

---

Dne 18. září 2006.

**Věc:** Oponentský posudek na dizertační práci MUDr. Davida Sumerauera

**Oponovaná dizertační práce:**

Detekce a ex vivo eliminace reziduálních nádorových buněk Ewingova sarkomu perzistujících v autologních štěpech hematopoetických kmenových buněk

**Autor dizertace:**

MUDr. David Sumerauer  
Klinika dětské hematologie a onkologie  
II. LF UK a Fakultní nemocnice Motol  
PRAHA

**Oponent:**

Prof. MUDr. Milan Bláha, CSc.,  
II. interní klinika LF UK a FN  
Hradec Králové

Oponovaná dizertační práce je závěrem doktorandského studia MUDr. Davida Sumerauera. Byla vypracována na Klinice dětské hematologie a onkologie v Praze.

**Základní charakteristika práce:**

Práce se skládá z literárního přehledu, věnovaného podrobnému rozboru zkoumané problematiky a navazuje vlastní práce. Jsou uvedeny cíle práce, vlastní výsledky (Experimentální purging; Detekce minimální nádorové choroby; Výsledky vyšetření klinických vzorků; Výsledky vyšetření štěpů určených ke klinickému použití; Výsledky transplantací čištěnými štěpy), dále závěry, literatura a přílohy přílohy. Jde o 66 stran vlastního textu, 24 tabulek, 21 obrázků, a seznam literatury. Přílohy tvoří 4 práce, v jedné je autor jako první a práce je impaktovaná: 1/

Sumerauer D., Vicha A., Kučerová H., Kodet R., Housková J., Bedrníček J., Eckschlager T., Detection of minimal bone marrow infiltration in patients with localized and metastatic Ewing sarcoma using RT-PCR, Folia Biologica, 47: 206-210, 2001, 2/ Sumerauer D., Matějčková Š., Hrubá A., Eckschlager T., Manipulace se štěpy hematopoetických progenitorových buněk a jejich použití v klinické praxi, Čas Lék čes, 141, 411-416, 2002, 3/ Vicha A., Stejskalova E., Sumerauer D., Kodet R., Malis J., Kucerova H., Bedrnicek J., Koutecky J., Eckschlager T., Malignant Peripheral primitive tumor of the kidney, Cancer Genet Cytogenet, 139, 67-70, 2002, 4/ Krskova L., Mrhalova M., Sumerauer D., Kodet R., Rhabdomyosarcoma: molecular diagnostics of patients classified by morphology and immunohistochemistry with emphasis on bone marrow and purged peripheral blood progenitor cells involvement, Virchows Arch, 448:449 – 458, 2006.

**Obecně lze konstatovat**, že práce řeší velmi aktuální a ožehavou, významnou a nedořešenou problematiku purifikace štěpů určených pro transplantaci krvevorných buněk. Jde o významnou část současné transplantologie. Neexistuje sice dosud jednotný průkaz a názor na to, zda purifikace je nevyhnutelná, ale mnoho údajů o tom svědčí a autor je v práci velmi dobře rozebral. Mohlo by jít o další slibný pokrok při transplantacích krvevorných buněk, kde již ve vymezených indikacích jde o metodu nepochybně vedoucí k prodloužení života nebo dokonce vyléčení dosud nezvládnutelných chorob a to u dětí nebo u lidí v produktivním věku. Purifikační metodiky ex vivo jsou technicky i ekonomicky náročné, ať již jde o pozitivní nebo negativní selekci. Autor zvolil metodu farmakologické purifikace a to nejmodernějším postupem na pracovišti, které má letitou tradici v rozvíjení této myšlenky a dosáhlo v minulosti významných pozitivních výsledků. Při tom vybral a řešil významné detaily, např. otázky výběru farmak, jejich dávek, průkaz minimální residuální choroby, důkazy o tom, zda a kolik krvevorných buněk přežívá v purifikovaném štěpu a další. Cíle práce, experimentální metodiky, soubor nemocných včetně způsobu statistického hodnocení, jsou vybrány, podány i dokumentovány velmi dobrým způsobem. Rovněž literatura je bohatá, obsahuje 116 citací, většinou z posledních let, bezprostředně se týkajících tématu práce.

### **Výsledky dizertační práce:**

Jsou uvedeny velmi přesně a podrobně. Autor je uvádí postupně v jednotlivých subkapitolách. Jde o množství údajů, je však použita jednotná

schematika subkapitol a ilustrací, což činí práci přehlednou a srozumitelnou. Detailní hodnocení řady ukazatelů v souboru je nesporně předností práce, ukazuje na pečlivost autora a přesnost vědecké práce.

Výsledky jsou vhodně doplněny přehledy v tabulkách a obrázky.

