

## OPONENTSKÝ POSUDEK NA DIZERTAČNÍ PRÁCI

MUDr. PAVLA ŠKRHY

### „Od diabetu, chronické pankreatitidy po karcinom pankreatu: miRNA – nový marker karcinomu pankreatu?“

Karcinom pankreatu je jedním z nejagresivnějších nádorů. Letalita, vyjádřená pětiletým přežitím pacientů, je pouze 2-5 %. Česká republika patří mezi státy s nejvyšším výskytem tohoto onemocnění, navíc incidence se neustále zvyšuje. Významnými rizikovými faktory jsou chronická pankreatitida (CHP), obezita a diabetes mellitus (DM). Problémem je absence raných příznaků onemocnění, takže u většiny nemocných je karcinom pankreatu diagnostikován až ve stádiu, kdy je téměř neléčitelný. Velkou výzvou pro lékaře a výzkumníky je nalezení raných klinických ukazatelů a biochemických či genetických markerů, které by s vysokou senzitivitou a specificitou detekovaly onemocnění v co nejranějším stádiu, kdy je ještě potenciálně léčitelné. Téma dizertační práce je tedy velmi aktuální.

**Cílem dizertační práce** bylo 1) zmapovat u pacientů s karcinomem pankreatu výskyt prvních nespecifických příznaků nemoci, zejména recentní diabetes mellitus a hmotnostní úbytek, 2) hledat vhodné markery, které by mohly sloužit ke zlepšení neinvazivní diagnostiky karcinomu pankreatu. Na základě pilotní studie bylo vytipováno šest miRNA (miR-21, miR-30, miR-192, miR-196, miR-200, miR-423) rozdílně exprimovaných v séru pacientů vs. zdravých kontrol. Vhodnost a robustnost těchto miRNA markerů pro diagnostiku raných stádií karcinomu pankreatu byla testována ve skupinách pacientů s karcinomem pankreatu (a) s DM diagnostikovaným do 2 let před dg. karcinomu; (b) s dlouhodobě léčeným DM; (c) bez DM, dále u pacientů s chronickou pankreatitidou (d) s DM, (e) bez DM, u (f) skupiny pacientů s DM 2. typu a u (g) kontrolního souboru zdravých osob.

#### **Forma a rozsah práce:**

Dizertace je vypracována v českém jazyce, má logickou stavbu, je přehledná a srozumitelná. Teoretická část je členěna do 4 podkapitol, které seznamují čtenáře s epidemiologií karcinomu pankreatu, s rizikovými faktory rozvoje onemocnění, se současnými možnostmi detekce karcinomu. Je podán přehled o markerech karcinomu pankreatu, se zaměřením na miRNA. Teoretická část dizertační práce, doplněná bohatým seznamem citované literatury, svědčí o hlubokých znalostech této problematiky. Autor se dotýká všech aspektů, které bylo potřeba experimentálně řešit. Hypotézy a cíle práce jsou jasně deklarované. Čtenáři je představen design studií, jsou popsány soubory pacientů a sledované parametry. Stručně je popsán i odběr biologického materiálu a použité biochemické a genetické analýzy a statistické metody, které byly v jednotlivých studiích aplikovány. Výsledková část je opět členěna do podkapitol. Následuje diskuze epidemiologických dat a klinických ukazatelů, zejména prevalence DM u karcinomu pankreatu a změn hmotnosti, diskutována je možnost využití miRNA jako raných markerů. Práci uzavírají kapitoly Řešení hypotéz a Závěry, kde jsou shrnuty základní výstupy. Nechybí Abstrakt, Seznam použité literatury, Seznam zkratk.

Dizertační práce má celkem 86 stran textu a je doplněna 8 přílohami – články autora, které mají přímý vztah k řešenému tématu. Dizertační práce má vysokou formální úroveň, stejně tak i autoreferát.

#### **Hodnocení postupu, metodik a výsledků:**

Studované soubory tvořilo 77 pacientů s karcinomem pankreatu, 26 pacientů s chronickou pankreatitidou, 39 diabetiků 2. typu a 25 kontrolních osob. Pacienti byli rekrutováni z několika klinických pracovišť. Byla zpracována a vyhodnocena anamnestická data. Výběr šesti miRNA (miR-21, miR-30, miR-192, miR-196, miR-200, miR-423) vzešel z pilotní studie, kdy byla testována exprese celkem 750 miRNA u 20 pacientů vs. 20 osob bez nádoru a bez zánětu, za referenční miRNA byly vybrány miR-191 a miR-454. Je popsána izolace miRNA ze séra, reverzní transkripce, detekce pomocí RT-PCR i softwarové zpracování dat expresních studií. Pro hodnocení výsledků byly použity relevantní statistické metody.

Studie prokázala vysokou prevalenci poruch glukózové tolerance a nechtěného váhového úbytku u pacientů s karcinomem pankreatu. Proto autoři doporučují, aby u všech osob s recentně zachyceným DM a signifikantním váhovým úbytkem, byla neprodleně zahájena cílená diagnostika karcinomu pankreatu.

