

UNIVERZITA KARLOVA
2. lékařská fakulta
Ústav biologie a lékařské genetiky FN Motol a UK
2.LF

V úvalu 84, 150 06 Praha 5

Přednosta: prof. MUDr. Milan MACEK, DrSc.



Telefon: +420 2 2443 3500-02

Fax: +420 2 2443 3520

E-mail: ublg@lfmotol.cuni.cz

Děkanát UK 2.LF

K rukám paní Ivany Tinkové

**Posudek oponenta na disertační práci RNDr. Pavla Procházky:
Sledování chemorezistence dětských nádorů molekulárně cytogenetickými metodami**

Problematika molekulárně cytogenetického, resp. molekulárně biologického vyšetřování nádorů patří stále k aktuálním tématům onkogenetiky. Stanovení přesné diagnózy na základě genetického nálezu má velký význam pro určení prognózy nádoru i pro zavedení účinné cytostatické léčby. Velkým terapeutickým problémem je u některých nádorů možnost navození rezistence vůči chemoterapeutikům, jejíž mechanismy nejsou dosud zcela dobře prostudovány.

Předložená práce RNDr. Pavla Procházky deklaruje jako hlavní cíl (jak ostatně napovídá název) bližší poznání chemorezistence vybraných dětských nádorů. Jak jsem již naznačil, jde o téma nosné a stále aktuální.

Práce obsahuje 146 stran textu včetně příloh. Je zde citováno 96 literárních pramenů. Autor přikládá kopie 6 článků, na nichž se různou měrou autorsky podílel. Výběr obsahuje jeden český článek a 5 článků v zahraničních periodikách. Z těchto 5 anglických článků byly 4 již publikovány, jeden byl teprve zaslán k publikaci. Dr. Procházka je prvním autorem českého přehledového článku, dále dvou publikovaných zahraničních článků a také rukopisu anglického článku zasláného k publikaci. U zbývajících dvou anglických článků je jedním ze spoluautorů.

Práce je koncipována a členěna standardním způsobem. Autor po nezbytném vytýčení cílů seznamuje v literární rešerši s některými nádorovými onemocněními dětského věku a zaměřuje se i na mechanismy chemorezistence těchto nádorů. V závěru teoretické části podává přehled molekulárně cytogenetických metod, které zřejmě sám prováděl. Výsledky prezentuje formou souboru publikací *in extenso*, před nímž je předřazen krátký vysvětlující text. Za výsledky následuje diskuze, závěry a seznam použitých literárních zdrojů. Tyto zdroje jsou řádně citovány a existují na ně odkazy v textu.

Z názvu práce a z úvodního textu vyplývá, že se autor věnoval především molekulárně cytogenetickým vyšetřením, které se dnes standardně využívají v onkogenetických laboratořích – tj. používal metodu FISH a její modifikace, dále metodu CGH a array CGH. Ačkoli popis těchto metod má značné mezery (viz mé výhrady v závěru posudku), z publikovaných výsledků se zdá, že autor si tyto techniky osvojil a získal tak dostatek dat potřebných pro vyvození výsledků. Z textu práce nevyplývá, zda sám či s kolegy prováděl i jinou praktickou činnost (např. izolaci RNA a RT PCR, práce s buněčnými kulturami atd.),

z níž např. vzešla významná část dat pro práci III (Procházka et al. 2012), kterou autor uvádí jako stěžejní. Celkově lze použité postupy a metody pokládat za adekvátní a dostačující pro zpracování uvedených článků a následně i disertační práce. Výběr těchto metod ostatně dokumentuje vysokou úroveň pracoviště (Klinika dětské hematologie a onkologie FN Motol a 2.LF UK), na kterém autor získával podklady pro svoji práci.

K uvedeným literárním výstupům autora:

Práce I je český přehledový článek, který má spíše charakter literární rešerše a uvádí jen minimum vlastních praktických výsledků.

Práce II (u které je Dr. Procházka spoluautorem) se zabývá 4 zajímavými kazuistikami dětských feochromocytomů a paragangliomů, které byly detailně vyšetřeny s využitím CGH, aCGH, MLPA a dalšími metodami.