### **Nejdůležitější výsledky jsou tyto:**

Byla zavedena složitá a náročná metodika purifikace štěpů pro transplantaci krvetvorných buněk. Při tom byla zjištěna tato fakta:

#### **a) Experimentální farmakologický purging :**

1. Mafosfamid i etopozid redukovaly počty koloniformních jednotek, ale ne počet jaderných buněk a CD34+ buněk.
2. Experimenty prokázaly, že etopozid v koncentraci 40 µg/ml s patnáctiminutovou preinkubací ethyolem v koncentraci 4 mg/ml neredukuje počet buněk obnovujících krvetvorbu a redukuje počet nádorových buněk.
3. Ochranný vliv amifostinu na hematopoetické kolonie nebyl významný.
4. Nebyl prokázán ochranný vliv amifostinu na buňky nádorových linií Ewingova sarkomu a neuroblastomu a naopak byl pozorován nesignifikantní trend k potenciaci protinádorového účinku mafosfamidu amifostinem u nádorových linií neuroblastomu i Ewingova sarkomu.

#### **b) Klinický farmakologický purging:**

1. Čištěním štěpu PBSC prováděným etopozidem s preinkubací buněk štěpu amifostinem lze získat štěp zajišťující bezpečné přihojení. Vždy je však nutné ponechat část štěpu nečištěnou, jako zálohu pro případ selhání čištěného štěpu.
2. Srovnáním s kontrolní skupinou pacientů nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl v době přihojení, potřeby transfuzí erymasy a trombocytů ani v počtu febrilních dnů.
3. Při výzkumu MRD v autologních štěpech PBSC u pacientů s Ewingovým sarkomem autor prokázal:
  - výskyt kontaminace štěpů PBSC ve shodě s literárními údaji.
  - častěji byla zjištěna kontaminace štěpů PBSC u pacientů s primárně generalizovaným Ewingova sarkomu
  - Kontaminace štěpu je nepříznivý prognostický znak.

### **Připomínky k práci, nedostatky a návrhy na další výzkum:**

Připomínky rozhodujícího významu nemám. Jako dílčí nedostatky nebo návrhy alternativních možností uvádím:

- Ačkoliv je práce po stránce formální velmi dokonalá, chybí na str. 30 proklamovaná tabulka o výsledcích ovlivnění CD 34+ buněk, dále 2 stránky citací a příloha č. 4 není patrně zcela kompletní.
- Přes důkazy o významnosti purgingu je v poslední době spíše tendence k odklonu od purgingu a zvláště od farmakologického. Neznám studii u solidních nádorů dětského věku ve smyslu „evidence based medicine“ o prokázáném příznivém efektu purgingu. Co soudí autor na základě svých zkušeností o tomto problému a očekává do budoucna randomizovanou studii zaměřenou na průkaz efektivity čištění štěpu a pokud ano u kterých nádorů a jaký postup „purgingu“ bude využíván?
- Práce vedla k získání několika nových a originálních poznatků. Není však dosud jednoznačná odpověď na kontaminaci štěpu, proč je to nepříznivým znakem - je to spíše známka chemorezistence nebo jsou hlavní příčinou nádorové buňky ve štěpu?
- Velmi pozitivní je to, že autor navrhl některé směry dalšího výzkumu a možných modifikací, které jistě v léčebném algoritmu transplantací v budoucnu budou třeba. To ukazuje hlubokou znalost problematiky, schopnost tvůrčí badatelské činnosti a schopnost autora vyvodit z daných výsledků správné závěry.

### **Z á v ě r :**

Jde o velmi hodnotnou dizertační práci. Rozhodně splňuje požadavky kladené na dizertační práce. Je naplánována, provedena a sepsána vědecky odpovídajícím způsobem. Řeší velmi aktuální tematiku, významnou pro další rozvoj vědy i společenskou praxi. Cílům práce odpovídá vhodná metodika. Cíle byly splněny. Vědecké hodnocení výsledků je provedeno přesným způsobem. Z výsledků jsou vyvozeny správné závěry. Práce je sepsána srozumitelnou formou, a to i vzhledem k unifikaci dokumentace, je velmi dobře dokumentována, graficky celkově rovněž na velmi dobré úrovni. V práci jsem nenalezl podstatnější nedostatky. Bylo docíleno

významných výsledků nebo i originálních poznatků, zmíněných již v posudku výše a vypracována vlastní v klinice autorem uplatněná metoda purifikace štěpu. Práce ukazuje výbornou úroveň celého pracoviště.

Práce vyhovuje všem předpisům pro dizertační díla. Autor plně prokázal schopnost samostatné tvořivé vědecké práce včetně publikace výsledků v impaktovaných časopisech. Proto navrhuji tuto práci přijmout k obhajobě a dr. Sumeraerovi udělit titul „PhD“.

---

Prof.MUDr.Milan Bláha, CSc.