

VYUŽITIE MOLEKULÁRNO-BIOLOGICKÝCH METÓD (QRT-PCR) A IMUNOCYTOLOGICKÝCH METÓD (PRIETOKOVÁ CYTOMETRIA A IMUNOCYTOCHÉMIA) PRE DETEKCIU MINIMÁLNE REZIDUÁLNEJ CHOROBY U NEUROBLASTÓMU

Autor: Bc. Veronika Grüncveigová

Školitel: MUDr. Aleš Vícha, Ph.D.

Oponent: RNDr. Pavlína Daňková, Ph.D.

Předkládaná diplomová práce vypracovaná v laboratoři solidních nádorů 2. LF UK a FN Motol pod vedením MUDr. Aleše Víchy, Ph.D. je zaměřena na důkaz přítomnosti minimální reziduální choroby (MRD) u pacientů s neuroblastomem (NBL). Vzhledem k prognostickému potenciálu MRD je vynakládáno značné úsilí k nalezení či vyvinutí maximálně senzitivní a specifické metody či kombinace metod pro spolehlivý záchyt maligních buněk a k sestavení optimálního diagnostického protokolu. Všechny v současné době používané metody jsou limitovány mírou citlivosti, specifity, časové či finanční náročnosti či dalšími faktory.

Diplomová práce posuzuje senzitivitu tří metod – kvantitativní PCR (QPCR), průtokové cytometrie (FCM) a imunocytochemie (IC), jež začaly být v posledních několika letech používány k detekci MRD; porovnává je vůči zlatému standardu, cytomorfoloickému vyšetření. Jeho schopnost detekce nádorových buněk v kostní dřeni nebo periferní krvi však je (stejně jako u dalších zobrazovacích technik) pod detekčním limitem.

Formální úroveň práce

Formální úroveň práce je průměrná až podprůměrná. V textu teoretického úvodu chybí odkazy na obrázky a tabulky a u složitějších obrázků i legenda (např. u Obr. 1), názvy tabulek mají nestandardní umístění, u obrázků i tabulek chybí uvedení zdroje – jedná se tedy o autorské počiny? Grafy v příloze nejsou dostatečně popsány a tudíž bez textu samostatně obtížně pochopitelné; navíc, jejich informační hodnota je s ohledem na tabulky 3-9 v kapitole Výsledky nulová.

Jazykovou a stylistickou úroveň textu mohou vzhledem k použitému jazyku posoudit jen do určité míry: Absence čárek ve větných souvětích, ale i mezi několikanásobnými větnými členy; občas se objeví chybné koncovky slov při skloňování – obzvláště upoutá u klíčového pojmu „minimální reziduální choroba“ (i v názvu DP), pouze v seznamu zkratk je uveden termín „minimální reziduální choroba“, nekonzistence (např. non-Hodgkinův vs. non-Hodgkinův vs. non-Hodgkinův). Někdy text působí velmi nevyčištěně a nepromyšleně, např. na str. 23, kde 3 věty po sobě říkají v podstatě totéž: (1) Neuroblastom však není jediný solidní nádor dětského věku, který tento (CD45⁻/CD81⁺/CD56⁺, pozn. oponenta) imunofenotyp exprimuje. (2) Imunofenotyp CD45⁻/CD81⁺/CD56⁺ není specifický jen pro NBL a není proto možné ho použít k jeho jednoznačnému prokázání. (3) Je detekovatelný nejen u NBL, ale i u ostatních maligních nádorů.

Použitá literatura je v textu citována víceméně jednotně, citování v seznamu literatury však nese známky vícera pochybení. Není také odlišeno, které citované prameny jsou primární a které sekundární.

Obsah práce

Teoretický úvod práce čítá 25 stran a je členěn do 3 kapitol. Autorce se v této části textu podařilo předložit podstatné informace nezbytné pro uvedení do tématu. Definuje NBL a MRD, seznamuje

s možnými metodami detekce MRD a jejich charakteristikami. Jedná se dle mého soudu o nejzdařilejší část DP.

Práce definuje 2 hypotézy:

- 1) Technika QPCR je pro stanovení MRD statisticky významně citlivější než cytomorfologie
- 2) Technika QPCR stanoví MRD u neuroblastomu se stejnou citlivostí jako imunocytochemické vyšetření přítomnosti MRD u NBL stanovené pomocí positivity na disialogangliosid GD2

Diplomová práce dále uvádí 5 cílů, pomocí nichž chce na zmíněné hypotézy odpovědět:

- 1) Zjistit, zda je možné přítomnost MRD v kostní dřeni využít jako nezávislý prognostický znak
- 2) Zjistit, kterou z technik je nejvhodnější použít pro detekci MRD u NBL
- 3) Porovnat výsledky QPCR, FCM, ICH z jednotlivých vyšetření mezi sebou a u QPCR porovnat korelaci sledovaných genů
- 4) Následně porovnat všechny metody vůči cytomorfologickému vyšetření
- 5) Vytvořit diagnostické schéma MRD u NBL

Kapitola Materiál a metody poskytuje protokoly a místy až příliš detailní popis (není třeba uvádět, jak si popisovat zkumavky atp.) imunocytochemické a QPCR analýzy vzorku. Objevuje se bohužel řada nepřesností nebo nejasností: Hodnotu $\Delta\Delta Ct$ nezískáme rozdílem hodnot $\Delta Ct_{(cílový\ gen)}$ a $\Delta Ct_{(endogenní\ kontrola)}$, nýbrž vztahením hodnoty ΔCt zkoumaného vzorku k téže hodnotě kalibrátoru (např. tentýž vzorek, ale neošetřený zkoumanou látkou, nenádorová tkáň téhož jedince atp.). Přestože v teoretickém úvodu jsou nesmělé zmínky o pozitivní kontrole, případně o cílově-specifických kalibrátorech, autorka neuvádí, k čemu při komparativní analýze vztahovala ΔCt zkoumaných vzorků ona. Dále, přesto, že vzhledem k počtu pacientů a tedy vzorků nebylo možné s daty nakládat jako s daty longitudinálními, mapujícími průběh onemocnění v závislosti na léčbě, nýbrž že všem vzorkům kostní dřeni byla přiřazena stejná informační hodnota, bylo by vhodné určitou charakteristiku souboru uvést.