Práce III, u níž je Dr. Procházka prvním autorem, se zabývá mechanismem chemorezistence k ellipticinu. Vychází ze studia buněčné linie neuroblastomového původu, u níž byla navozena rezistence k uvedenému cytostatiku. Autor upozorňuje na možné mechanismy související s chemorezistencí a uzavírá, že jde o komplex různých procesů, v nichž zřejmě klíčovou roli hrají změny exprese topoizomeráz a Bcl-2. Je škoda, že právě tento článek je v práci velmi špatně reprodukován a text psaný menšími písmeny je téměř nečitelný. Z faktografického pohledu si neodpustím úvahu, nakolik jsou procesy zjištěné u linie vypěstované v laboratoři identické s procesy probíhající ve skutečných nádorových buňkách *in vivo* a do jaké míry lze ze studií tohoto typu vyvodit závěry, které by byly relevantní i pro praktické využití v onkologické diagnostice či terapii. Je škoda, že autor svůj další výzkum neorientoval právě tímto směrem.

Práce IV, u níž je Dr. Procházka spoluautorem, studuje účinky valproátu a trichostatinu a dokumentuje, že uvedené látky inhibující histon deacetylázy ovlivňují expresi některých cytochromů v buňkách neuroblastomu. Práce (i když se týká neuroblastomu) se tématicky i metodicky do jisté míry vymyká ostatním pracím. Nebyly zde např. použity žádné molekulárně cytogenetické metody, takže není jasné, do jaké míry a čím konkrétně autor na tomto článku participoval. S touto mojí pochybností souvisí i fakt, že tomuto článku není věnována ani krátká pasáž v diskuzi disertační práce. Pouze ve stručném vysvětlujícím textu před souhrnem publikací najdeme (na str. 34) zmínku o této práci s velmi obecným dovětkem, že cytochromy se podílejí na biotransformaci léčiv a jedním z těchto léčiv je například ellipticin (v samotném textu článku je psáno, že studie týkající se ellipticinu právě probíhají). Vzhledem k tomu, že článek vyšel v roce 2009, je otázkou zda za 3 následující roky nedošlo v této oblasti k nějakému pokroku v poznání – a pokud ano, proč se nějaká informace o tom neobjevila v předložené práci. Připomínám, že i tato práce je velmi špatně reprodukována a některé pasáže jsou na hranici čitelnosti.

Práce V, u níž je Dr. Procházka hlavním autorem, se zabývá zajímavým jevem dodatečného vypuzování amplifikovaných kopií onkogenu *MYCN* z chromozomových oblastí HSR v buněčných liniích vzniklých z neuroblastomu. K tomuto jevu dochází působením některých chemoterapeutik. Autoři tohoto článku jako první prokázali, že k vypuzování amplifikovaných kopií *MYCN* nedochází jen ve formě malých acentrických fragmentů (*double minutes*), ale že se jejich počet snižuje také přímo v chromozomových oblastech HSR. Navazující **práce VI** (v manuskriptu) ovšem ukazuje na to, že v buňkách rezistentních k cis-platině se může (po dlouhodobé kultivaci s tímto cytostatikem) počet kopií *MYCN* také zvýšit. Autor uzavírá, že hlavním prognostickým měřítkem je míra exprese *MYCN*. Tento poznatek může být jedním z odrazových můstků pro zavedení vhodné cílené terapie. Obě práce (V i VI) obsahují několik nových zjištění či upřesnění. Je škoda, že práce VI je zatím prezentována pouze v manuskriptu a autor nepřiložil případný doklad o přijetí rukopisu k publikaci.