Expres vybraných 6 miRNA byla hodnocena nejen jako diskriminační faktor mezi pacienty s karcinomem a zdravými kontrolami, ale byla hodnocena jejich diskriminační schopnost i s ohledem na přítomnost/nepřítomnost chronické pankreatitidy, přítomnost/nepřítomnost DM; na váhový úbytek, s ohledem na velikost nádoru a stádium onemocnění aj. Byla prokázána zvýšená exprese těchto markerů u pacientů s karcinomem pankreatu, zejména u pacientů v pokročilejších stádiích onemocnění. Stanovení exprese miRNA bylo silně prediktivní zejména u pacientů s recentním DM a signifikantním váhovým úbytkem. Využití těchto markerů se zdá být poněkud problematické u pacientů s karcinomem, ale bez diabetu, a v raných fázích onemocnění. Pouze miR-196 a miR-423 dovedly rozlišit pacienty s karcinomem pankreatu od pacientů s chronickou pankreatitidou, a to bez ohledu na přítomnost/nepřítomnost DM u obou onemocnění. Autoři uzavírají, že i když některé z těchto miRNA by mohly sloužit k zpřesnění neinvazivní diagnostiky (v současné době založené zejména na biochemickém markeru CA 19-9), je třeba ještě posoudit dynamiku změn expresí těchto miRNA a vliv další faktorů, které by mohly exprese ovlivnit. Výsledky jsou přehledně prezentovány řadou tabulek a grafů.

MUDr. Pavel Škrha se osobně podílel na kompletizaci souborů, prováděl laboratorní analýzy expresí miRNA, vyhodnocoval data a publikačně zpracovával výsledky.

Přílohy tvoří 8 publikací, z toho 4 impaktované (*Pancreatology*; 2x *Eur J Gastroenterol Hepatol*; *European Journal of Medical Research* – v recenzním řízení; celkový IF= 8,527). MUDr. Pavel Škrha je u tří ze čtyř původních prací prvním autorem, je prvním autorem i tří přehledových článků publikovaných v tuzemských časopisech.

#### **Dotazy:**

Dovolím si položit několik otázek:

- 1) Skupina pacientů s karcinomem pankreatu je jistě heterogenní, co se týče patogeneze. Autor sám poukazuje na pravděpodobný odlišný mechanismus vzniku karcinomu po dlouhotrvajícím diabetu 2. typu, na rozdíl od pacientů, u nichž byl diabetes diagnostikován současně s dg. karcinomu, či krátce před ní. Zajímavá je skupina pacientů s karcinomem pankreatu, ale bez diabetu, která ve Vašem souboru

- představuje 22 % pacientů. Liší se tyto skupiny pacientů s karcinomem pankreatu histologicky, genetickými změnami v nádorové tkáni či v klinickém chování nádoru?
- 2) Je známo, že zhruba 10 % pacientů má rodinnou anamnézu tohoto onemocnění. Jsou známy zárodečné mutace, které jsou příčinou hereditárních forem karcinomu pankreatu? Vyskytli se takoví pacienti s familiární historií i ve Vašem souboru?
  - 3) Někteří autoři uvádějí u pacientů s karcinomem pankreatu zvýšenou expresi i jiných miRNA, než jaké jste vytipovali. Např. Liu et al. (2012) navrhl pro rutinní dg. miR16 a miR196a v kombinaci s biochemickým markerem CA19-9. Proč jste tyto miRNA nezařadili do Vašeho panelu?
  - 4) Ve Vašem souboru pacientů s karcinomem pankreatu je více mužů než žen. Je to obecný jev? Může ovlivnit exprese miRNA pohlaví?
  - 5) Specificitu a senzitivitu molekulárně-genetické diagnostiky karcinomu pankreatu ze séra by mohlo zvýšit stanovení mutací (zejména genu *KRAS*) či methylace cirkulující DNA, která byla uvolněna z nádorových buněk. Uvažujte o zavedení této metody?

**Závěr:** S potěšením konstatuji, že dizertační práce MUDr. Pavla Škrhy splňuje všechny požadavky standardně kladené na dizertační práci v daném oboru. Student prokázal, že ovládá vědecké metody, že má hluboké znalosti teoretické a ve své práci dospěl k výsledkům důležitým jak pro další rozvoj vědeckého výzkumu, tak pro jeho praktickou aplikaci. Předkládaná dizertační práce prokazuje předpoklady studenta k samostatné tvůrčí vědecké práci.

**Dizertační práci MUDr. Pavla Škrhy proto doporučuji k obhajobě jako podklad pro udělení titulu Ph.D. (podle § 47 VŠ zákona 111/98 Sb.).**



Doc. RNDr. Běla Bendlová, CSc.  
Endokrinologický ústav, Praha

V Praze dne 28. 4. 2020

