

Vážený pan
Doc. RNDr. Vladimír Divoký, Ph.D.
Předseda oborové rady DSP Lékařská biologie

Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci
Hněvotínská 3
771 00 Olomouc

Oponentský posudek dizertační práce Mgr. Zlaty Hruškové „Biomarkery, tekutá biopsie a studium steroidních derivátů u karcinomu prostaty“

Předkládaná práce má 132 stran plus přílohy, je klasicky strukturována a zpracována. Více než třetinu práce zaujímá teoretický úvod, vlastní výzkum pak 50 stran. Autorka cituje desítky většinou zahraničních publikací. Kapitola výsledků je rozdělena prakticky podle témat.

Práce se věnuje třem tématům, které spolu souvisí pouze ve vazbě na karcinom prostaty, a proto v celku působí dost „roztrhaně“. Práce je také dosti dlouhá, a to hlavně v teoretickém úvodu. V návaznosti na to pak, jako klinik, musím namítnout, že v tak dlouhém teoretickém úvodu je řada nepřesností nebo úplných nesmyslů. Samozřejmě, že do studijního programu Lékařská biologie nelze zatahovat diskuze, rozpory v detailech a neustále se měnící poznatky z klinické urologie, ale práce působí dojmem, že ji klinik vůbec nečetl ani nekonzultoval.



Fakultní nemocnice Ostrava

17. listopadu 1790/5 / 708 52 Ostrava-Poruba
Telefon: +420 597 371 111 / Fax: +420 596 917 340
E-mail: posta@fno.cz / www.fno.cz / datová schránka: u2nmpm2
DIČ: CZ00843989 / IČO: 00843989
Číslo účtu: ČNB Ostrava, 66332761/0710

Kód MTZ: 3602032

Pokud jde o význam dizertační práce pro příslušný obor, tedy v praxi urologii, resp. onkourologii, je třeba uznat, že karcinom prostaty je obrovský klinický i společenský problém (a to hlavně s ohledem na incidenci a prevalenci).

Karcinom prostaty se prezentuje v široké paletě klinických stavů. Od karcinomů indolentních, kde jejich diagnóza může pacienta poškodit víc než rakovina samotná, až po vysoce zhoubné varianty. Kromě zavedení MRI v posledních dekádách se diagnostika stále opírá pouze o PSA a jehlovou biopsii.

Existuje jen velmi málo použitelných diagnostických i prognostických faktorů a oblast genetiky je tak velkou možností budoucího zlepšení péče o tuto nejpočetnější a velmi nákladnou skupinu pacientů. Také možnost tekuté biopsie místo multiplikované jehlové/orgánové biopsie je velmi lákavá.

Přes mé výhrady k úvodu je experimentální část, a její použité metody, dobře zpracovaná a plní tak stanovené cíle. Význam závěrů je pak potvrzen i řadou recenzovaných publikací a vysokým IF.

Poznámky (namátkou):

1. Práce i teoretický úvod se věnují kohortě pacientů s PSA 2,5–10. Klinická praxe a řada studií ale dokládají, že prevalence karcinomu prostaty je významná i při nižších hodnotách PSA (strana 9). U BPH se nepočítá s PSA <4 ng/ml (strana 14).
2. Při operaci prostaty do 80 ml se neprovádí laparoskopie, ale transuretrální resekce (strana 15). A ani to není přesné.
3. Příznaky podobné BPH se neobjevují u lokálních nádorů, ale lokálně pokročilých (strana 17).
4. V oblasti bederní páteře nejsou žebra (strana 17).
5. Nerozumím větě: Rakovina prostaty je charakterizována LUMBÁLNÍ proliferací... (strana 18). Lumbální v medicíně znamená bederní.
6. Hladiny PSA pod 2,5 neznamenalí zdravou prostatu a 4–10 ng/ml není šedá zóna (strana 19). Tento údaj je neplatný více, jak 20 let.
7. V odstavci 1.3.3.3 je první část první věty nesmysl.
8. V odstavci 1.3.6 je smíchána histologická diferenciaci a klinické riziko karcinomu... atd.