Všechny uvedené publikace (pokud jsem měl možnost text pro špatnou kvalitu reprodukce vůbec přečíst) jsou na odpovídající odborné úrovni. Pro obhajobu jsou směrodatné zejména

publikace III a V, kde je Dr. Procházka prvním autorem, a publikace II, kde je Dr. Procházka spoluautorem. Tyto články vyšly v impaktovaných zahraničních periodikách (IF > 1) a jak jsem již naznačil, přinášejí určitá zajímavá zjištění a nové poznatky, z nichž by některé (po dopracování) mohly být využity i v onkologické diagnostice či terapii. Rozpaky vzbuzuje práce I (český přehledový článek s minimem vlastních praktických zjištění) a také práce IV, z níž není jasná míra autorovy participace a k níž se sám autor v doprovodném textu, resp. v diskuzi nijak konkrétněji nevyjadřuje. Do hodnocení nemohu zahrnout práci VI (pouhý manuskript, není doklad o přijetí k publikaci). Navzdory tomu lze uzavřít, že postgraduát požadované kritérium týkající se počtu prací splnil.

S dobrou odbornou úrovní prací ovšem ostře kontrastuje velmi nedbalé zpracování textu. Nejde jen o chyby formální či pravopisné, ale i o nedostatky stylistické a faktické. Z nich upozorňuji na následující:

Všeobecné připomínky:

- a) Je smutné, že jednou z nejhůře zpracovaných pasáží (plnou nepřesností až faktických chyb) je právě text o molekulárně cytogenetických metodách, které autor, jak vysvítá z názvu i textu práce, sám používal.
- b) Diskuze je místy pojata spíše jako literární řešerše a nekoresponduje zcela s předchozím textem (např. práce IV není v diskuzi probrána).
- c) Práce je plná zbytečných anglikanismů (často používané termíny „upregulace“, „downregulace“, „overexpresse“, „gain“), s nimiž ostře kontrastují rádooby české výrazy, jako např. „gén“, „genóm“, „centromérický“ nebo dokonce „lysozómální“ (viz též mé připomínky níže).
- d) V práci nacházím velké množství chyb v interpunkci (např. jen na str. 15 – 20 jsem napočítal 8 chyb v interpunkci), nejednotnou transkripci některých odborných termínů. Nedostatkem je také mnoho překlepů, a to i opět v odborných termínech (místy až na úkor srozumitelnosti textu).
- e) Stylistika některých sdělení je problematická, některé formulace jsou na hranici srozumitelnosti.
- f) Kopie některých článků jsou špatně reprodukovány a místy téměř nečitelné.

Konkrétní připomínky a dotazy (podtržené námitky považuji za závažné):

1. Str. 7: Autor v abstraktu píše, že v chemorezistenci k ellipticinu je významná „upregulace“ topoizomeráz a Bcl2. Na str. 33 však uvádí, že mechanismy odpovědné za rezistenci k ellipticinu jsou „downregulace topoizomeráz“ a „upregulace Bcl2“. Jde o zřejmý rozpor dvou tvrzení.
2. Str. 14 a dále i str. 25: Dvakrát opakovaný překlep „molekulární cytogenetický“ místo „molekulární cytogenetiky“ (podruhé dokonce v názvu subkapitoly).
3. Str. 15 a dále: Nejednotnost v psaní koncovky „-ální/-alní“ u slov cizího původu. Na jedné straně autor píše např. „extraskel~~a~~lní“ nebo „neuroektoderma~~a~~lní“ (v českém textu dost divně působící), dole však již najdeme výraz „chromozom~~a~~lní“.
4. Str. 16: Podobná nejednotnost – v první řádce nahoře je výraz „chromozom“, ve čtvrté řádce nacházíme výraz „chromozóm“. Na stejné straně – u popisu obr.1 je na začátku výraz „fúzní gen“, ale o pár slov dál je již psáno „doménu génu“.
5. Str. 18, 3. řádek: překlep v odborném výrazu – „rybdomyosarkom“ místo rabdomyosarkom.
6. Str. 19, subkapitola 1.3, 3. řádek: podivný výraz „cytostické léčby“ – snad spíše cytostatické?
7. Str. 21, tabulka 2a: Výraz „lysozómálním“ (dlouhé „ó“ snad ve snaze zčeštit text zde působí poněkud nepřístojně).

