

Oponentský posudek disertační práce : **Detekce a ex vivo eliminace reziduálních nádorových buněk Ewingova sarkomu perzistujících v autologních štěpech hematopoetických kmenových buněk**

MUDr. David Sumerauer

KDHO FN a LF Praha Motol

Disertační práce MUDr. Davida Sumerauera „Detekce a ex vivo eliminace reziduálních nádorových buněk Ewingova sarkomu perzistujících v autologních štěpech hematopoetických kmenových buněk“ byla vypracována na Klinice dětské hematologie a onkologie FN Motol a 2. LF UK Praha. Vlastní text má 66 stran a je bohatě doplněn obrázky, tabulkami a grafy. Oponentovi v práci schází jen seznam obrázku, grafu a tabulek, stejně tak by bylo možná vhodně sjednotit jazyk obrázku, kdy některé obrázky jsou česky, některé anglicky. Seznam literatury obsahuje 116 citací převážně prací zahraničních autorů, v menší míře i domácích autorů. Citace jsou se vztahem k tématu, ale jen částečně recentní.

Vlastní práce je přehledně členěna. Obecný úvod do řešené problematiky se zabývá problematikou detekce minimální reziduální nemoci, kontaminací štěpu a možnostmi čištění štěpu. V rámci dalších kapitol je popis souboru pacientů podrobný, rozbor metod použitých v práci. Samostatné kapitoly jsou věnovány vlastním výsledkům experimentální práce. Kapitoly věnované shrnutí dosažených výsledků práci uzavírají.

a) Tématicky představuje problematika event. kontaminace štěpu při transplantaci o velmi složité, klinicky významnou a aktuální problematiku.

Práce se zabývá velmi rozsáhlou, aktuální, klinicky závažnou ale také velmi komplikovanou a dosud stále diskutovanou problematikou - tedy místa a způsobu podání vysoko dávkované chemoterapie v léčbě solidních nádorů dětského věku, se zaměřením na Ewingův sarkom. Jestliže u neuroblastomu lze význam HDT pro zlepšení celkového výsledku léčby považovat za prokázaný, u sarkomu tomu tak ještě zdaleka není. Většina publikovaných výsledků pochází z malých, retrospektivních, single-arm studií. Randomizovaná klinická studie hodnotící význam HDT s autologní rescue nemanipulovaným štěpem u Ewingova sarkomu (Euro Ewing 99) teprve probíhá, u ostatních sarkomů je situace ještě méně přehledná. Dosud publikovaná literatura sice ukazuje, že autologní transplantace je zřejmě pro většinu dětí ekvivalentní, či výhodnější než konvenční léčba, nicméně heterogenita souboru,

selekční faktory, charakteristiky štěpu, a variabilita přípravných předtransplantačních režimů jsou faktory, které nelze pomíjet.

Naprostá většina literatury, o kterou se autor ve své práci opírá pochází z poloviny, respektive z druhé poloviny 90. let. Avšak od té doby se situace změnila, například v tom, že se podařilo významně snížit toxicitu vlastní autologní transplantace a naprostá většina léčebných selhání jde dnes na vrub progresi základního onemocnění. Zde je potřeba velkých, tedy mezinárodních randomizovaných studií, s jasně definovanými skupinami pacientů, tak, aby bylo možno jasně odpovědět na jasně definované otázky, včetně vůbec role HDT s autologní SCR u jednotlivých skupin dětí se solidními nádory, a to i dnes v kombinaci s dalšími, nově nastupujícími léčebnými modalitami, jako je například imunoterapie, včetně buněčné terapie (dendritické buňky po auto SCT u dětí s neuroblastomy), cílená léčba, či event. antiangiogenní léčba.

Šancí jednoho, byť i velkého pracoviště dětské onkologie v konkurenci významných kooperativních skupin dětské onkologie jak generovat zajímavá, a v kvalitních časopisech publikovatelná data, je využít své akceschopnosti a relativně rychle vyprodukovat zajímavá experimentální, event. na experimenty navazující klinická phase I- phase II data, testující aktuální myšlenky rychleji, než toho jsou schopny velké, administrativně nesmírně komplikované kooperativní skupiny. Tuto velkou šanci měl doktorand koncem 90. let, avšak dle názoru oponenta ji propásl. Problematika farmakologického čištění autologního štěpu je dnes poněkud mimo hlavní proud výzkumu u solidních nádorů dětského věku.

b) Za cíle své disertační práce si autor vytýčil:

