

OPONENSKÝ POSUDOK

dizertačnej práce v študijnom programe *Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie* Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy, Mgr. Radky Bokorovej

„The role of cereblon in lenalidomide therapy of del(5q) myelodysplastic syndrome.

Úloha cereblonu při terapii lenalidomidem u del(5q) myelodysplastického syndromu“

Predložená práca pozostáva zo 136 strán textu, doplneného obrázkovou dokumentáciou, ktorú tvorí 42 obrázkov a grafov a 7 tabuliek. Literárne odkazy predstavujú 180 citácií. Práca je členená do 10 kapitol, tak aby bol podaný ucelený a komplexný pohľad na myelodysplastický syndróm (MDS) z pohľadu molekulového biológa a genetiky hematoonkologického ochorenia.

Riešená problematika patrí v súčasnosti k významným medicínskym (nielen hematologickým) problémom. Výstupy z práce môžu priamo ovplyvniť budúce diagnostické a liečebné postupy zavedené v Českej republike. Zlepšením týchto prístupov sa môže doceliť predĺženie dĺžky celkového prežívania a zlepšenie kvality života pacientov s MDS. Zvolená téma práce je preto veľmi aktuálna.

K cieľom predkladanej práce patrilo:

1. Prvým cieľom je porovnať hladiny cereblonovej mRNA u pacientov s MDS s izolovanou del(5q) s inými nízko rizikovými MDS pacientami bez prítomnosti del(5q) a so zdravými kontrolami.
2. Druhým cieľom je potvrdiť, že úspešnosť liečby lenalidomidom u del(5q) MDS je závislá na hladine cereblonovej mRNA a cereblon proteínu v kostnej dreni aj v periférnej krvi mononukleárných buniek, podobne ako u pacientov s mnohopočetným myelómom.
3. Tretím cieľom je zmerať hladiny cereblonovej mRNA a proteínu celej dĺžky počas liečby lenalidomidom a zistiť, či náhle zníženie expresie CRBN je spojené s rezistenciou na liečbu lenalidomidom.

4. Štvrtým cieľom je študovať mechanizmus, ktorým sa erythropoetín, prednizón a oxid arzenitý pridaný k lenalidomidu môže zvrátiť rezistenciu na lenalidomid v kultúrach ľudských bunkových línií získaných od pacientov s MDS (bunky MDS-L a bunky SKM1).

5. Bude sa skúmať účinok kombinácií lenalidomidu s erythropoetínom alebo prednizónom alebo ich kombinácia v prípade objavenia sa rezistencie na lenalidomid u nízkorizikových pacientov s MDS s del(5q).

6. Úloha NRF2 pri expresii génu CRBN v priebehu EPO a kombinácia EPO plus terapia lenalidomidom vo vyšetrovaných vzorkách od pacientov s MDS a experimenty s bunkovými líniami (bunky MDS-L a bunky SKM1).

Výsledky práce v mnohých ohľadoch predstavujú unikátny príspevok k rozšíreniu poznania tejto heterogénnej skupiny ochorení. Dôležitým prínosom je využitie moderných metód molekulovej genetiky v experimentoch a rozširujú vedomosti o expresii vybraných génov. Autorka preukázala, že liečba lenalidomidom vedie u MDS 5q- ku zmenám mRNA expresie génov CRBN a Nrf2 a môžu byť perspektívne použité ako biomarkery pri rozhodovaní o vhodnosti liečebnej stratégie. Zvolená metóda Western blott je obsolentnejšou metódou na monitorovanie hladín proteínov. Hodilo by sa zvoliť citlivejšie metódy, aby sa zachytila korelácia s expresiou mRNA vybraných génov. Dosiahnuté výsledky však majú experimentálnu hodnotu a sú prehľadne prezentované v grafoch. Na vyhodnotenie bola použitá vhodná štatistická metóda.