Otázky:

Zajímalo by mě, jde-li číselně vyjádřit počet pacientů „ušetřených“ od biopsie prostaty a naopak počet „uniklých“ karcinomů při použití kombinace AMARC, PCA3 a % volného PSA, jak je zmiňováno v závěru práce, proti běžným indikačním pravidlům diagnostiky karcinomu prostaty. Jaká by byla vhodná cut off hodnota, kdo by byl indikován k biopsii a komu by byla biopsie odsunuta.



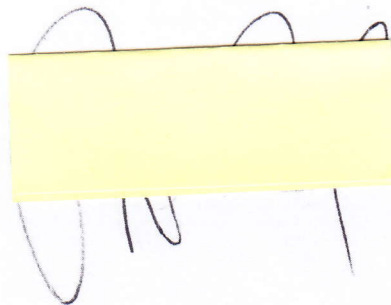
Fakultní nemocnice Ostrava

17. listopadu 1790/5 / 708 52 Ostrava-Poruba
Telefon: +420 597 371 111 / Fax: +420 596 917 340
E-mail: posta@fno.cz / www.fno.cz / datová schránka: u2nmpm2
DIČ: CZ00843989 / IČO: 00843989
Číslo účtu: ČNB Ostrava, 66332761/0710

Kód MTZ: 3602032

Po úpravě úvodu (zkrácení) předloženou disertační práci doporučuji k obhajobě a po jejím splnění může být udělen akademický titul doktor (ve zkratce Ph.D.) dle paragrafu 47 Zákona o vysokých školách č 111/98 Sb.

V Ostravě 8. února 2022



MUDr. Michal Grepl, Ph.D.

přednosta Urologické kliniky

Fakultní nemocnice Ostrava a Lékařská fakulta Ostravské univerzity

Tř. 17. listopadu 1790, 708 52 Ostrava

tel.: 59 737 5305

e-mail: michal.grepl@fno.cz

web: www.fno.cz



Fakultní nemocnice Ostrava

17. listopadu 1790/5 / 708 52 Ostrava-Poruba

Telefon: +420 597 371 111 / Fax: +420 596 917 340

E-mail: posta@fno.cz / www.fno.cz / datová schránka: u2nmpm2

DIČ: CZ00843989 / IČO: 00843989

Číslo účtu: ČNB Ostrava, 66332761/0710

Kód MTZ: 3602032

Rozbor dizertační práce Mgr. Zlaty Huškové „Biomarkery, tekutá biopsie a studium steroidních derivátů u karcinomu prostaty“

LF UP Olomouc

Cíl práce

Cílem dizertační práce Mgr. Zlaty Huškové bylo:

- identifikovat biomarkery pro odlišení pacientů s benigní hyperplazií prostaty od těch s karcinomem,
- izolovat nukleové kyseliny z cirkulujících nádorových buněk a plazmy pacientů s pokročilým karcinomem prostaty, analyzovat expresi vybraných genů a zhodnotit klinický význam provedených analýz,
- u prostatických nádorových buněčných linií studovat vliv steroidních derivátů srdečních glykosidů na buněčnou viabilitu a kultivaci 3D modelových systémů, na expresi proteinů zapojených do buněčného cyklu a apoptózy a na expresi receptorů pro steroidní hormony.

Těchto tří cílů bylo dosaženo, jak je zřejmé z dizertační práce a jak bylo publikováno v manuskriptech:

- The Percentage of Free PSA and Urinary Markers Distinguish Prostate Cancer from Benign Hyperplasia and Contribute to a More Accurate Indication for Prostate Biopsy (Huskova, Knillova, et al. 2020),
- Molecular mechanisms of plant steroids and study of their interaction with nuclear receptors in prostate cancer cells (Huskova, Steigerova, et al. 2020).