- 1) Stanovení vhodných znaků a určení optimální metodiky k detekci minimální nádorové choroby ve štěpech kostní dřeně a periferních hematopoetických progenitorových buněk (PBSC) u Ewingova sarkomu
2. Vyšetření štěpu na přítomnost minimální nádorové choroby.
3. Vypracovat metodiku farmakologického *ex vivo* čištění štěpu
 - a. Snížit toxický účinek cytostatika (mafosfamidu, etoposidu) na hematopoetické kmenové buňky v průběhu *ex vivo* purgingu předchozí inkubací s amifostinem.
 - b. Ověřit metodiku v experimentu a pokud experimentální data potvrdí protektivní účinek inkubace s amifostinem ověřit metodiku na štěpech určených ke klinickému použití a potvrdit použitelnost takto manipulovaných štěpu v klinické studii

Jak již předesláno, jedná se velmi rozsáhlou a komplikovanou problematiku zahrnující jak náročné oblasti laboratorní, tak velmi složité části klinické. Rozsah řešené problematiky tak dle názoru oponenta překračuje obvyklý rámec projektu řešených v rámci postgraduálního studia.

c) Metody sběru vzorku, jejich zpracování, klinickou část, i následující analýzu a statistické hodnocení lze považovat za standardní a oponent zde má následující připomínku:
V práci není zmíněno technické zázemí pro manipulaci se štěpy. Byl dodržen požadavek „třída A na pozadí třídy B“? Autor velmi dobře dokumentuje systém vnitřní kontroly – např. viability štěpu po manipulaci, znamená to, že požadavky na čistotu a technické parametry prostředí byly nahrazeny zjevně dobře fungujícím systémem vnitřní kontroly?

d) disertační práce přinesla následující poznatky:

• **MRD v autologních štěpech PBSC u pacientu s ES**

Autor zavedl metodiky detekce MRD u dětí s Ewingovým sarkomem do klinické praxe svého pracoviště.

1. Kontaminaci štěpu PBSC prokázal ve shodě s literárními údaji
2. U pacientu s primárně generalizovaným ES byla kontaminace štěpu prokázána nesignifikantně častěji.
3. Kontaminace štěpu se jeví nepříznivým prognostickým znakem.

• **Experimentální farmakologický purging**

1. Mafoslamid i etopozid redukoval počty koloniformních jednotek CFU-GM a BFU-E, a *nález podporuje nutnost kultivačního vyšetření všech ex vivo manipulovaných štěpu*
2. Použití etoposidu v koncentraci 40 µg/ml s patnáctiminutovou preinkubací ethyolem v koncentraci 4 mg/ml neredukuje neúnosně počet buněk obnovujících krvinek a redukuje počet nádorových buněk, které mohou štěp kontaminovat.
3. Ochranný vliv amifostinu na hematopoetické kolonie nedosáhl statistické významnosti.

4. V experimentu nebyl prokázán ochranný vliv amifostinu na buňky nádorových linií ES a neuroblastomu

- **Klinický farmakologický purging**

1. Čištěním štěpu PBSC prováděným etopozidem s preinkubací buněk štěpu amifostinem bylo možno získat štěp zajišťující bezpečné příhojení.

2. Srovnáním s kontrolní skupinou pacientů nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl v době příhojení, potřeby transfúzí erymasy a trombocytu ani v počtu febrilních dnu.

e) předloženou disertační práci lze hodnotit v souhrnu kladně. Autor dostal vytčeným cílům disertace.

K práci mám následující otázky či připomínky:

- ad str. 7: kandidát zde uvádí, že „relativní specifická“ se uplatňuje například při detekci MRD u neuroblastomu, kde s úspěchem využíváme prukazu transkriptu mRNA genu pro tyrozin hydroxylázu (TH, první enzym v kaskádě syntézy katecholaminu, které tvoří 98% neuroblastomu) nebo případně GD2 syntetázu. Tyto znaky jsou přítomny v buňkách neurogenních nádorů i některých nenádorových tkání, ale nikoli v buňkách KD^+ . Toto tvrzení však není zcela přijímáno. Zpochybňuje je např. recentní práce Kuei Z et al.: Pitfalls in detection of contaminating neuroblastoma cells by tyrosine hydroxylase RT-PCR due to catecholamine-producing hematopoietic cells. *Anticancer Res.* 2006 May Jun;26(3A): 2075-80. event. jako ne zcela jednoznačný vnímá tento problém i další recentní práce: Swerts K et al: Potential application of ELAVL4 real-time quantitative reverse transcription-PCR for detection of disseminated neuroblastoma cells. *Clin Chem.* 2006 Mar;52(3):438-45.
- ad str. 8: kandidát má zřejmě jako prvního autora uvedeného v práci kolektivu ze St. Jude na mysli R Handgretingera.
- V části věnované protektivnímu efektu amifostinu oponent postrádá rozsáhlejší, kritickou diskusi na toto stále velmi kontraversní, ale stále velmi aktuální téma. V této části je nejnovější citace z roku 1999. Oponent by považoval za vhodné také zmínit recentně publikované negativní výsledky prospektivní pediatrické studie s amifostinem u dětí s maligními germinálními nádory zaměřené na prukaz efektivity amifostinu snížit nonhematologickou toxicitu konvenční chemoterapie - Marina N. et al: Amifostine does not protect against the ototoxicity of high-dose cisplatin combined with etoposide and