V rámci skúmania problematiky mechanizmu účinku nových liečebných postupov vo vzťahu k patogenéze ochorenia priniesla množstvo poznatkov, ktoré sa stanú základom ďalšieho výskumu v danej problematike.

Pri sledovaní možných vplyvov na efekt imunomodulačnej liečby bola potvrdená významná úloha cereblonu na citlivosť jednotlivých pacientov s 5q- syndrómom na lenalidomid. Dosiahnuté výsledky majú potenciál na použitie v klinickej praxi.

Za nedostatok práce, ktorý je však dostatočne vyvážený inými kvalitami a prínosmi, považujem výsledkovú časť (neprehľadnosť tabuliek, napr. v tabuľke č. 6 sa uvádzajú počty MDS pacientov v sumárnom počte 83 a v nasledujúcich pokusoch pri detekcii expresie mRNA CRBN z PB autorka uvádza 84 pacientov (del5q), 20 pacientov (del5q a trizómia 8), 12 pacientov (trizómia 8), 58 pacientov (bez del5q), 62 pacientov s normálnym karyotypom a zdravé kontroly 49 pacientov. Chýba základná charakteristika analyzovaného súboru a odkiaľ získala vzorky pacientov a podstatnú informáciu, či pacient mal podpísaný informovaný súhlas schválený príslušnou etickou komisiou.

Obrázky nemajú odkaz v texte (obrázky 9,10,12,13 – 42).

Problémy a ciele práce sú však zrozumiteľné a jasne formulované. Po formálnej stránke je celková typografická úprava textu, grafov a obrázkov na štandardnej úrovni, práca je prehľadne spracovaná a dobre sa v nej dá orientovať.

V práci je zopár preklepov, ktoré neznižujú jej úroveň:

Str.11 riadok 7 „*Objevili jsme, že hlasdina...*“

Str. 25 Fig. 1 „*cell with del(5q,31).*“

V zozname použitej literatúry je uvedených veľké množstvo prác. Veľká väčšina citovaných zdrojov je starších ako 5 rokov. Vo väčšine prípadov ide o práce zahraničných autorov.

K dizertačnej práci mám nasledujúce otázky:

1. Aké zmeny v rámci molekulových metód v diagnostike MDS navrhuje autorka práce zaviesť v klinickej praxi?
2. Bude autorka pokračovať vo výskume v danej oblasti a akým smerom?
3. Stanovili ste si nejakú cut off hodnotu (ΔddCt) pri detekcii hladín expresie mRNA CRBN, kedy je považovaná hodnota za vyššiu a pacient bude odpovedať na liečbu?
4. Prítomnosť TP53 mutácií sú prediktorom zlej prognózy a rezistencie na liečbu MDS pacientov, neplánujete u pacientov neodpovedajúcich na liečbu detegovať mutácie v géne TP53. Ak áno, tak akými metódami?

5. V experimentoch s bunkovými líniami sa píše, že MDS-L línia by mala byť s izolovanou deléciou dlhého ramena 5. chromozómu. Cytogenetický nález MDS-L línie je však s komplexnými genetickými zmenami [49, XY, +1, der(5)t(5,19), -7, +8, -12, der(13)t(7,13), der(14)t(12,14), der(15)t(15,15), +19, +20, +21, der(22)t(11,22)]. Takýchto pacientov zaradíme do vysoko rizikovej skupiny. Može autorka vysvetliť zámer výberu takejto bunkovej línie do jej experimentov?

Aj napriek pripomienkam môžem skonštatovať, že autorka predložila zmysluplnú a pre terajších aj budúcich pacientov s myelodysplastickým syndrómom určite užitočnú dizertačnú prácu na tému: **Úloha cereblonu při terapii lenalidomidem u del(5q) myelodysplastického syndromu** Na jej základe navrhujem udeliť Mgr. Radke Bokorovej akademický titul philosophiae doctor (PhD.).

V Bratislave 10.1.2022 RNDr. Renata Lukačková, PhD.