

## Oponentský posudek disertační práce

### **Cirkulující biomarkery u kolorektálního karcinomu a jejich využití v diagnostice a stanovení prognózy**

**Autorka: Mgr. Klára Červená**

Školitelka: Ing. Veronika Vyměťáková, Ph.D.

Disertační práce předkladatelky Mgr. Kláry Červené se zabývá celým spektrem různých typů cirkulujících biomarkerů a jejich významu v diagnostice, prognóze ale i v predikci léčebné odpovědi u pacientů s kolorektálním karcinomem. Konkrétně bylo hlavním cílem práce identifikovat nové potenciální cirkulující biomarkery a to z řady miRNA, dlouhých nekódujících RNA a cirkulující volné DNA v plazmě KRK pacientů. Zvolené téma disertační práce je v současné době velmi aktuální, protože snaha nalézt na základě minimální invazivity cirkulující biomarkery s prognostickým i prediktivním významem či možností sledování v rámci follow up pacientů s kolorektálním karcinomem po ukončení léčby může vést ke značnému pokroku jak v samotné léčbě, tak v případě včasného záchytu rekurence onemocnění u individuálních KRK pacientů.

Úvodní část práce nás seznamuje s incidencí, mortalitou, vznikem, rizikovými faktory i klasifikací a současným screeningem kolorektálního karcinomu u nás v ČR i celosvětově. Jsou zde uvedeny i způsoby léčby jednotlivých typů kolorektálního karcinomu. V další části teoretického úvodu jsou již detailně popsány jednotlivé typy biomarkerů a jejich současná využitelnost v klinické praxi. Zvláštní pozornost je věnována cirkulujícím formám posléze studovaných biomarkerů a jejich potenciálu využití v diagnostice, prognostice a predikci výstupů terapie kolorektálního karcinomu. Teoretická část je obohacena řadou názorných schémat, které vhodně doplňují zpracované literární údaje. Velké množství použitých uváděných literárních zdrojů svědčí o tom, že se autorka během svého studia do hloubky seznámila se studovaným tématem.

Metodicky práce zahrnuje celou škálu moderních technologií molekulární biologie založených na sekvenování nové generace, komparativní genomové hybridizaci či metodiku tkáňových kultur využitou při funkčních studiích kandidátních cirkulujících miRNA biomarkerů. Všechny postupy využité v průběhu doktorského studia Mgr. Kláry Červené jsou aktuálními vysoce sofistikovanými vědeckými metodami, které vyžadují značnou míru odbornosti v prostředí laboratoře, manuální zručnost a přesnost např. při přípravě knihoven pro NGS analýzy.

Experimentální část práce odkazuje na pět publikovaných prací, jejichž hlavní výstupy jsou v této části stručně shrnuty. Autorce se podařilo identifikovat potenciálně využitelné cirkulující biomarkery z řad miRNA i lncRNA a popsat některé nové varianty cirkulující tumorové DNA ve vztahu k odpovědi na léčbu. Práce předkladatelky má velký vědecký potenciál i do budoucna zejména v oblasti odhalení biologického mechanismu působení konkrétních biomarkerů a přiblížení jejich využití v klinické praxi. Všechny výstupy disertační práce jsou bohatě diskutovány v kontextu s dosavadními znalostmi a úrovní poznání v dané oblasti.

Po formální stránce je práce členěna přehledně obvyklým způsobem vzhledem ke zkrácené formě, kterou bylo možno díky bohaté publikační aktivitě autorky použít.

Vyzdvihla bych přehlednost a ucelenost této zkrácené verze, která velmi zdařile poskytuje ucelený pohled na všechny výstupy získané během doktorského studia. Práce je také v úvodní části bohatě dokumentována řadou názorných schémat. Úroveň českého jazyka je velmi dobrá, práce obsahuje jen ojedinělé překlepy a je téměř bez formálních chyb. Ohledně zkratk vyplývajících z českého jazyka bych ani netrvala v práci na české zkratce kolorektálního karcinomu (KRK), když zkratka CRC vyplývající z anglické formy je poměrně ustálená a široce využívaná i v českém textu a v případě karcinomu rekta je zkratka RC v práci používána. Na str.31 je pak přímo i název CRC uveden, což je ale jen marginální formální nesrovnalost.

