



Oponentský posudek doktorské disertační práce

MUDr. Bc. Drahomír Kolenčík
Lékařská fakulta v Plzni, Univerzita Karlova, Praha

CTC u kolorektálního karcinomu (CTC in colorectal cancer)

Předložená disertační práce se zabývá studiem cirkulujících nádorových buněk (CTC z angl. circulating tumor cells) u pacientů s kolorektálním karcinomem (CRC). K analýze CTC je použita metoda High Definition Single Cell Assay (HDSCA), která se v průběhu doby vyvíjí a tento vývoj, zejména v oblasti výzkumu CRC je dokumentován i v rámci předkládané disertační práce. Podstatou zvoleného přístupu je automatizace vyhotovení buněčných preparátů, hodnocení buněčné morfologie a automatizována imunofluorescenční analýza (IF).

Cílem disertační práce je popsat aplikaci HDSCA ve 2 kohortách pacientů s CRC a definovat markery, které by mohly být použité v procesu nádorové diagnostiky a onkologické léčby CRC. Nádorová diagnostika v tomto případě zahrnuje analýzu exprese předdefinovaných molekul na úrovni buněk, které byly zachyceny v procesu separace sporadických buněk. Jedná se o IF analýzu proteinů v rámci standardizovaných protokolů HDSCA vz.1, 2, 3.

Součástí práce je také sledování dynamiky změn v počtu CTC a v počtu jiných relevantních jaderných a bezjaderných elementů, které by se dali využít v sledování odpovědi na léčbu a aplikovat v onkologii celoplošně.

Osobně považuju kromě publikovaných výsledků za velký přínos úvodní část disertační práce věnovanou aktuálnímu stavu aplikování tekuté biopsie do onkologické praxe, zejména porovnání vyšetření CTC a cirkulující nádorové DNA (ctDNA). Oceňuju, že se autor snaží hodnotit aplikaci CTC a ctDNA do klinické praxe komplexně, i když to asi nebylo úplně součástí zadání disertační práce. Ráda bych ocenila také definování **socioekonomických determinantů**, které jsou součástí onkologické léčby a také zavedení termínu **finanční toxicity**, která je velkým problémem recentní klinické onkologie.

Cíle disertační práce byly relativně ambiciózní, a to zejména stran odběru vzorků pacientů s CRC v čase. Samotný výzkum CTC u CRC byl rozdělen do několika částí vázaných na použité analytické metody. **Disertační práce je psána v anglickém jazyce, na 117 stranách.** Výsledky vědecké práce byli publikované v renomovaných mezinárodních časopisech (Cancers), co potvrzuje jejich kvalitu a také kvalitu vědeckého týmu, kterého byl PhD-kandidát součástí během doktorského studia.

MUDr.Drahomír Kolenčík je prvním autorem na 2 z uvedených prací (1x originální výzkum, 1x review článku, 1x spoluautor na článku souvisejícím s tématem dizertace, 1x spoluautor mezinárodních doporučení u karcinomu prsu). Dizertační práce je psaná jasně, přehledně a čtivě, zejména oceňuju stručné shrnutí jak problematiky, tak výsledků. Úprava práce vyhovuje požadavkům kladeným na disertační práci, ale mám několik formálních připomínek, viz níže.



Úvod je věnovaný literárnímu přehledu o současném stavu problematiky tekuté biopsie, kde se autor zaměřil hlavně na oblasti úzko související s vědeckými otázkami doktorské práce. V dostatečném rozsahu jsou popsán proces karcinogeneze, základní genetické pozadí CRC a také způsob léčby CRC. Autor se věnuje popisu klasifikace onemocnění, diagnostických biomarkerů a molekulární charakterizaci CRC.

Konkrétní cíle a hypotézy jsou specifikovány na straně 43. Metodická část je popsána srozumitelně s odkazy na detaily v publikacích.

Cíle PhD práce byly splněné na základě výsledků uvedených v publikacích a stručně shrnutých v disertační práci. Získané výsledky jsou přehledně popsány a doloženy v schématických zobrazeních, grafech a tabulkách, které jsou z velké části publikovány v časopisech ve formě, ve které jsou prezentovány v dizertaci.

Z hlavních výsledků bych ráda vybrala následovně:

- nárůst hladiny buněk HD-CTC/ml než 49,77 mezi vzorkem periferní krve před resekci a vzorkem po resekci CRC byl spojen s horším OS ($p = 0,8464$, HR = 0,99).
- nárůst počtu buněk HD-CTC-Apoptotických o více než 12,28 buněk/ml mezi vzorky před po resekci CRC byl spojen se zkrácením PFS pacientů ($p = 0,0024$, HR = 1,01)
- buňky, které vykazují pozitivitu vimentinu spolu se signálem CD45/31 a vyznačují se také vyšší mírou tvorby shluků, jsou populací cirkulujících endoteliálních buněk.
- byla popsána zcela nová bezjaderní struktura **-onkosom** (~10 μ m). Fenotyp onkosomů byl homogenní v celém tvaru s rovnoměrným rozložením imunofluorescenčního signálu. Většina onkosomů také exprimovala signál cytokeratinu.
- Neselekční přístup protokolu HDSCA může zvýšit porozumění nádorové patofyziologii diseminace definováním nových podtypů buněk, které mohou ovlivňovat maligní procesy.

