

Onkologická klinika Všeobecné fakultní nemocnice

a

1. lékařské fakulty UK

U Nemocnice 2, Praha 2, 128 08

V Praze 29.1. 2006

Oponentský posudek magisterské diplomové práce Bc. Jany Němcové:

Kvantifikace exprese genů metabolismu 5-fluorouracilu jako predikce citlivosti k léčbě prekursorů 5-FU u pacientů s kolorektálním karcinomem

Diplomová práce je vhodně rozdělena do osmi na sebe navazujících částí.

V úvodu se autorka věnuje zákonitostem maligní transformace jak v rovině obecné, tak i konkrétně na příkladu kolorektálního karcinomu. Diplomantka dostatečně pochopila a vysvětlila zásady onkologické léčby tohoto nádorového onemocnění. Vyčerpávajícím způsobem jsou prezentovány metodické přístupy k analýze exprese zvolených enzymů. Cíl práce je jasně definován. Metodika je popsána podrobně a srozumitelně. Výsledky jsou přehledně zpracovány a vhodně doplněny řadou grafů a tabulek. Diskuse obsahuje kritické zhodnocení vlastních výsledků ve vztahu k výsledkům dosažených jinými pracovními skupinami. V závěru autorka shrnuje své poznatky.

K práci mám následující připomínky a dotazy:

1. Z formálního hlediska by měla autorka věnovat větší pozornost dodržení odborného názvosloví a vyvarovat se překlepů a gramatických chyb.
2. Shrnutí klasifikace kolorektálního karcinomu v teoretické části je jistě na místě (obrázek 1.), v části metodika (tabulka 1.) již jde o zbytečné duplicitní zařazení.
3. V části úvodu věnované molekulárním aspektům postrádám podrobnější zmínku o katabolické přeměně 5-FU.
4. V metodice se diplomantka podrobně věnuje izolaci RNA z leukocytů periferní krve, ovšem žádný takový odběr není v cílech definován a ve výsledcích zpracován. Rád bych požádal o vysvětlení a seznámení s dosaženými výsledky.

5. Při analýze stejných cílových genů v naší laboratoři jsme se potýkali s problémem, jakou část nádoru zvolit k izolaci mRNA a kvalitativní expresi prediktorů. Imunohistochemicky jsme totiž pozorovali vysokou expresi TP ve stromálních buňkách a nikoliv v nádoru. Jakým způsobem bylo ověřeno, že vyšetřovaná tkáň byla opravdu tkáň nádorová? Byl zjišťován podíl nádorových buněk a buněk stromatu v odebraném vzorku?
6. V kapitole metodika chybí přesnější charakteristika pojmu „předléčba“.
7. V kapitole výsledky postrádám základní charakteristiku souboru nemocných.
8. Z klinického pohledu je nepochopitelná absence systematického vyhodnocování účinků léčby a sledování nežádoucích účinků terapie. Tato výtka však směřuje na adresu kooperujících zdravotnických zařízení a diplomantkou nemohla být ovlivněna. Bohužel, potenciálně velmi zajímavé vztahy, které by mohly přispět k optimalizaci protinádorové chemoterapie, tak nemohly být na tomto unikátním rozsáhlém souboru nemocných analyzovány. Výsledky jsou tak uvedeny pouze deskriptivně, nikoliv v časové ose s možností vyhodnotit vztah mezi expresí uvedených prediktorů a dalších parametrů (času do progresu nemoci, času bez známek onemocnění, celkového přežívání apod.).
9. Z obrázku 10 na straně 50 vyplývá, že vyšší exprese TP byla zaznamenána u nemocných s uzlinovým postižením. Nevím však, zda-li se jedná o měření exprese TP v primárním nádoru či uzlinách. Pakliže se jedná o vztah exprese TP měřené v primárním nádoru a uzlinového postižení, rád bych se seznámil s možným vysvětlením tohoto jevu.
10. Seznam literatury nemá sjednocené formátování.

I přes uvedené připomínky dokazuje autorka dostatečné teoretické znalosti. Zvládla řadu náročných molekulárně biologických metodik a dosáhla anotovaného cíle. Proto práci doporučuji k obhajobě a v případě úspěšné oponentury navrhuji udělení titulu Mgr.



MUDr. Jan Novotný, PhD.



Ústav lékařské genetiky a fetální medicíny
Lékařské fakulty Univerzity Palackého Olomouc

I. P. Pavlova 6, 775 20 Olomouc

Přednosta:

prof. MUDr. J. Šantavý, CSc.