Publikační základ celé práce tvoří celkem čtyři publikované práce v časopisech s kvalitním impakt faktorem a další publikace, která je v revizním řízení. Předkladatelka je celkem u čtyř prací prvním autorem. Dvě práce jsou navíc ve spolupráci se zahraničními pracovišti, což dokazuje i schopnost autorky pracovat formou mezinárodní spolupráce. Nad rámec stěžejních publikací autorka dokládá svůj vysoký publikační potenciál dalšími šesti přehledovými články, s vysokým impakt faktorem, kde je součástí autorského týmu a dalšími dvěma vysoce impaktovanými pracemi nesusouvisejícími přímo s tématem disertační práce.

K předložené disertační práci mám následující připomínky a dotazy:

1. V úvodní části disertační práce jsou zmiňovány moderní přístupy léčby kolorektálního karcinomu zahrnující cílenou léčbu založenou na monoklonálních protilátkách či imunoterapii. Zde všude hrají případné prediktivní biomarkery individuálních pacientů zásadní roli. Zajímalo by mě, jak je to se skupinou tzv. tyrosin kinázových inhibitorů a jejich využitím ať už v monoterapii či kombinované terapii u kolorektálního karcinomu? Jsou některé z nich využívány v klinické praxi? A s léčbou související další otázka tentokrát z oblasti imunoterapie. Je u kolorektálního karcinomu sledována možnost a potenciál využití tzv. aktivní buněčné imunoterapie?
2. V metodické části jsou zmiňovány postupy přípravy sekvenačních knihoven. Byly u vzorků zahrnutých do syntézy knihoven ověřovány jejich RINy/DINy? Případně, jaké jsou Vaše zkušenosti s nějakou minimální hodnotou např. RINu studovaných vzorků RNA, které lze ještě spolehlivě využít ke kvalitně provedenému osekvenování?
3. V disertační práci zmiňujete jako metodiku sledování hladin miRNA v plazmě real-time PCR. Doporučila byste vzhledem k potenciálně nízkým hladinám cirkulujících biomarkerů metodiku tzv. digitální PCR? A nemáte již s touto metodou nějaké zkušenosti či nezvažujete její využití?
4. Ve výsledkové části mě konkrétně velmi zaujala úloha lncRNA MALAT1, jejíž expresní hladina byla zvýšena v plazmě špatných respondentů s kolorektálním karcinomem oproti dobrým respondentům. Jaké jsou obecné regulační mechanismy této lncRNA a jakým konkrétním způsobem by mohla ovlivňovat odpověď na léčbu pacientů s kolorektálním karcinomem?
5. Které výsledky Vaší práce považujete Vy sama za nejdůležitější a jakým směrem plánujete směřovat Vaši budoucí vědeckou kariéru?

Celkově hodnotím předkládanou disertační práci jako velmi zdařilou. Práce dle mého názoru splňuje požadavky kladené na práce obdobného typu. Autorka prokázala velmi dobré znalosti studované problematiky, schopnosti využívat moderní metodiku v oblasti genomiky a transkriptomiky a vědecky se podílet na zavádění stanovení cirkulujících biomarkerů jako možných nástrojů umožňujících časnější diagnózu KRK či predikci prognózy a odpovědi pacienta s KRK na vybranou léčbu a tím přispívat k personalizované medicíně. Své experimentální dovednosti autorka podpořila v nadstandardní míře kvalitními publikačními výstupy.

Disertační práce Mgr. Kláry Červené prokazuje předpoklady autorky k samostatné tvořivé vědecké práci a k udělení titulu „Ph.D.“ za jménem.

V Praze, 12.6.2023

RNDr. Radka Václavíková Ph.D.  
Odd. toxikogenomiky, CTZB  
Státní zdravotní ústav