Získané výsledky potvrzují, že autor získal při řešení sledovaných cílů nové poznatky v oblasti nádorové biologie a nových diagnostických postupů. Předložené výsledky jsou též důležitým podkladem pro nové strategie v rámci prevence nebo personalizace léčby nádorů u pacientů.

Připomínky a dotazy:

K práci mám následující formální připomínky:

- **Výrazně doporučuji nepoužívat zkratky v názvu dizertace – Název: CTC u kolorektálního karcinomu bohužel lidem mimo obor nic neřekne. S tím souvisí i výtky, že práce je psána anglicky, ale anglický překlad názvu dizertace zcela chybí.**
- **Do budoucna bych doporučila očíslování kapitol, které by usnadnilo komentování jednotlivých statí**
- **Jak je správně poznamenáno, prezentovaný výzkum byl/ je komplexní, takže je pochopitelné, že i cíle a hypotézy jsou komplexní, ale za daných okolností by bylo zcela určitě vhodné, kdyby autor popsal, za co konkrétně byl v studiích zodpovědný**

Všechny publikované články prošly náročným recenzním řízením, které dostatečně prokázalo jejich kvalitu. Dotazy směřují k upřesnění některých detailů anebo představují návrhy pro další práci a nové hypotézy.

- 1) Mohl by PhD-kandidát detailněji a názorně prezentovat metodiku HDSCA (objem zpracovávané krve, počet mikroskopických skel k automatické analýze ...), ptám se zejména kvůli zavedení nových IF barvení. Kolik mikroskopických skel by se dle ideálního mělo hodnotit? Jaký počet buněk považujete za pozitivní CTC-test (k dnešnímu dni)?



- 2) Do jaké míry je pro analytika hodnotícího imunofluorescenční signál stěžejní intenzita signálu? Jsou definovány hladiny, kdy se signál považuje za nedostatečný? Je takový vzorek barven opakovaně, nebo se použije zcela jiné mikroskopické sklo?
- 3) Mohl by kandidát alespoň u některých vzorků reportovat průměrnou velikost buněčného jádra a cytoplazmy?
- 4) Bylo by dle Vašeho názoru možné zahrnout buňky exprimující TROP2 do skupiny nádorových kmenových buňek (cancer stem cell) a využít tyto buňky k indikaci antiTROP2 léčby v budoucnu? Jak komplikované je zavést analýzu dalšího markeru?
- 5) Otázku buněčné heterogenity speciálně u nádorových onemocnění se snaží v dnešní době vědci zkoumat pomocí single cell DNA sequencing/RNA sequencing. V případě neomezeného rozpočtu, byla by single cell DNA sequencing analýza metodou volby pro doplnění Vaší studie? Kde konkrétně byste ji použil.
- 6) Neuvažovali jste o kultivaci odebíraných odoperovaných vzorků nádorové tkáně pro zrychlení optimalizace nových IF barvení? Co bylo použito jako pozitivní kontrola barvení v případě CRC ?
- 7) Kterou kolekci parametrů považuje kandidát za nepodkročitelné minimum k definování CTC ?
- 8) Doporučil byste zavedení některého z jiných markerů do klinické praxe a proč?

Závěr:

Předložená práce řeší problematiku časně diagnostiky relapsu nádorového onemocnění pomocí tekuté biopsie se zaměřením se na analýzu cirkulujících nádorových buněk. Analyzovanými vzorky byla periferní krev pacientů s kolorektálním karcinomem a také periferní krev zdravých probandů.

Klinické a molekulární analýzy byly provedené pod vedením mezinárodně uznávaných odborníků s použitím metod odpovídajícím současným trendům v dané oblasti výzkumu. Přiložený soubor publikací dokumentuje, že výsledky studií byly publikovány v mezinárodních impaktovaných časopisech.

Komentované shrnutí současných poznatků z literatury a vlastní interpretace získaných dat dokazují, že autor je seznámen s problematikou v dané oblasti a je schopný rozvíjet vědecké přístupy při řešení zvolené problematiky. Celkově dosáhl student během doktorského studia vynikající výsledky.

Práce prokazuje předpoklady autora k samostatné tvořivé vědecké práci a k udělení titulu „PhD.“ za jménem.