8. Str. 24: Místo „Neuroblastoma staining system“ má být „Neuroblastoma staging system“!
9. Str. 24: Místo termínu „ploidita nádoru“ používáme zpravidla výrazu „ploidie nádoru“.
10. Str. 24: Slovo motto (ve smyslu heslo, citát atd.) píšeme zpravidla s dvěma t (nikoli „moto“ – tento tvar má spíš cosi společného s automobilismem).
11. Str. 25-26: Velmi nepřesná až chybná definice molekulární cytogenetiky – geneticky podmíněné změny na molekulární úrovni (což mohou být i bodové mutace) studuje obecně molekulární biologie; molekulární cytogenetika se zabývá studiem chromozomů a jejich aberací prostřednictvím molekulárně genetických metod.
12. Str. 26: Podivná formulace: „Metoda vychází ze sedmdesátých let...“ (metoda zpravidla vychází z určité reakce, mechanismu, principu atd., ale nikoli z časového období).
13. Str. 26: Chybný popis centromerických a lokusově specifických sond pro FISH. Autor je zde v definicích v podstatě směšuje a neuvádí, v čem přesně spočívají jejich rozdíly.
14. Str. 27, obr. 2: Pokud pomínu ne zcela přesný popis postupu FISH, pak rozhodně nesouhlasím s použitím výrazu „barvička“ v postgraduální disertační práci (jde o barvivo, termín „barvička“ patří spíše do slovníku malířů a natěračů). Stejně tak střídavé používání pojmu „sonda“ a anglikanismu „próba“ není právě nejšťastnější.
15. Str. 28: Obvyklá chyba studentů, která však nemá co dělat v disertační práci. V případě metody mFISH nejde o „barvení“ chromozomů, jak píše autor, ale o vizualizaci jednotlivých chromozomů různě značenými sondami (termín „barvení“ lze použít v souvislosti s barvením Giemsou, hematoxylinem, DAPI apod.).
16. Str. 28, 6. řádek: Překlep „flourochromů“ místo „fluorochromů“.
17. Str. 28: Kostrbatá formulace s chybou interpunkce: „Metoda vycházející z mFISH a která ji vhodně doplňuje a zpřesňuje se nazývá...“.
18. Str. 28: Nejasná formulace: „Hybridizace probíhá na metafázické chromozomy odpovídající karyotypu 46,XX nebo 46,XY.“ Tvrzení, že by chromozomy odpovídaly nějakému karyotypu, je přinejmenším nestandardní. Autor má zřejmě na mysli normální, strukturně nijak nezměněné chromozomy od zdravých dárců.
19. Str. 29, obr. 3: Co má autor na mysli pod pojmem „próba“ (ještě v jednotném čísle) u CGH?
20. Str. 29, text k obr. 3: Formulace „mitózy jsou vizualizovaný a přeneseny pomocí fluorescenčního mikroskopu a černobílé kamery do karyotypovacího softwaru“ vyvolává představu mikroskopu, který mechanicky přenáší chromozomy kamsi do počítače.
21. Str. 30: Věta (týkající se CGH) „Nevýhodou je nemožnost pokrytí variability v rámci buněčné populace“ nedává jasný smysl. Jakou variabilitu, resp. variabilitu čeho má autor na mysli? Souvisí snad toto sdělení s následující větou, kde se píše o nemožnosti zachytu minoritních klonů? Přítomnost minoritních klonů s odlišnou chromozomovou konstitucí ale není variabilita.
22. Str. 31: Metoda aCGH neodhalí nejen balancované translokace, jak píše autor, ale i ostatní balancované změny, zejména inverze.
23. Str. 31, 2. řádek zdola: Překlep „jsm schopni“ namísto „jsme schopni“.
24. Str. 33: Věta „Jako přidružené mechanismy rezistence byly identifikovány...“ je poměrně dlouhá a nedává jasný smysl. Enzym označený autorem jako „spermine syntetáza“ se v češtině spíše označuje jako „spermin syntáza“, popř. „spermin syntasa“.
25. Str. 34, 5. řádek: Formulace „lčiv nebo chemických substancí“ je pleonasmus – lčiva jsou také chemické substance.

