



Oponentský posudek na habilitační práci

autora RNDr. Marka Minárika, Ph.D. – z Interní kliniky 1. LF UK a ÚVN,
Přírodovědecké fakulty UK a Genomac výzkumného ústavu, s.r.o.

název: „Využití somatických DNA mutací v diagnostice, léčbě a sledování
sporadických gastrointestinálních nádorů“.

Hodnocení předložené habilitační práce sleduje následující oponentská kritéria:

1. Rozsah práce a dokumentace

Autor prezentuje svou práci formou komentované verze habilitační práce. Prvních patnáct stran je věnováno Úvodu (s podkapitolami: Klasifikace mutací, Mechanismy mutagenese, Somatické mutace jako faktory vzniku a progresu maliních tumorů, Karcinogeneze nádorů trávicího traktu, Molekulární modely vybraných nádorů trávicího traktu). Na straně 19 až 27 jsou postupně uvedeny výsledky šesti autorových publikací. Dalšími kapitolami jsou: Diskuse, Závěr, Poděkování, Seznam obrázků, Seznam použitých zkratk, Literatura, Seznam publikací, které jsou předmětem habilitační práce a Přílohy, kde je *in extenso* předloženo šest publikací.

V první z přetištěných publikací, otištěné v Electrophoresis, 2004, s IF 3,743 je předkladatel prvoautorem i korespondujícím autorem, ve čtyřech dalších je korespondujícím autorem (World J Gastroenterol, 2016, IF 2,787, World J Gastroenterol, 2007, IF 2,081, Anticancer Res, 2012, IF 1,656, Anal Biochem 2013, IF 3,236), v jednom je spoluautorem (Gastroenterol Res Pract., 2016, IF 1,742).

Práce je velmi přehledná, s velmi dobrou úpravou, několik drobných překlepů nijak nesnižuje kvalitu práce. I po formální stránce je tedy na velmi dobré úrovni.

Všechny použité publikace jsou v dané problematice na velmi dobré úrovni, o čemž svědčí výčet a kvalita uvedených časopisů.

2. Zpracování tématu s ohledem na dosavadní stav dané problematiky (literární zázemí, přiměřenost citovaných pramenů či naopak jejich opomenutí)

Pro zpracování autor použil 63 citovaných prací, které jsou v daném oboru zásadní a nechybí mezi nimi ani nejaktuálnější publikace z letošního roku.

3. Vhodnost použitých metod a postupů

Ve všech uvedených publikacích jsou používány aktuální technicky dostupné a eticky přijatelné metody.



4. Kvalita docílených výsledků, měření a pozorování

Autor zavedl rutinní použití denaturační kapilární elektroforézy při profilování mutací významných řídicích genů u kolorektálních adenomů a karcinomů získaných metodou endoskopické polypektomie a endoskopické biopsie. Bylo zjištěno, že metodu lze využít i v situaci, kdy klasické sekvenování (považované za zlatý standard) již neposkytuje dostatečnou citlivost. Dále bylo demonstrováno, že metoda je univerzálně použitelná pro různé typy mutací vyskytujících se na daném místě.

Byla opublikována komplexní molekulární charakterizace kolorektálních lézí. Na základě provedených vyšetření byly všechny léze stratifikovány do nově definovaných tzv. molekulárních CRC typů. U karcinomů má toto nové dělení dle recentní literatury význam při odhadu prognózy přežití pacientů. Byl potvrzen významný výskyt rizikového Typu 3 v pravém tračníku (vyznačující se CIMP-fenotypem a současnou přítomností mutace protoonkogenu BRAF). Pro vyšetřování vybraných somatických mutací z tenkojehlových biopsií za účelem rozlišení chronické pankreatitidy a karcinomu pankreatu byla vyvinuta metoda účinné extrakce DNA. Vyšetření byla zaměřena na bodové mutace genů KRAS, TP53 a CDKN2A/p16 a LOH genů CDKN2A/p16 a DPC4. Četnosti jednotlivých poruch byly ve shodě s literaturou. Na základě získaných dat byl sestaven algoritmus využívající molekulární markery jako nadstavbu standardního cytologického vyšetření, což zcela eliminovalo nekonkluzivní výsledky.