Doktorandka se ve své dosavadní vědecké kariéře úspěšně věnovala i dalším tématům:

- Complex Alterations of Fatty Acid Metabolism and Phospholipidome Uncovered in Isolated Colon Cancer Epithelial Cells (Hofmanová et al. 2021),
- Specific alterations of sphingolipid metabolism identified in EpCAM-positive cells isolated from human colon tumors (Procházková et al. 2020),
- HT-29 and Caco2 Cell Lines Are Suitable Models for Studying the Role of Arachidonic Acid-Metabolizing Enzymes in Intestinal Cell Differentiation (Cizkova et al. 2019),
- Arylazopyrazole AAP1742 inhibits CDKs and induces apoptosis in multiple myeloma cells via Mcl-1 downregulation (Jorda et al. 2014).

Svým podílem na publikovaných pracích doktorandka prokázala:

- znalosti genetiky, molekulární biologie, imunologie, molekulární patologie, onkologie;
- schopnost kriticky studovat odbornou literaturu;
- laboratorní dovednosti;

- schopnost rozpoznat vědecky zajímavé otázky, formulovat hypotézy a formulovat také způsob testování hypotéz;
- schopnost dosáhnout vědecky relevantní výsledky, obhajitelné v mezinárodním měřítku;
- schopnost prezentovat výsledky vědecké práce písemnou formou.

Aktuálnost řešeného tématu

- Biomarkery z tekuté biopsie jsou aktuální téma, stejně jako steroidní deriváty a karcinom prostaty.

Použité metody a postupy

- Metody a postupy jsou plně adekvátní.

Výsledky práce (novost)

- Práce přináší nové výsledky nejen pro českou populaci, ale i v celosvětovém kontextu.

Formální zpracování

- Práce je zpracována na požadované formální úrovni. V práci nejsou zjevné logické a pravopisné chyby. Styl je přehledný a čtivý. Obrázky jsou vhodně ilustrativní.

Připomínky

- 1) Po úvodu tradičně následuje definice cíle práce, po kterém následuje experimentální část. Alternativně může být cíl práce zmíněn před úvodem, pokud je teoretický úvod součástí plnění cíle práce. V této dizertační práci jsou cíle letmo zmíněny v úvodu, bez zvýraznění, což snižuje přehlednost.
- 2) Seřazení v odborné práci má vždy být podle nějakého logického klíče. Pokud se za sebou seřazuje výčet komplikací, tak je zvykem stupňovat od nevýznamných po významné. Tedy ne: "hospitalizace, krvácení, sepse a bolesti", ale "bolesti, krvácení, hospitalizace a sepse".
- 3) Odběr krve není neinvazivní. Odběr krve je jen méně neinvazivní než biopsie. Doporučuji jednu hodinu v čekárně dětské kliniky poslouchat zvukové odezvy dětí při odběru krve.
- 4) Zkratky by měly být definovány při prvním použití v textu (BPH pro někoho znamená Bystřice pod Hostýnem).
- 5) Kardioglykosidy nejsou nadmnožinou srdečních glykosidů. Jsou jejich synonymem (Bejcek et al. 2021; Škubník, et al. 2021).
- 6) Ne "na bílkoviny krevní plazmy globulin vázající pohlavní hormony (SHGB)", ale "bílkovinu krevní plazmy SHGB, pohlavní hormony vázající globulin".
- 7) Latinské termíny a názvy genů by měly být psané kurzívou (např. *per rectum*, *KLK3*).
- 8) Otáčky je výhodnější uvádět v hodnotách *g* a ne *rpm*. Pokud se uvádějí v hodnotách *rpm*, musí se zároveň uvést průměr (nebo poloměr) rotoru v centrifuze. Jinak se snižuje možnost úspěšně replikovat experiment v jiné laboratoři.
- 9) Věta "Kromě mutačních teorií je velký důraz kladen i na teorii kmenových buněk, které se nepochybně podílejí na patogenezi (nejen nádorových) chorob (Král et al., 2010)" je málo rozvinutá. Tvzení v odborném textu nemá být výkřikem do tmy. Je lépe držet se takové