26. Str. 35 i jinde: Název onkogenu MYCN je někde psán kurzívou (*MYCN*), jinde obyčejným písmem (MYCN). Jde o formální nejednotnost, která by se ale neměla objevit v práci zabývající se právě tímto onkogenem.
27. Str. 38 i jinde: Píše-li autor o translokaci t(11;22), resp. t(21;22), měl by ji jasně lokalizovat označením ramének a číselným popisem G-pruhů na příslušných chromozomech. Popis této translokace by se měl (u prezentovaného článku) objevit již v abstraktu a mezi klíčovými slovy (nikoli až v textu na následující straně).
28. Str. 40 a pak opět str. 129: Chyba ve shodě přísudku s podnětem: „Dva ze tří nediferencovaných sarkomů ... měli zmnožení 8. chromozomu.“ Stejná věta – stejná chyba (část textu článku pravděpodobně beze změny zkopírována do diskuze).
29. Str. 52 – 59: Velmi špatná reprodukce článku, některé pasáže téměř nečitelné.
30. Str. 85 – 90: Další velmi nekvalitní reprodukce článku, místy na hranici čitelnosti.
31. Str. 130 i dále: Termín delecce by bylo vhodné uvádět pouze ve spojitosti se strukturální aberací – tj. chyběním části chromozomu. Píšeme-li však o „delecce celého chromozomu“, pak je vhodnější používat výraz „monozomie“, resp. „ztráta chromozomu“ (2. odstavec – dvakrát stejná nepřesnost).
32. Str. 131 – 132: Pasáž 3.2.1 má charakter literární rešerše (autor zde prakticky nediskutuje vlastní výsledky s literárními prameny) a jako taková patří spíše do úvodu, nikoli do diskuze.
33. Str. 132, 2. řádek zdola: Výraz „genóm“ (s dlouhým „ó“) se ani v češtině nepoužívá.
34. Str. 133, obr. 5: Nedostatečný, resp. nepřehledný popis obrázku. Nezasvěcenému čtenáři nebude tak docela jasné, který výsledek CGH a FISH patří k linii UKF-NB4 a který k linii UKF-NB4^{ELLI} (Která je vlevo a která vpravo? Máme-li více obrázků pohromadě, je v každé publikaci zvykem uvést např. popis „a, b, c, d ... atd.“).
35. Str. 134: Model „replication – excision“ by si zasluhoval podrobnější popis. Ve které chromozomové oblasti je DNA opakovaně replikována a ve které ne? Navíc věta začínající slovy „Při kterém je DNA opakovaně replikovaná...“ je stylisticky nepřijatelná.
36. Str. 135: Píšeme-li o „vypuzení“ mikrojadra, vyvolává to představu procesu, kdy jsou mikrojádra aktivně (mechanicky?) odstraňována z jader. Nejde však spíše o skutečnost, že mikrojádra jsou acentrickými fragmenty, které při mitóze nejsou napojeny na vlákna dělicího vřetenka, a proto nejsou pojaty ani do nově vznikajícího jádra? Pokud jde opravdu o aktivní proces, jaký je jeho mechanismus?
37. Str. 136: Autor na 4. řádku používá výraz „resistence“ a o 2 řádky níže již píše „rezistence“. Nejednotnost transkripce odborných termínů lze snad tolerovat u práce bakalářské, ale nikoli u práce disertační.
38. Str. 136: Subkapitola 3.3.4 neobsahuje prakticky žádné srovnání výsledků autora s výsledky jiných prací. Jde zde opět spíše o literární rešerši, která v takto zbytnělé podobě do diskuze nepatří.

Mám-li celkově hodnotit předloženou práci, nemohu skrýt jisté rozladění, tím spíše, že pana Dr. Procházku znám jako velmi nadaného studenta, který rozhodně „má na to“, aby sepsal daleko kvalitnější text.

Pro dobrou úroveň většiny článků bych se přimlouval za to, aby v případě excelentní a zcela bezchybné obhajoby, při níž by nevyšly najevo jiné nedostatky, byla disertační práce pana Dr. Procházky přijata.

RNDr. Eduard Kočárek, Ph.D.
Ústav biologie a lékařské genetiky 2.LF UK