



OPONENTSKÝ POSUDEK

Název disertační práce: Histopatologie a molekulární biologie nádorů gastrointestinálního traktu

Autor: MVDr. Lenka Červenková

Předložená dizertační práce je uspořádána podle obecně přijatých pravidel. V obsáhlém 38 stránkovém úvodu jsou uvedeny základní charakteristiky kancerogeneze, zařazen je popis tří nádorových jednotek postihujících GIT (kolorektální karcinom, hepatocelulární karcinom a duktální adenokarcinom pankreatu), specifikovány jsou základní principy molekulárních metod a imunohistochemie. V této části zastiženy některé nepřesnosti, které by si žádaly další doplnění:

- V části o základní charakteristice kancerogeneze bych autorce doporučila doplnit i jiné možnosti iniciace onkogeneze - k maligní transformaci může dojít nejen mutací v protoonkogenech a tumor supresorových genech. Aktivace protoonkogenů může být podmíněna i chromozomální translokací či např. amplifikací genu. K inaktivaci supresorových genů kromě bodové mutace může dojít i chromozomální delecí a k onkogenezi může též docházet i při epigenetických změnách genové exprese.
- Současná TNM klasifikace UICC (8. vydání) nezačleňuje imunoscóre do hodnocení kolorektálního karcinomu.
- Tvrzení autorky, že „v některých případech má imunoscóre větší prognostický význam než TNM klasifikace“ by mělo být potvrzeno citací či podpořeno odpovídající diskuzí/zdůvodněním.
- Informace o ztrátě exprese CDX2 u MSI-H CRC je mírně zavádějící, neboť jen část MSI-H CRC je CDX2 negativních a patrně tito MSI-H + CDX2 negativní pacienti budou dle recentních dat odpovídat skupině pacientů, kteří primárně ne dobře profitují z imunoterapie.
- Negativní kontrolou při imunohistochemických barveních se myslí tkáň, která neexprimuje protilátkou cílený antigen, tedy není správně tvrzení, že „pro negativní



UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE – LÉKAŘSKÁ

FAKULTA V PLZNI

kontrolu se používá tkáň inkubovaná bez primární protilátky“. Jako negativní kontrola se používá tkáň neexprimující detekovaný antigen, na kterou je aplikován standardizovaný protokol daného barvení/protilátky (tedy včetně protilátky primární). Nejčastěji se využívá vnitřní negativní kontrola ve vyšetřovaných tkáních. Negativní kontrola se nutná k ověření, že nastavený a používaný protokol nevykazuje falešnou pozitivitu v strukturách, které neobsahují detekovaný epitop.

Následující výzkumná část pak ve zkratce přehledně popisuje výsledky provedených zkoumání, které vždy vyústily publikačním výstupem. Jedná se celkem o pět publikací uveřejněných v časopisech s IF, u dvou z těchto prací je autorka předkládané disertační práce prvním autorem. Práce jsou v plném znění zařazeny jako příloha na konci disertační práce. Základním cílem těchto prací bylo získat nové poznatky v oblasti biomarkerů duktálního adenokarcinomu pankreatu, kolorektálního adenokarcinomu a hepatocelulárního adenokarcinomu. Konkrétně pak byl hodnocen prognostický význam protilátek MRP2 a SLC22A3 u duktálního adenokarcinomu pankreatu, specifikován byl způsob odečtu a hodnocení těchto imunohistochemických barvení. U duktálního adenokarcinomu bylo též zjišťováno, zda exprese proteinů MRP2/ABCC2, SLC22A3, TAP1/ABCB2, CFTR/ABCC7, SUR1/ABCC8 a ABCD4 v nádorových buňkách stanovená imunohistochemicky koreluje s hladinami jejich transkriptů popsaných v předchozích studiích. Práce zaměřené na hepatocelulární karcinom se soustředily jednak na možný prognostický význam distribuce a počtu T a B lymfocytů a dále na možnou součinnost vybraných genetických (*TERT* a *CTNNB1* mutace) a imunitních faktorů (CD8+ T lymfocyty) na prognózu onemocnění. U kolorektálních adenokarcinomů byly vyhodnocovány párové vzorky primárního tumoru a synchronní jaterní metastázy pomocí sekvenování celého exomu, kdy primární nádory a jaterní metastázy se v celkové mutační zátěži výrazněji nelišily a výskyt některých mutací (*KRAS*) znamenal kratší přežívání. Zjištěné výsledky byly vhodně podpořeny statistickými propočty. Diskuze je k dané problematice vždy zařazena přímo za výstupy provedených zkoumání, což dělá dané téma a celou disertační práci přehlednou. Mým doporučením je nepřekládat zavedené genetické termíny do češtiny (např. missense mutace, nonsense mutace). Jedná o ustálená a odbornou obcí dobře známá označení, zde užitá v rámci doktorské disertační práce, kde je užití odborných anglických termínů zcela na místě.