úrovně detailů, ve které informace dávají smysl samy o sobě a nebudí otázky, které nebudou zodpovězeny (např.: Jak se kmenové buňky podílejí na patogenezi? Velký důraz je kladen kým? V kmenových buňkách nevznikají mutace, takže v nich mutační teorie neplatí?). Pokud doktorandka nechce (a není to ani nutné vzhledem na cíle její dizertační práce) jít na úroveň detailů, kdy by vysvětlila, v čem je rozdíl mezi mutační teorií a teorií kmenových buněk nebo například teorií zánětu (Liu et al. 2021; Brown 2021), nemá se do této úrovně pouštět.

- 10) "Familiální" znamená nenucený, domácí, důvěrný, až žoviální. "Familiální" znamená rodový, přenášený mezi generacemi v rodině. Pokud hovoříme o karcinomu prostaty, správným termínem je familiální, přestože se v mnohých českých textech píše špatně "r".
- 11) Věty v odstavci "Prostatický specifický antigen (PSA) je glykoprotein o velikosti 33 kDa. ... Gen pro lidský kalikrein 3 (hK3) se nachází na 19. chromozomu, kde se nachází i geny pro kalikrein 1 a 2 (hK1 a hK2)" na sebe významově nenavazují. Změna ve smyslu: "Prostatický specifický antigen (PSA), známý také jako kallikrein 3 (KLK3/hK3), je glykoprotein..." již umožní čtenáři pochopit text.
- 12) Nepište "Například některé geny KLK (NES1, proteáza M, PSA) mají sníženou expresi v prostatě, prsu a některých dalších rakovinách (Boyukozer *et al.*, 2020)", to zavání žargonem a nepochopením. Pište lépe: "Například některé geny *KLK (NES1, proteáza M, PSA)* mají sníženou expresi při rakovině prostaty, prsu a některých dalších rakovinách (Boyukozer *et al.*, 2020)."
- 13) Obr. 29 má nečitelný popis, font je příliš malý.

Dotazy

- 1) Mezi rizikovými faktory pro karcinom prostaty uvádíte medikaci statinů, nesteroidních protizánětlivých preparátů a sexuální aktivitu s odkazem na publikaci (Sampson et al. 2013). Ve zmiňované publikaci se však píše o *in vitro* modelových systémech pro studium signalizace přes androgenový receptor u karcinomu prostaty a o rizikových faktorech jsem zde nenalezl zmínku. Jako rizikový faktor agresivního karcinomu prostaty je v jiných článcích jednoznačně identifikováno kadmium v cigaretovém kouři, nedostatek fyzické aktivity (Emilio et al. 2019; Brookman-May et al. 2019) a hereditární syndromy (Gandaglia et al. 2021). V článku (Lopez et al. 2021) se sice píše o asociaci použití statinů s karcinomem prostaty, ale asociace má být inverzní. Vazektomie zvyšuje riziko karcinomu prostaty o 20% (Xu et al. 2021), nesteroidní protizánětlivé látky mají riziko karcinomu prostaty snižovat (Krysiak et al. 2005), stejně jako má riziko karcinomu prostaty snižovat více než 21 ejakulací za měsíc (Crocetto et al. 2021). **Jaká je současná úroveň poznání rizikových a protektivních faktorů karcinomu prostaty?**
- 2) **Jaké vidíte možnosti použití dielektroforézy u tekuté biopsie pro detekci cirkulujících nádorových buněk nebo jiných biomarkerů (Russo et al. 2021)?**
- 3) **Je zvýšení exprese olfaktorického receptoru OR51E2 (*PSGR*) u časného nádoru prostaty spojeno se změnou vnímání vůní a chutí? Pokud ano, tak nakolik je mechanismus srovnatelný se ztrátou vnímání chuti a vůně u infekce SARS-CoV-2?**
- 4) RNA je fragilní biomarker, atakovaný všudypřítomnými RNázami, proto preanalytická fáze zásadně ovlivňuje výtěžnost jeho analýz. Při izolaci RNA z moči (str.55) provádíte centrifugaci při 4 °C a pak vzorky zahříváte na pokojovou teplotu před přidáním lyzačního

