



Institute of Biophysics of the Czech Academy of Sciences, v.v.i.
Královopolská 135, 612 00, Brno, Czech Republic
Phone: +420 541 517 166, E-mail: ksoucek@ibp.cz

Posudek oponenta dizertační práce (Č.j.: UKLPF/355450/2024-2)

Dizertant: MUDr. Bc. Drahomír Kolenčík

Předložená práce MUDr. Bc. Drahomíra Kolenčíka je svým rozsahem relativně útlá, avšak tematicky závažná, přinášející nové a zajímavé poznatky. Práce je zaměřena na problematiku tekutých biopsií, konkrétně na nádorové cirkulující buňky (CTC) a jejich detekci na úrovni jednotlivých buněk u pacientů s nádorovým onemocněním kolorekta (CRC). S ohledem na dlouholetý narůstající trend využití tekutých biopsií v diagnostice nádorových onemocnění je toto téma vysoce klinicky relevantní a má velký potenciál, ze kterého mohou v budoucnu profitovat pacienti.

Práce je psána solidní angličtinou a má typické uspořádání. V úvodní části se autor věnuje stručnému úvodu do problematiky CRC, tekutých biopsií a technologiím spojených s jejich využitím. Rozsáhlá a velice cenná je část popisující a shrnující klinické aplikace a probíhající klinické studie využívající tekuté biopsie, kdy závěr této části práce je věnován srovnáním a trendům porovnávacím nádory prsu, prostaty a kolorekta. Cíle a hypotézy jsou rozděleny do dvou dílčích částí a směřují k analýze periferní krve u pacientů s CRC s využitím dvou různých platforem pro High-Definition Single Cell Assay (HDSCA) a s hypotézou odlišit pacienty s lepší prognózou na základě určení počtu CTCs, dále detailně popsat CTCs a tzv. oncosomy a specificky kohortu kolorektálních CTCs pomocí protilátky proti CDX2.

Použitá metodologie HDSCA je unikátní a je v práci dostatečným způsobem popsána. Jedná se o komplexní analýzu CTCs využívající imobilizace jaderných buněk na mikroskopická skla, jejich imunofluorescenční značení specifickými protilátkami, naskenování pomocí fluorescenční mikroskopie a aplikace netriviálních algoritmů pro vyhodnocení získaných dat. Výsledková část a část diskuse se zevrubně zabývá získanými daty a zasazuje je do širšího kontextu. Celá práce je na závěr stručně shrnuta.

Dizertační práce vedla ke dvěma odborným publikacím v mezinárodních časopisech, kde je dizertant hlavním autorem a u dalších dvou je spoluautorem. První práce byla opublikována v časopise Cancers (Q1, MDPI) a řeší otázku, zda prevalence morfologicky odlišných subtypů CTC a časování odběru vzorků periferní krve u pacientů s kolorektálním karcinomem koreluje s klinickými znaky onemocnění a přežitím, a zdůrazňuje důležitost integrace morfologie a

časové analýzy v tekuté biopsii pro zvýšení možností jejího klinického využití. Druhá práce byla opublikována též v časopise *Cancers*. Jedná se o review zaměřené na potenciální klinickou využitelnost tekuté biopsie v péči o pacienty s CRC, poskytuje přehled o CRC, metodikách detekce CTC a bezbuněčné DNA (cfDNA) a diskutuje výhody a problémy využití tekuté biopsie pro longitudinální molekulární charakterizaci nezbytnou pro precizní medicínu. I další práce vyšla v časopise *Cancers* (10.3390/cancers14194891), je zaměřena na využití HDSCA k vyhodnocení 18 vzorků periferní krve od 10 pacientů s mCRC, což odhalilo potenciální klinickou užitečnost tekuté biopsie pro longitudinální sledování pacientů a korelaci vzácných nádorových buněk/objektů s přežitím pacientů bez progresu.

Čtvrtá práce, kde je dizertant spoluautorem, se přímo nedotýká tématu dizertační práce, ale vyšla v prestižním *Annals of Oncology* jako review (European experts consensus) a měla za cíl vytvořit celoevropský konsenzus pro genetické testování, rozhodování a klinický management pacientek s nedávno diagnostikovaným pokročilým karcinomem vaječníků a platnost biomarkerů pro předpověď účinnosti PARPi v první linii léčby.

Hlavní silné stránky experimentální části práce

- Použití technologie HDSCA umožňuje detailní identifikaci a analýzu vzácných buněčných událostí včetně CTCs a dalších ne-buněčných událostí. Využití různých verzí platformy (HDSCA 1.0 a HDSCA 3.0) umožnilo rozšíření fenotypického záběru a detailnější kategorizaci CTCs.
- Analýza dynamiky CTCs mezi různými časovými body ukázala na možné korelace s přežitím pacientů. Tato zjištění naznačují, že změny v úrovni CTCs mohou být indikátorem terapeutické odpovědi a celkové prognózy.
- Studie ukázaly, že identifikace a analýza různých subtypů CTCs, jako jsou CK pozitivní buňky a Vim|CD45/CD31 buňky, může poskytnout více informací o biologických procesech spojených s maligním onemocněním. Tento přístup zvyšuje přesnost diagnostiky a může přispět k lepšímu pochopení patofyziologie onemocnění.

Hlavní limitace práce a formální připomínky

- Na závěr práce by byla velice užitečná strukturovaná část „Future directions“.
- Škoda formálních nedostatků práce – místy nízké rozlišení obrázků, které nejsou legendách odcitovány, odskočené prázdné stránky nebo řádky atp.
- Chybí vysvětlení biologické role a zasazení do kontextu CRC u použitých znaků, které sloužili k detekci CTCs, například u CDX2 atp. Stejně tak by čtivosti práce pomohlo hlubší objasnění a motivace pro detekci „onkosomů“.
- Životopis a plné texty publikací autora nejsou součástí příloh tištěné verze práce. U publikací chybí popis přínosu dizertanta.

Otázky k diskusi

1. Jak ovlivňuje variabilita v pre-analytických postupech přesnost a reprodukovatelnost výsledků detekce CTCs a ctDNA?
2. Jaké jsou hlavní výzvy a potenciální řešení při použití technologie HDSCA pro detekci vzácných buněk?
3. Jak může dynamická analýza CTCs mezi různými časovými body přispět k lepší prognóze a sledování léčby pacientů s kolorektálním karcinomem?
4. Stručně prosím popište biologickou roli znaků, které sloužili k detekci CTCs.

Závěr

Předloženou dizertační práci MUDr. Bc. Drahomíra Kolenčíka doporučuji k obhajobě a přijetí jako součást požadavků pro udělení titulu PhD.

V Brně, 31. 7. 2024

Karel Soucek, PhD.