FAKULTA V PLZNI

Závěr disertační práce velmi jasně představuje výstupy provedených zkoumání a jasně deklaruje, že předsevzaté cíle disertační práce byly naplněny a hypotézy potvrzeny. Získané výsledky dobře doplňují dříve publikovaná data. V následujícím seznamu použité literatury je celkem 192 článků a tři webové zdroje, které byly citovány v textu. Dále je uveden i seznam všech publikací autorky.

Mezi hlavní připomínky k předložené disertační práci patří dle mého názoru zbytečně zařazená část obecně charakterizující tři nádorové jednotky v úvodu (epidemiologie, incidence, symptomatologie, klinická diagnostika), neboť následně prezentované práce a výzkum svým obsahem (tak je zde představen) s tímto příliš nesouvisí. Možná užitečnější by bylo objemnější shrnutí doposud literaturou popsaných genetických alterací u těchto jednotek se zaměřením na stratifikaci na prognostické, prediktivní a diagnostické využití. Stejný přístup by byl velmi vítán i u komentáře imunohistochemické exprese v daných nádorech. Vlastní výzkumná část je pěkně zpracovaná, velmi vhodně diskuze navazuje vždy na danou problematiku. Závěr jasně odpovídá na předsevzaté cíle a hypotézy. Kladně hodnotím i autorčinu práci s literaturou.

Po formální stránce je práce v pořádku, jazykově na úrovni, s minimem překlepů. Výsledky byly publikovány v mezinárodních odborných časopisech s IF. Získané výsledky rozšiřují poznatky o možných prediktivních a prognostických biomarkerech v rámci ductálního adenokarcinomu pankreatu, hepatocelulárního karcinomu a kolorektálního karcinomu. Další studie jsou vyžadovány k ověření získaných dat. Implementace zjištění do klinické praxe je velmi komplikovaný proces, výrazně limitovaný ekonomickými faktory a doporučenými postupy odborných společností a uznávaným „*lege artis*“ postupem.

Otázky:

- 1) Ve svých výzkumech autoři používají nekonvenční imunohistochemické protilátky, některá barvení byla dokonce prováděna manuálně. Jakým způsobem byla nastavena optimální reaktivita protilátek tak, aby odečet stupně intenzity a lokalizace barvení nebyl subjektivní? Jakým způsobem byla zverifikována optimální reaktivita na použitých referenčních pozitivních kontrolách? Byl pozorován problém s odečtem IHC v souvislosti s fixací materiálu – nerovnoměrná pozitivita, fokální pozitivita, problémy s odhalením antigenních epitopů (obzvláště pak vzhledem k faktu, že



UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE – LÉKAŘSKÁ

FAKULTA V PLZNI

archivní materiál ŠÚP z období do roku cca 2015 byl ve většině fixován nepufrovaným formolem)? Pokud ano, jak bylo v těchto případech postupováno?

Závěr:

Předložená disertační práce i přes výše zmíněné mírné nedostatky splňuje jak po stránce obsahové, tak po stránce formální přijatá kritéria pro tento typ prací. Autorka práce prokázala předpoklady k další samostatné tvořivé vědecké práci. Disertační práci doporučuji k obhajobě. Zároveň doporučuji, aby byl autorce předložené disertační práce, po úspěšně provedené obhajobě, udělen titul „Ph.D.“ za jménem.

Plzeň, 27. 2. 2024



Kristýna Pivovarčíková

Doc. MUDr. Kristýna Pivovarčíková, Ph.D.
Laboratoř speciální diagnostiky
Šiklův ústav patologie, Lochoťín
FN Plzeň
Alej Svobody 80
32300, Plzeň