

**Disertace MUDr. Jana Černého „Clinical implications of minimal residual disease evaluation by polymerase chain reaction in patients with B- cell lymphoproliferative disorders“ – oponentský posudek**

Oponentovi byla předložena anglicky psaná disertace o rozsahu 85 stran s celkem 8 přílohami, a také 31stránkový autoreferát, rovněž v angličtině.

Ústředním námětem, jak vystiženo v názvu disertace, je molekulární vyšetřování minimálního residuálního onemocnění (MRO) u vybraných lymfoproliferativních onemocnění (LPO), především u folikulárního lymfomu (FL), chronické lymfatické leukemie (CLL) a lymfomu s plášťových buněk (MCL).

Po úvodu (kapitole 1, obsahující m.j. stručně uvedené cíle práce), následuje velmi rozsáhlá kapitola 2 s přehledem literatury, mapující molekulární změny v patogenezi různých LPO a prognostický význam vyšetření MRO, resp. dosažení molekulární remise u těchto onemocnění. Velice pěkně jsou také popsány přestavby DNA spojené s diferenciací B buněk. (Snad tam pouze chybí zmínka o fyziologickém významu těchto změn pro imunitní aparát a o extrémní diverzitě protilátek, kódovaných Ig geny). Pěkně napsaný je i přehled různých PCR metodik. Autor v kapitole 2 dokazuje rozsáhlé teoretické znalosti a osvědčuje schopnost pracovat s relevantní odbornou literaturou. Vše je navíc psáno srozumitelným a velmi čtivým způsobem. Disertace uvádí 220 abecedně řazených citací. Rozsah této kapitoly je však poněkud disproportionální k celku: zaujímá celkem 52 stran (zatímco výčet vlastních výsledků pouze stran 6 – nutno však dodat, že ve výsledkové části autor odkazuje na zmíněné přílohy). Je také podán přehled různých molekulárních i jiných metod stanovení MRO. Kapitola 3 uvádí přehled vlastních výsledků, kapitola 4 jsou hlavní závěry práce v rozsahu ½ stránky. Autor neuvádí samostatnou kapitolu s přehledem studovaných pacientů (nástin toho je však uveden v subkapitole 3.1) a užitých materiálů a metod, ani zvláštní kapitolu s diskusí.

Vlastní výsledky (kapitola 3) jsou uvedeny pouze v relativně stručném přehledu, s odkazy na přílohy. Jsou však prezentovány jasně a srozumitelně, korespondují s formulovanými cíli disertace. V Laboratoři molekulární biologie I. interní kliniky (nověji Kliniky hematologie) VFN bylo vyšetřeno celkem 945 vzorků (uzlin, kostní dřeně, anebo periferní krve) od 432 pacientů s později prokázaným nebo neprokázaným LPO, z nichž 350 bylo „nových“ (co tím měl autor na mysli, netuším; v autoreferátu užívá termínu „new referral.“ Není mně jasné, kolik z nich bylo předtím již léčeno). Genomová DNA těchto pacientů byla vyšetřena pomocí PCR na 1) přítomnost přestavby CDRIII oblasti genu těžkého řetězce imunoglobulinu (Ig<sub>H</sub>); 2) t(14;18); 3) t(11;14), běžných u lymfomů. Pouze poměrně malou skupinu pacientů s průkazem alespoň jedné ze zjišťovaných aberací bylo možné sledovat longitudinálně na přítomnost MRO. Týkalo se to 57 nemocných (27 s FL, 18 s CLL a 12 s MCL), kteří byli léčeni imunochemoterapií s rituximabem, někteří na základě rozhodnutí ošetřujícího lékaře pak podstoupili autologní transplantaci krvetvorných kmenových buněk (AH SCT). Z výsledků vyplývá, že dosažení molekulární remise je příznivou charakteristikou pro další prognózu

nemocných z hlediska celkového přežití, přežití bez nemoci a rizika relapsu. Nemocní následně léčení AHCST měli rovněž v tomto smyslu lepší prognózu, než pacienti bez následné AHSCT. Přítomnost PCR detekovatelného MRO v autologním štěpu znamenala zvýšené riziko relapsu. Speciální studie se týkala pacientů s více než 1 prokázanou alelickou přestavbou Ig<sub>H</sub>. Ti dle autora mají stejnou prognózu; jen velmi vzácně jde o biklonální LPO.

Výsledky autora a jeho spolupracovníků byly předmětem řady publikací v zahraničních i českých časopisech. Autor disertace je 1. autorem 1 full-textového sdělení v impactovaném časopise (J Cell Physiol), a 3 dopisů v impactovaném časopise (vše Haematologica; ve 2 případech šlo o on-line publikace). Dále napsal přehledný článek do českého časopisu (Klin. onkol., značně podivně citovaném v anglickém textu) a je spoluautorem dalších 2 článků (1 s IF: Folia Biol. Praha). Navíc jeden další manuskript je připraven k nabídnutí do tisku. Výčet je jistě dostatečný pro splnění předepsané publikační aktivity kandidáta.

Autor definoval 3 cíle práce. První z nich, a sice zvýšit povědomost o možnosti a důležitosti vyšetřování LPO mezi klinickými lékaři, není příliš „vědeckým“ cílem, nicméně oponentovi je sympatický a jistě jeho naplnění má zásadní důležitost pro klinickou praxi a strategii léčby LPO. Další 2 cíle – a sice zjištění prognostického významu negativity MRO a posouzení efektivity některých typů léčby vzhledem k možnosti navození molekulární remise u lymfomů byly rovněž autorem naplněny.

