod limit positivity 0,3 ng/ul, tak jak je uvedeno v metodice práce (str. 52). Je hodnocení v tabulce správné?

C) Dotazy na doktorandku:

1. Jak si doktorandka vysvětluje, že výskyt cirkulujících nádorových buněk nekoreloval s žádným z důležitých klinických prognostických faktorů, např. velikost primárního tumoru, stupeň postižení regionálních lymfatických uzlin, grading nádoru nebo imunohistochemicky definovaný fenotyp nádoru? Dle dostupných poznatků to přitom předpokládala, viz obecná část a hypotéza č. 4 pro cíle vlastní práce.

2. Doktorandka zvolila pro separaci CTC z periferní krve test pracující na bázi detekce antigenů EpCAM a MUC1. Současně popisuje jak důležitý je pro metastazování karcinomu prsu proces epiteliálně-mezenchymální tranzice (EMT), při kterém však dochází ke snížené expresi až ztrátě uvedených molekul, což je publikačně zdokumentováno. Do prospektivní studie bylo přitom zařazeno 40 % pacientek s triple-negativním fenotyp karcinomu prsu, u kterého je známo, že metastazuje již v časných fázích onemocnění a v procesu metastazování využívá právě mechanismus EMT. Nemůže být toto příčinou, že CTC byly detekovány pouze u 23 % pacientek s triple-negativním fenotypem, zatímco v případě ER a HER2 pozitivních nádorů to bylo u 33 a 38 %? Je AdnaTest BreastCancer skutečně vhodným testem pro selekci CTC u pacientek s karcinomem prsu bez ohledu na fenotyp, nebo by pro klinickou praxi doporučila jiné metody?

3. Práce neprokázala signifikantní vztah mezi detekovanými CTC a HER2 pozitivními CTC na straně jedné a nádory s pozitivním HER2 receptorem, na straně druhé. Dále, u HER2 pozitivních nádorů, u kterých byly zachyceny CTC, bylo pouze 50 % těchto CTC HER2 pozitivních. Z textu a tabulek vyplývá, že za HER2 pozitivní primární nádory (celkem 20) byly považovány nádory s imunohistochemicky prokázanou expresí HER2 receptoru stupně 2+ a 3+. Současně přitom byl proveden průkaz amplifikace HER2/neu genu metodou FISH, která prokázala amplifikaci u menšího počtu primárních nádorů (celkem 12). Jaký byl vztah mezi CTC a HER2 pozitivními CTC a primárními nádory, kdyby hodnocení HER2 positivity primárního nádoru bylo založeno pouze přítomnosti amplifikace HER2/neu genu prokázané metodou FISH?

4. Práce prokázala pozitivní korelaci mezi expresí genu TOP1 v CTC a HER2 pozitivitou primárních nádorů, naopak neprokázala žádný vztah mezi expresí TOP2A genu a HER2

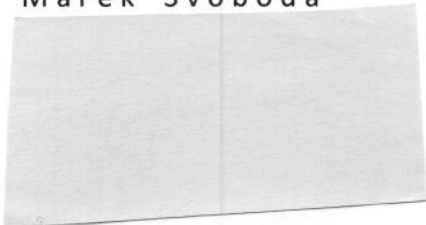
pozitivitou primárních nádorů. Přitom gen TOP2A je často amplifikovaný společně s genem HER/neu, a to díky jejich poloze na 17. chromozomu. Gen TOP1 je lokalizovaný na chromozomu č. 20. Jak by vypadal vztah mezi expresí TOP1 a TOP2A genu, pokud by za HER2 pozitivní primární nádory byly deklarovány pouze ty, které měly prokázánu amplifikaci HER2/neu genu metodou FISH?

5. Z tabulky číslo 11 vyplývá, že u genu ST6GAL byly hodnoty Cq značně vysoké jak u CTC (median 38,07) tak u PBMC (median 37,41), tj. koncentrace PCR fragmentů pro daný gen velmi nízké u obou buněčných populací. Ze standardní křivky pro tento gen (obr. 28, str. 83) vyplývá, že se s těmito čísly dostáváme do ředění cDNA pod 1×10^4 . Dává vůbec smysl srovnávat hodnoty naměřené v těchto oblastech při použití dané metody?

V závěru svého hodnocení disertační práce Mgr. Veroniky Mikulové 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 Mgr. Veroniky Mikulové k obhajobě a udělení titulu Ph. D.

Ve Faliraki, dne 9. 9. 2016.

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