bleomycin in pediatric germ-cell tumors: a Children's Oncology Group study. *Cancer*. 2005 Aug 15;104(4):841-7. event. některé další klinické práce hodnotící roli amifostinu v transplantologii (např. Gabriel DA Cytoprotection by amifostine during autologous stem cell transplantation for advanced refractory hematologic malignancies. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2005 Dec;11(12):1022-30. event. cenné souhrnné práce konstatující jednak aktuálnost tématu, ale i trvající kontraverze ve vztahu ke klinickým aplikacím amifostinu. (Viz van den Berg JH Future opportunities in preventing cisplatin induced ototoxicity. *Cancer Treat Rev*. 2006 Aug;32(5):390-7. Epub 2006 Jun 15. event. Block KI. Commentary: the pharmacological antioxidant amifostine - implications of recent research for integrative cancer care. *Integr Cancer Ther*. 2005 Dec;4(4):329-51

- V práci je celkově překvapivě málo recentních publikací týkající se problematiky, kdy je citována jen jediná práce z roku 2005 (a to ještě z vlastního pracoviště) a pouze 5 prací z roku 2004.
- Jaký je názor kandidáta na fakt, že v posledních 6 letech prakticky chybí publikované práce na téma farmakologický purging u dětských solidních nádorů?. Objevují se práce o farmakologickém purgingu u leukémií – např. Berger M et al., Stem cell transplantation as consolidation therapy for children in first-remission AML: a single-center report. *Pediatr Hematol Oncol*. 2005 Oct-Nov;22(7):597-608. kde autoři k čištění štěpu používají právě mafosfamid. Srovnání vlastních výsledků s recentně publikovanými by jistě práci prospělo.
- Oponent dále postrádá v práci odkazy na jedinou v současné době probíhající randomizovanou studii s purgingem u dětských solidních nádorů – severoamerickou A3973, srovnávající léčbu dětí s neuroblastomy vysokého rizika za použití čištěného a nečištěného štěpu.
- Další dotaz se týká problematiky purgingu etoposidem. Jedná se o postup, který není příliš rozšířen, viz. např. Olivieri A et al: Pharmacologic bone marrow purging: is there any place for etoposide? In vitro comparison with mafosfamide. *J Hematother*. 1997 Apr;6(2):137-44. Co je autorovi známo, resp. jaký je názor autora na bezpečnost tohoto postupu z hlediska dlouhodobé bezpečnosti, např. indukce sekundárních leukémií?

Hodnocení vlastních publikovaných prací předkladatele disertace:

K disertační práci jsou přiloženy celkem 4 publikace, kde předkladatel disertace je prvním autorem u jedné původní práce a jedné souhrnné práce, u 2 dalších (z toho jedné kazuistiky) je spoluautorem.

Přiložená práce č. 4 není ve vázané formě disertace kompletní.

Oponent jako nejcejnější hodnotí práci uvedenou v příloze jako 3 - *KRSKOVÁ L., MRHALOVÁ 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*, publikovanou ve *VIRCHOWS ARCH.* 448(4):449 - 458, 2006, která se však pohřichu netýká Ewingova sarkomu.

Celkově se oponent domnívá, že úctyhodné množství předkladatelem nesporně a prokazatelně odvedené práce, šíře celé problematiky (detekce MRD, vlastní indikace a provádění purgingu, následná klinická péče o pacienty) to vše poskytovalo předkladateli dostatek klinického i laboratorního materiálu i k většímu počtu kvalitních publikací s jasnějším vztahem k tématu.

Závěr: Předložená disertační práce je prací dobré úrovně, v níž autor prokázal znalost řešené problematiky i předpoklady pro výzkumnou práci. Autor si zvolil velmi obtížné, široké a komplikované téma, které svou komplexností a šíří je dle názoru oponenta nad běžný rámec prací řešených při postgraduálním studiu. Autor dostal náročně proponovaným cílům disertační práce, avšak tyto cíle byly formulovány na základě znalostí a situace z druhé poloviny 90. let. Byla-li by práce předložena k obhajobě kolem roku 2000, jednalo by se jednoznačně o prioritní a velmi přínosnou práci.

Z výše uvedených důvodů **doporučuji práci k obhajobě.**

V Brně, 5.9.06

Doc. MUDr. Jaroslav Štěrba, Ph.D.

Klinika dětské onkologie FN Brno a LF MU