Dalším příspěvkem bylo sledování prognostických markerů potenciálně vhodných pro odhad přežití pacientů s pokročilým karcinomem žaludku. Na základě multifaktoriální analýzy byla odhalena statistická významnost u dvou hlavních regulátorů buněčného cyklu – u cyklinu D1 (CCND1) a u genu p27 neboli cyklin-dependentního kinázového inhibitoru 1B (CDKN1B/p27). V obou případech korelovala genová amplifikace s téměř 4násobným zkrácením mediánu přežití pacientů.

V práci zabývající se vyšetřováním somatických mutací cirkulující nádorové DNA v pooperačním sledování pacientů léčených pro metastatický karcinom tlustého střeva a konečníku je demonstrováno klinické využití metodiky detekce a sledování hladin ctDNA na základě detekce nádorově-specifické somatické mutace ve tkáni nádoru a následně záchytu této mutace v periferním oběhu u pacientů s metastatickým kolorektálním karcinomem. Dynamika změn hladin ctDNA vždy korelovala se stupněm radikality léčby.

5. Náležitost statistického zpracování výsledků a vhodnost jejich grafické či tabelární prezentace

Všechny výsledky z uvedených publikací jsou náležitě statisticky zpracovány a rovněž jejich grafická a tabelární prezentace je vhodná.

6. Rozbor výsledků v porovnání se současným stavem znalosti (diskuse a závěry).

Viz rovněž ad 4. Výsledky práce jsou přínosem při profilování kolorektálních nádorů, pro zlepšení diagnostiky karcinomu pankreatu, při odhadu prognózy přežití u karcinomu žaludku a pro monitorování nemoci v pooperačním sledování pacientů s metastatickým kolorektálním karcinomem. Důležitý je i přínos poznatků o zpracování vzorků a využití citlivé denaturační kapilární elektroforézy.



Pro klinickou praxi je významný výsledek vyšetřování somatických mutací v cytologických preparátech pro zpřesnění EUS-FNA diagnostiky pankreatických lézí, potvrzením je vysoká citovanost příslušné publikace. Slibný potenciál má také poznatek o prognostické významnosti genové amplifikace cyklinu D1 (CCND1) a cyklin-dependentního kinázového inhibitoru 1B (CDKN1B) u pokročilých forem karcinomu žaludku. Souvislost této aberace dosud nebyla v literatuře popsána a tyto geny mohou být potenciálními biomarkery, případně terapeutickými cíli.

Vyšetřování somatických mutací se v posledních letech stalo zcela nedílnou součástí diagnostiky a léčby gastrointestinálních nádorů. Umožňuje zpřesnění iniciální diagnostiky, přispívá ke stanovení rizika a odhadu prognózy pacientů a predikce odpovědi na biologickou léčbu. Informace tak pomáhají při racionální rozhodování o léčebném postupu. Vyšetřování ctDNA v periferním oběhu je důležitým trendem v současné molekulární patologii a je zaváděno do klinické praxe jako minimálně invazivní nástroj pro sledování pacientů s metastatickým onemocněním. Slouží jak ke zjištění aktuálního stavu přítomnosti prediktivních mutací v nádoru tak k vyhodnocení terapeutického účinku v průběhu léčby a umožňuje i časný záchyt rekurence onemocnění.

7. Stanovisko vycházející z předchozího rozboru a celkové hodnocení práce:

Předložená práce podává ucelený přehled o využití vyšetřování somatických DNA mutací v diagnostice, léčbě a sledování sporadických gastrointestinálních nádorů. Jak vyplývá z předchozího rozboru, práce potvrzuje a rozšiřuje dřívější pozorování jiných autorů a přináší i některé nové vědecké poznatky, je tedy přínosem v daném oboru.

8. Závěr:

Doporučuji práci přijmout v předložené formě a na jejím základě doporučuji udělit RNDr. Markovi Minárikovi, Ph.D. titul docent pro obor lékařská biologie a genetik.

V Olomouci, 20. července 2017

doc. RNDr. Radek Vrtěl, Ph.D.
Ústav lékařské genetiky FNOL

