



UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

ÚSTAV BIOCHEMIE A EXPERIMENTÁLNÍ ONKOLOGIE

Přednosta: Doc. MUDr. Bohuslav Matouš, CSc.

Adresa: U nemocnice 5, 128 53 Praha 2

Telefon/Fax: 22496 5732

E-mail: bexo@lf1.cuni.cz

Vážený pan

Doc. RNDr. Petr Pikálek, CSc.

předseda oborové rady

V Praze 13.8.2007

Věc: Oponentský posudek dizertační práce paní Mgr. Marie Sekowské

Tématem dizertační práce paní Mgr. Sekowské je „Mikrosatelitová nestabilita u pacientů s hereditárním nepolypózním kolorektálním karcinomem“. Dizertační práce zahrnuje zavedení vyšetření MSI a LOH na automatickém kapilárním sekvenátoru, porovnání s dříve používanou analýzou na PAGE a následné vyšetření reprezentativního vzorku 152 pacientů s karcinomem kolorekta podle kritérií Bethesda. Na základě výsledků vyšetření MSI a LOH byla u nemocných s prokázanou instabilitou/LOH následně provedena jinými autory mutační analýza v relevantních genech kódujících proteiny mismatch-repair systému. Výsledky analýzy MSI byly korelovány s imunohistochemickým vyšetřením hMLH1, hMSH2 a hMSH6, provedených na části vzorků v souboru.

Ačkoliv zvládnutá metoda a výsledky jednoznačně přínosné práce jsou velmi hodnotné, jejich prezentace v dizertační práci je sporná. Česky psaná práce zahrnuje 16 stránkový úvod, 3 strany popisu metodického přístupu, 12 stran výsledků a 5 stran diskuse a celkem 97 literárních odkazů. Práce je doplněna seznamem zkratk a přílohou 5 článků (z toho 2 články v časopise s IF) zabývajících se podobnou problematikou. Ve všech článcích v příloze figuruje paní Mgr. Sekowská (neé Papežová) na 3. místě.

Úvod dizertační práce ukazuje, že paní Mgr. Sekowská bezpochyby zvládla problematiku laboratorního vyšetření u pacientů s podezřením na HNPCC, avšak ani této části se bohužel nevyhnuly některé nedostatky: s ohledem na téma i přiložené

články postrádám širší zmínku o FAP resp. APC; v seznamu chybí vysvětlení některých zkratk (např. RPA, hMSH5, RFC); autorka nedodrží konvenci zápisu *gen* vs. *protein*; v přejatých obrázcích ze článků zahraničních autorů jsou nepřeložené anglické texty.

Část „Materiál a metodika“ je spíše stručným nástinem použitých postupů. Jako takovému však chybí celistvost vzhledem k otázkám kladeným v „Cílech práce“ (např. zcela opomenuta je alespoň koncepce mutační a imunohistochemické analýzy, se kterou autorka svoje výsledky chce porovnávat či metoda kvantifikace LOH).

Výsledky práce jsou shrnuty především formou tabulek a obrázků navzájem pospojovaných velmi „dietním“ textem. Pouze na jednom místě se autorka odvolává na Přílohu (str. 37).

Na závěr stručná diskuse vhodně komentuje dosažené výsledky v kontextu publikovaných zahraničních prací.

Ačkoliv k předložené dizertační práci mám řadu výhrad, výsledky, které paní Mgr. Sekovská v průběhu svého PGS docílila jsou bezesporu přínosné a kvalitní, a dizertační práce ve svém celku splňuje kritéria dané oborovou radou doktorského studijního programu molekulární a buněčné biologie, genetiky a virologie na 1.LF UK. Domnívám se, že paní Mgr. Sekovská prokázala schopnost k samostatné tvořivé vědecké práci a úspěšná obhajoba dizertační práce tak povede k udělení titulu Ph.D.

Na autorku bych měl několik doplňujících otázek:

1. Jakou metodu použila pro kvantifikaci LOH?
2. Autorka na str. 42 uvádí, že pro rozlišení mezi skutečnou LOH a MSI generující alelu o stejné velikosti by bylo nezbytné použít kvantifikaci pomocí qPCR, avšak tato nemůže být použita z důvodů špatné kvality DNA. Vychází toto stanovisko z autorčiny experimentální zkušenosti?
3. MSI analýza u pacientů s karcinomem kolorekta se používá k stanovení účinnosti chemoterapie 5-FU a jeho deriváty. Uvažovala autorka o korelaci

svých dat s výsledky protinádorové chemoterapie u analyzovaných pacientů?
Bude uvažovat o zavedení metody pro sporadické CRC?

4. Ve schematu vyšetření dle Bethesdaských kritérií (str. 19) autorka opoměla uvést diagnostický význam mutace *BRAF* V600E pro vzorky se ztrátou exprese MLH1. Může autorka tuto situaci okomentovat? Byla tato mutace u indikovaných vzorků testována, nebo uvažuje se o zavedení jejího testování?



MUDr. Zdeněk Kleibl, PhD

ÚBExO, . 1.LF UK

Tel: 224965745

zdekleje@lf1.cuni.cz

Hodnocení studenta

Postgraduální student: MUDr. Petra Koubíková

Obor: Fyziologie a patofyziologie člověka

Téma: Imunosupresivní terapie idiopatických střevních zánětů

Školitel: Prof. MUDr. Milan Lukáš, CSc.