pufu, ve kterém nejspíše bude inhibitor RNáz. **Nebylo by výhodnější napřed inaktivovat RNázy přidáním lyzačního pufu a pak teprve vzorek temperovat na pokojovou teplotu?**

- 5) Použila jste pro měření cytotoxicity MTT test. **Jak vidíte zpětně výhody/nevýhody MTT testu ve srovnání s jinými testy cytotoxicity, například s CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay nebo RealTime-Glo™ MT Cell Viability Assay?**

Závěr

Autorka ve své dizertační práci **prokázala** schopnost samostatní tvůrčí práce v daném oboru. Práce **splňuje** požadavky standardně kladené na dizertační práce v daném oboru. **Práci doporučuji k obhajobě** a v případě úspěšné obhajoby a uspokojivých odpovědí na dotazy **doporučuji udělení akademického titulu Ph.D.** za jménem dle §47 Zákona o vysokých školách č.111/98 Sb.

Prof. Mgr. Jiří Drábek, PhD.

Oponent



Digitálně podepsal

prof. Mgr. Jiří

Drábek, Ph.D.

Datum: 2022.01.19

15:28:21 +01'00'

V Olomouci, 19.1.2022

Reference

- Bejcek, J., M. Jurasek, V. Spiwok, and S. Rimpelova. 2021. 'Quo vadis Cardiac Glycoside Research?', *Toxins*, 13.
- Brookman-May, S. D., R. Campi, J. D. S. Henríquez, T. Klatte, J. F. Langenhuijsen, M. Brausi, E. Linares-Espinós, A. Volpe, M. Marszalek, B. Akdogan, C. Roll, C. G. Stief, O. Rodriguez-Faba, and A. Minervini. 2019. 'Latest Evidence on the Impact of Smoking, Sports, and Sexual Activity as Modifiable Lifestyle Risk Factors for Prostate Cancer Incidence, Recurrence, and Progression: A Systematic Review of the Literature by the European Association of Urology Section of Oncological Urology (ESOU)', *Eur Urol Focus*, 5: 756-87.
- Brown, G. 2021. 'Oncogenes, Proto-Oncogenes, and Lineage Restriction of Cancer Stem Cells', *Int J Mol Sci*, 22.
- Cizkova, K., P. Birke, J. Malohlava, Z. Tauber, Z. Huskova, and J. Ehrmann. 2019. 'HT-29 and Caco2 Cell Lines Are Suitable Models for Studying the Role of Arachidonic Acid-Metabolizing Enzymes in Intestinal Cell Differentiation', *Cells Tissues Organs*, 208: 37-47.
- Crocetto, F., D. Arcaniolo, L. Napolitano, B. Barone, R. La Rocca, M. Capece, V. F. Caputo, C. Imbimbo, M. De Sio, F. P. Calace, and C. Manfredi. 2021. 'Impact of Sexual Activity on the Risk of Male Genital Tumors: A Systematic Review of the Literature', *Int J Environ Res Public Health*, 18.
- Emilio, S., V. Luigi, B. Riccardo, and G. Carlo. 2019. 'Lifestyle in urology: Cancer', *Urologia*, 86: 105-14.