Oponentovy připomínky:

- 1) Soubor sledovaný longitudinálně na výskyt MPO je nehomogenní – týká se pacientů s 3 různými onemocněními (FL, CLL a MCL). Každé z nich má jiné prognostické faktory a ty nejsou vůbec u pacientů uvedeny. Lze namítat, že např. u CLL s dobrou prognózou vůbec není nutné dle současných doporučení podávat terapii cílenou k eradikaci MRO (autor nijak nedokládá, že šlo o rizikové pacienty, u kterých by byl tento cíl legitimní). Nicméně nehomogenita souboru může mít i své pozitivní stránky – např. interpretaci, že dosažení molekulární remise je obecně důležitým momentem, nehledě na typ LPO. Podobné věci však měly být přinejmenším diskutovány, ale oponent relevantní diskusi nenašel.
- 2) Vždy je dobré zachovat formální strukturu vědecké práce: Úvod a přehled již známého, pak teprve formulace cíle práce, dále skutečně použité materiály a metody, výsledky, diskuse, závěr, literatura. Disertace se tomuto schématu místy vymyká. Také bych preferoval jistou proporciální vyváženost objemů těchto kapitol.
- 3) Některá vyobrazení v kapitole 2 byla převzata z cizích publikací, u některých je citace u obrázku, a některých chybí a je uvedena pouze v textu. Aby nešlo o porušení copyrightu, je správné obrázky překreslit s uvedením inspirace. Disertace je veřejnou publikací.
- 4) Některá tvrzení v přehledu (kapitola 2) jsou přinejmenším poněkud diskutabilní. Opakovaně u CLL je uváděn medián přežití 6 let (dle vlastních zkušeností i jen vysokoriziková pacienty mají medián přežití kolem 8 let, nemluvě o nízkorizikových). Některá tvrzení o léčbě (např. CVP jako doporučená kombinovaná chemoterapie) jsou již mírně obsoletní. Autor u těchto tvrzení však neudává žádnou citaci.
- 5) Práce je dosti jednostrunně zaměřená pouze na PCR metodiku stanovení molekulární remise. Postrádám jakékoli další klinicko-patologicko-laboratorní korelace (to souvisí již s bodem 1).


- 6) Autorem používané PCR metodiky (s „konsensus primery“) mají obecně poměrně nízkou citlivost. Nabízí se srovnání např. se stanovením MRO pomocí průtokové cytometrie, která může mít srovnatelnou citlivost, anebo při některém uspořádání (viz Rawstron et al.) i vyšší citlivost. Vyšší citlivost by měly i alela-specifické kvantitativní PCR metodiky, ještě vyšší při užití RNA namísto DNA. Autor je zavrhuje jako příliš pracné a drahé. S tím však nelze zcela souhlasit především u CLL, u které je v současnosti stejně nutno IgV<sub>H</sub> gen sekvenovat, a to za účelem stanovení jeho mutačního stavu (co by důležitého prognostického faktoru). Nechci a nemohu tvrdit, že vyšší citlivost stanovení MRO má automaticky klinickou relevanci – to dosud není (alespoň u CLL) známo. Nicméně bych opět očekával nějakou diskusi na toto téma. Koneckonců i ukazatel s daleko nižší citlivostí, jako např. samotné dosažení / nedosažení pouhé kompletní klinické remise, má také jistě dosti zásadní prognostický význam.
- 7) Formální připomínky: autorova angličtina je obecně výborná, povšechně mi chybí užívání interpunkce (např. ve větách, začínajících příslovecným určením, téměř pravidelně chybí čárky, a věty jsou proto při čtení někdy méně přehledné). Našel jsem několik gramatických pochybení („in another words,“ s. 31; „the majority“ spojeno s plurálem slovesa – opakovaně; s. 60: one time namísto once), a několik (ne však mnoho) překlepů, na str. 6 vypadlé slovo). I v citacích jsou místy chyby ve jménech (cit. 49 uvedeno Damle JN namísto Damle RN; cit. 153: Kaniarjian místo Kantarjian). Některé in-text citace chybí v seznamu literatury (např. ze str. 7 Fakan et al., Fend et al, atd.). Některé použité termíny jsou přinejmenším sporné („leukemiagenesis“ místo obvyklejšího leukemogenesis – s. 7; s. 26: „addition 12q“ namísto trisomy 12). Zápis „B- cell nonhodgkins lymphomas“ (str. 7) se mně nelíbí (standardně „non-Hodgkin[’s] lymphomas“). Navíc u pomlček musí být z obou stran stejný prostor (např. opakovaný zápis „B- cell“ – i v názvu disertace, i v názvu kapitoly 2.1; „Epstein- Barr“ apod.).

Oponentova otázka ke kandidátovi:

V čem spočívá „novost“ Vašich poznatků uváděných v disertaci? (Diskuse na toto téma oponentovi chybí.)

Shrnutí: Byla předložena disertace, zabývající se stěžejním tématem moderní onkologie – významem MRO u LPO. Postulace cílů i způsob jejich řešení byly ve své podstatě zcela adekvátní a práci považuji za velice přínosnou. Myslím, že studie Dr. Černého kvalitativně posunuly práci celé České kooperativní lymfomové skupiny významnou měrou vpřed. Kandidát má několik pěkných publikací v impactovaných časopisech. Osvědčil svou schopnost samostatné vědecké práce. Proto (navzdory uvedeným připomínkám) se domnívám, že uchazeč splnil všechny náležitosti k získání titulu Ph.D. a budu doporučovat jeho udělení.

Praha 15.3.2009

  
MUDr. Jiří Schwarz, CSc.

Ústav hematologie a krevní transfuze  
128 20 Praha 2