Pracoviště:

Gastroenterologické centrum VFN

IV. interní klinika VFN a 1. LF UK

U Nemocnice 2

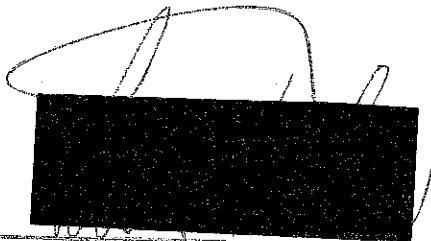
128 08 Praha 2

Petra Koubíková nastoupila do postgraduálního studia v roce 1999 v oboru fyziologie a patofyziologie člověka s tématem Imunosupresivní terapie idiopatických střevních zánětů. Během studia prokázala schopnost systematické a tvůrčí výzkumné práce. Dlouhodobě si doplňovala znalosti jak teoretické a také získala značnou erudici v klinické gastroenterologické praxi. Presentovala formou přednášek, posterů na domácích a zahraničních odborných akcích řadu sdělení. Rovněž se účastnila klinických výzkumu jako spolu-investigátor klinických hodnocení nových léčiv. Participovala na několika grantových projektech zaměřených na etiologii střevních zánětů. Jako reprezentant ČR se účastnila intenzivního postgraduálního kurzu IBD pro mladé lékaře v Dubrovniku. Od roku 2001 je členem pracovní skupiny pro střevní záněty ČR.

Jmenovaná splnila všechny předepsané povinnosti postgraduálního studenta. Předložené dílo splňuje po stránce formální i věcné všechny požadavky na disertační práci.

Prof. MUDr. Milan Lukáš, CSc

školitel



07	ISCARE I.V.F. s.r.o.
170	Jankovcova 1569/2c, Praha 7
011	Prof. MUDr. Milan Lukáš, CSc.
	Gastroenterologie
	tel.: 234 770 260

Oponentský posudek disertační práce

Název práce: Imunosupresivní terapie idiopatických střevních zánětů

Autor disertace: MUDr. Petra Koubíková

Publikovaná výzkumná práce vznikla za podpory grantu IGA MZ ČR č. NK/7276-3, jehož řešitelem byl školitel prof. MUDr. Milan Lukáš, CSc.

Předložená disertace obsahuje 90 stran včetně obrazových příloh, seznamu literatury a souhrnu v českém i anglickém jazyce. Příložena je i zkrácená verze práce o 40 stranách. Vlastní téma je soustředěno do 7 kapitol. V první kapitole jsou s odkazy na literaturu koncentrovány dosavadní znalosti o etiologii, diagnostice a terapii nespecifických střevních zánětů. Ve druhé kapitole jsou jasně definovány cíle studie. Laboratorní metodiku studie popisuje kapitola třetí. Definice souboru nemocných, použité metodiky a statistického zpracování je čtvrtou kapitolou. Výsledky výzkumné práce jsou uvedeny v textu páté kapitoly a shrnuty do tabulky, deseti přehledných grafů a doplněny čtyřmi obrázky vlastních nálezů. Polemika s dosud publikovaným písemnictvím je rozvedena v diskusi v následující šesté kapitole. Kapitola sedmá soustřeďuje přehledně názory autorky na aktuální a budoucí postavení imunosupresiv v léčbě idiopatických střevních zánětů.

Vlastní hodnocení disertační práce.



- a) Disertační práce splnila stanovené cíle: zhodnotila bezpečnost a efektivitu imunosupresivní terapie u pacientů s idiopatickými střevními záněty. Zkoumána byla nejen účinnost a bezpečnost běžně užívaného azathioprinu, ale i 6-merkaptopurinu a 6-thioguaninu.
- b) Postup řešení dané problematiky je recentní, především využití stanovení koncentrace TPMT a metabolitů azathioprinu k co nejefektivnější léčbě nemocných s idiopatickými střevními záněty je v České republice výjimečné.
- c) Výsledky disertační práce evokují indikace k účinnému léčebnému postupu, nebo naopak ke zdrženlivosti a jsou jednoznačným přínosem pro praxi. Pro rozvoj vědního oboru disertační práce jasně definuje dosud nedostatečně prozkoumané otázky.
- d) Práce je podrobná, je psána s přehledem a jasně, dobrou češtinou, dojem kazí přehlédnutí několika překlepů a nepřesných popisků. Použitá literatura je recentní, velmi obsáhlá a potvrzuje skutečnost, že doktorandka se v problematice idiopatických střevních zánětů dostatečně orientuje, a to jak v českém, tak i světovém písemnictví.

Připomínky a dotazy.

1. Jakou nejvyšší dávku azathioprinu, či jeho metabolitů, považujete ještě za bezpečnou v léčbě ISZ a po jak dlouhou dobu může být tato dávka podávána, nedošlo-li během terapie k výskytu nežádoucích účinků? Je možno na základě výsledků studie stanovit optimální algoritmus imunosupresivní léčby ISZ?
2. Který ze sledovaných parametrů, aktivita TPMT, koncentrace 6-thioguanin a 6-merkaptopurin, považujete za nejvýznamnější pro praxi?
3. Byl ve studii sledován efekt imunosupresivní léčby na výskyt mimostřevních projevů ISZ?
4. Které jaterní testy byly sledovány při hodnocení hepatotoxických vlastností 6-thioguaninu? Byly jaterní biopsie prováděny cíleně pod kontrolou některé zobrazovací metody?

Předložená práce splňuje všechny požadované podmínky a proto doporučuji její přijetí k obhajobě a na základě úspěšné obhajoby udělení titulu Ph.D. podle §47 Zákona o vysokých školách 111/98 Sb.

V Olomouci 15.8.2007


MUDr. 
zástupce přednosty pro LP
II. interní klinika LF UP a FN Olomouc