- Gandaglia, G., R. Leni, F. Bray, N. Fleshner, S. J. Freedland, A. Kibel, P. Stattin, H. Van Poppel, and C. La Vecchia. 2021. 'Epidemiology and Prevention of Prostate Cancer', *Eur Urol Oncol*, 4: 877-92.
- Hofmanová, J., J. Slavík, M. Ciganek, P. Ovesná, Z. Tylichová, M. Karasová, O. Zapletal, N. Straková, J. Procházková, J. Bouchal, Z. Kolář, J. Ehrmann, M. Levková, Z. Hušková, P. Skalický, A. Kozubík, M. Machala, and J. Vondráček. 2021. 'Complex Alterations of Fatty Acid Metabolism and Phospholipidome Uncovered in Isolated Colon Cancer Epithelial Cells', *Int J Mol Sci*, 22.
- Huskova, Z., J. Knillova, Z. Kolar, J. Vrbkova, M. Kral, and J. Bouchal. 2020. 'The Percentage of Free PSA and Urinary Markers Distinguish Prostate Cancer from Benign Hyperplasia and Contribute to a More Accurate Indication for Prostate Biopsy', *Biomedicines*, 8.
- Huskova, Z., J. Steigerova, J. Oklestkova, L. Rarova, Z. Kolar, and M. Strnad. 2020. 'Molecular mechanisms of plant steroids and study of their interaction with nuclear receptors in prostate cancer cells', *Food Chem Toxicol*, 137: 111164.
- Jorda, R., J. Navrátilová, Z. Hušková, E. Schütznerová, P. Cankař, M. Strnad, and V. Kryštof. 2014. 'Arylazopyrazole AAP1742 inhibits CDKs and induces apoptosis in multiple myeloma cells via Mcl-1 downregulation', *Chem Biol Drug Des*, 84: 402-8.
- Krysiak, R., B. Okopień, W. Szkróbka, and Z. S. Herman. 2005. '[Prostate cancer chemoprevention]', *Przegl Lek*, 62: 929-33.
- Liu, W., Y. Deng, Z. Li, Y. Chen, X. Zhu, X. Tan, and G. Cao. 2021. 'Cancer Evo-Dev: A Theory of Inflammation-Induced Oncogenesis', *Front Immunol*, 12: 768098.
- Lopez, D. S., D. Huang, K. K. Tsilidis, S. Canfield, M. Khera, J. G. Baillargeon, Y. F. Kuo, M. K. Peek, E. A. Platz, and K. Markides. 2021. 'The role of testosterone replacement therapy and statin use, and their combination, in prostate cancer', *Cancer Causes Control*, 32: 965-76.
- Procházková, J., J. Slavík, J. Bouchal, M. Levková, Z. Hušková, J. Ehrmann, P. Ovesná, Z. Kolář, P. Skalický, N. Straková, O. Zapletal, A. Kozubík, J. Hofmanová, J. Vondráček, and M. Machala. 2020. 'Specific alterations of sphingolipid metabolism identified in EpCAM-positive cells isolated from human colon tumors', *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 1865: 158742.
- Russo, G. I., N. Musso, A. Romano, G. Caruso, S. Petralia, L. Lanzanò, G. Broggi, and M. Camarda. 2021. 'The Role of Dielectrophoresis for Cancer Diagnosis and Prognosis', *Cancers (Basel)*, 14.
- Sampson, N., H. Neuwirt, M. Puhr, H. Klocker, and I. E. Eder. 2013. 'In vitro model systems to study androgen receptor signaling in prostate cancer', *Endocr Relat Cancer*, 20: R49-64.
- Škubník, J., V. Svobodová Pavlíčková, J. Psotová, and S. Rimpelová. 2021. 'Cardiac Glycosides as Autophagy Modulators', *Cells*, 10.
- Xu, Y., L. Li, W. Yang, K. Zhang, K. Ma, H. Xie, J. Zhou, L. Cai, Y. Gong, Z. Zhang, and K. Gong. 2021. 'Association between vasectomy and risk of prostate cancer: a meta-analysis', *Prostate Cancer Prostatic Dis*, 24: 962-75.