V Olomouci 26.1.2006

Oponentský posudek magisterské diplomové práce Bc. Jany Němcové:

**Kvantifikace exprese genů metabolismu 5-fluorouracilu jako predikce citlivosti k léčbě
prekurzory 5-FU u pacientů s kolorektálním karcinomem**

Práce je logicky a přehledně strukturována do 8 kapitol, v úvodu se autorka věnuje v dostatečné míře problematice, diagnostice a terapii CRC a popisuje enzymatické modulátory 5-fluorouracilu. Další součástí úvodu je popis nejčastějších metodik a postupů kvantifikace PCR produktů založených na real-time systémech.

Cíl práce je přesně a jednoznačně definován. Metodika je podána podrobně a fundovaně. Výsledky jsou zpracovány použitím vhodných statistických metod.

V obsáhlé diskusi se autorka nejdříve věnuje možným rizikům, které by mohly výsledky ovlivnit, a poté srovnává svoje výsledky s podobnými, již publikovanými. Dále probírá vztahy mezi hladinami exprese genů navzájem a kromě toho korelaci výsledků s dostupnými klinickými daty. V závěru autorka shrnuje své poznatky.

K práci mám následující připomínky a dotazy:

Úvodní anotace v angličtině je napsána poněkud kostrbatě, s věcnými i formálními chybami (autorka v anotaci hodlá například kvantifikovat geny a nikoli transkripty).

Vzhledem k analýze genové exprese by mohly být sledované geny popsány přesněji včetně schematického znázornění amplifikovaných oblastí. U genu TS není např. popsána vůbec lokalizace.

V kapitole 3. (materiál a metodika) není definován soubor pacientů a vzorků. Není zde přesněji popsán způsob předléčby (zda-li pouze 5-FU nebo jeho deriváty, dávkování, podpůrná medikace apod.).

Tab. 1 je již součástí obr.3.

Tab. 1 na straně 39 je jiná než tab. 1 na straně 42.

Tab. 1 na straně 42 se překrývá s tabulkou 1 na straně 60.

Podobně i číslování obrázků je vlastní každé kapitole.

Kapitola 4.1 ve výsledcích patří, až na závěrečnou větu, spíše do metodiky.

Ve výsledcích a jednotlivých grafech (obr. 6 – 19) chybí četnosti posuzovaných souborů.

U obr. 1 (str. 41) chybí popis jednotlivých křivek.

Popis v 4.3 neodpovídá počtům vzorků v tab.1 (str. 42).

V grafech (obr. 2-5) neodpovídají maximální hodnoty uvedené v tabulce 1 (str. 43).

V tabulce 5 (str. 48) je uváděn počet pacientů v kategorii „léčba před odběrem“ 36 a na str. 51 byl tento počet 32.

Ve výsledcích by mohlo být demonstrováno (zvláště u zajímavých případů) více vlastních amplifikačních křivek z real-time PCR.

Seznam zkratk je neúplný.

Zkratka C_p má v práci 2 zcela odlišné významy.

Použitá literatura a zdroje nemají sjednocenou formu a obsahují chyby.

V celém textu se občas vyskytují překlepy a pravopisné chyby .

Jakým způsobem lze korigovat výsledek kvantifikace na úrovni mRNA, když v případě genu TS působí i jako zpětnovazebný inhibitor vlastní translace a může tedy ovlivnit množství enzymu? (kap. 1.1.9)

Jaké změny v genu mohou způsobovat sestříhové mutace? V kapitole 1.1.11 se uvádí, že záměnu aminokyselin.

Proč si autorka vybrala k výpočtu C_p metodu druhého derivačního maxima?

Jakým způsobem prováděla autorka kontrolu kvality izolované RNA a stupně její degradace?

V kolika případech se kvantifikace nezdařila?

Testovala autorka různá ředění RNA v rámci jednoho vzorku a vliv různé výchozí koncentrace na vlastní kvantifikaci?

Jaký je rozdíl u proměnných „předléčba“, „léčba před odběrem“ (tab.4 str. 46)?

Z jakého důvodu se upustilo od testování exprese TP genu?

Uvažuje se o zavedení testování exprese genu PRPP?

I přes uvedené připomínky dokazuje autorka v teoretické části orientaci a přehled v oblasti studia exprese TS, TP a DPD genů, v praktické části prokázala, že zvládla poměrně náročnou metodiku kvantifikace RNA s využitím Light cycleru. V diskusi byla schopna porovnat a kriticky analyzovat své výsledky a zhodnotit další možné přístupy.

Práci doporučuji k obhajobě a v případě úspěšné oponentury navrhuji udělení titulu

Mgr.

Radek Vodička, Ph.D.