Schopnost detekce MRD byla mezi jednotlivými metodami posuzována pomocí McNemarova testu. Výsledky jsou prezentovány vcelku přehledně, každé porovnání ve čtyřpolní tabulce plus další komentář v textu. Těmito testy se však řeší a hledá pouze metoda s nevyšším počtem pozitivních záchytů MRD a není řešena specifita metod. Přestože v teoretickém úvodu je zcela správně věnován poměrně velký prostor vzniku falešně pozitivních/negativních výsledků a taktéž je tomu v diskuzi, není z práce jasné, zda byl tento fenomén prakticky řešen, obzvláště u metody QPCR (viz také moje poznámka výše). Je zřejmé, že v rámci klinického testování existují objektivní limity dané možnostmi diagnostiky, a v situaci, kdy neexistuje jednoznačný marker onemocnění, není hledání kvalitnějších testů s co nejvyšší mírou senzitivity při zachování specifity jednoduché, ale relevance výstupů DP je dána také kvalitou měření, proto je důležité jí věnovat pozornost.

V kapitole Diskuze autorka shrnuje výsledky uvedené v předchozí kapitole a snaží se je diskutovat v kontextu dalších faktorů ovlivňujících výběr metody detekce MRD u NBL (časová náročnost, možnost automatizace testu atd.). Relativně často jsou opakovány informace z teoretického úvodu. V některých případech trochu chybí přímé napojení diskutovaných faktů na výsledky diplomové práce, jindy jsou diskutovány výstupy v literatuře, ne vlastní data (týká se zejména využití konkrétních markerů pro zhodnocení odezvy pacienta na léčbu a případné prediktivní využití). Po stránce jazykové a formulace myšlenek je tato část nejméně kvalitní.

První a třetí odstavec Závěru nese charakteristiky úvodu či anotace, pouze druhý odstavec hodnotí výstupy DP. K jednotlivým tvrzením si dovoluji postupně vyjádřit a rozporovat je:

- V naší práci jsme prokázali, že přítomnost MRD v kostní dřeni je možné využít jako nezávislý prognostický znak.
Neproklázali, s ohledem na povahu dat to ani nebylo možné a autorka sama uvádí na počátku kapitoly Diskuze, že se o to ani kvůli nedostatečně velkému souboru nepokoušela.
- Prokázali jsme, že kostní dřev je spolehlivým kompartmentem pro pátrání po MRD u NBL.
Jak?
- Porovnali jsme výsledky QPCR, FCM, IC mezi sebou a u metody QPCR sledovali korelaci genů. Taktéž jsme se pokusili nastolit diagnostické schéma MRD u NBL.
Dané schéma je obtížné nalézt. Při důkladném studiu DP je možné komentář a jistá doporučení týkající se diagnostiky MRD najít mezi řádky diskuze, bylo by určitě prospěšné je více akcentovat nejen coby jeden z cílů DP, ale jako jeden z hlavních výstupů upotřebitelných v klinické praxi.
- Pacienti, kteří mají pozitivní nálezy v kostní dřeni po ukončení indukční terapie, mají horší celkové přežití a měli by tedy pokračovat v indukci před další terapií (chirurgická léčba, radioterapie).
Tento závěr vzešel na základě jakých dat?

Shrnutí:

Diplomová práce Veroniky Gruncveigové je bezesporu klinicky přínosnou studií. Ve své knižní podobě však trpí řadou formálních chyb a celkově působí dojmem, že sepsání minimálně její praktické části nebylo věnováno tolik pozornosti, kolik by si zasloužila.

Práci doporučuji k obhajobě a s přihlédnutím k samotnému průběhu obhajoby, reakcím na poznámky/dotazy z posudku a z pléna navrhuji hodnocení stupněm dobře.

Dotazy:

- 1) Na str. 29 autorka píše, že falešná pozitivita u QPCR metody může být způsobena přítomností pseudogenu a to díky absenci intronové DNA. Je možné falešné pozitivitě tohoto typu předejít?
- 2) Str. 43: „Jak je to možné, doporučuje se využití komparativní metody Ct, jakou je metoda $2^{-\Delta\Delta Ct}$, která...“ → kdy nastane tato situace, že to je možné?
- 3) Jak velké odchylky mezi technickými triplety téhož vzorku u metody QPCR byly akceptovány pro zařazení vzorku do dalšího zpracování?
- 4) Mohla by autorka vysvětlit, proč se u QPCR metody použité pro stanovení MRD u NBL provádí korelace hladin mRNA sledovaných genů? Co to přinese z praktického hlediska, případně co to znamená z pohledu biologického?
- 5) Autorku zajímala detekce positivity na MRD z pohledu metody. Zajímavé by mohlo být přehledné shrnutí z pohledu jednotlivých vzorků, tedy jak jednotlivé vzorky dopadly u všech čtyř posuzovaných metod. Přineslo by podle Vás takové srovnání nějaké další informace a pokud ano, jaké?
- 6) Na jakém přístroji byla provedena QPCR: na 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) nebo na LightCycler 480 (Roche Applied)?
- 7) Jaký je rozdíl mezi negativní a netemplátovou kontrolou?
- 8) Co znamená výraz monát (nebo monáta)? (viz kapitola 3.2)