



Oponentský posudek na dizertační práci MUDr. Evy Froňkové – studentky doktorského studia UK 2. LF v Praze ve studijním programu Biologie a patologie buňky

s názvem:

„Detekce přestaveb genů pro imunoreceptory u akutní lymfoblastické leukémie a u zdravých krevních buněk“

Dizertace MUDr. Evy Froňkové se soustřeďuje na hodnocení detekce přestaveb genů pro imunoreceptory u akutní lymfoblastické leukémie (ALL) dětí se zhodnocením nálezu téže přestavby u zdravých krevních buněk.

Dílo není zcela klasicky členěno a je rozděleno do dvou částí. V první části se autorka zabývá speciální problematikou klonálních přestaveb Ig/TCR genů u pacientů s ALL, v druhé části se zaměřila na „vysortování“ normálních krevních buněk periferní krve. Teoretická část rozebírá velmi zasvěceně základní aspekty současného stavu poznání studované problematiky. Je zpracována velmi pečlivě a se zjevnou znalostí studovaného problému. Samotný text zaujímá 39 stran. Literatura zahrnuje 118 titulů s dostatečným počtem recentních prací. Příloha obsahuje 5 textů publikovaných prací autorky a kolektivu na dané téma, seznam všech vlastních publikací autorky a seznam použité literatury. Součástí je i přehled kombinací primerů a schémata protokolů používané léčby.

V první části se tedy, jak již bylo řečeno, autorka zaměřila na problematiku přestavby genů pro Ig/TCR receptory v rámci sledování reziduální nemoci u dětské ALL a ve druhé na přestavbu genů pro imunoglobuliny a T-buněčné receptory u zdravých krevních buněk. Cílem v první části bylo vyšetření klonálních přestaveb Ig/TCR genů u pacientů s ALL léčených v ČR podle protokolu ALL-IC BFM 2002 se zaměřením na standardní riziko. Dalším cílem bylo navržení specifických primerů na základě přechodových V-(D)-J oblastí imunoreceptorových genů a zavedení minimálně jednoho klonálně-specifického RQ-PCR systému pro každého z vyšetřovaných pacientů. Třetím cílem zde bylo stanovení MRN v kostní dřeni nebo periferní krvi v různých časových okamžicích léčby pomocí zmíněných systémů a dále stanovení MRN ve stejných časových bodech pomocí RT-RQ-PCR u TEL/AML1 pozitivních pacientů a konečně porovnání stratifikace do různých skupin na základě MRN a porovnání molekulárně biologických metod s průtokovou cytometrií v rámci studie Mini-Mini.

V druhé části bylo cílem rozčlenění NK buněk, B1, B2 lymfocytů, naivních a paměťových B lymfocytů, T lymfocytů, monocytů a granulocytů z periferní krve zdravých

dárců a stanovení podílu s přestavěným TCRD a TCRG pomocí RQ-PCR v daných populacích.

V rámci vlastní analýzy klonální Ig/TCR přestavby v kostní dřeni byl vyšetřen soubor 88 nově diagnostikovaných nemocných s imunofenotypem common/preB ALL (42 TEL/AML 1 pozitivních a 46 TEL/AML 1 negativních). Výsledkem zde bylo nalezení vyššího množství a úrovně přestaveb u TEL/AML 1 pozitivních nemocných a usuzováno, že příčinou může být protrahovaná aktivita rekombinázového systému způsobená samotným fúzním proteinem TEL/AML 1. Kvantitativní detekce TEL/AML 1 bylo také využito k doplnění klinického vyšetření minimální reziduální nemoci (MRN) včetně korelace se zmíněnou přestavbou Ig/TCR. Za tímto účelem bylo porovnáno 117 vzorků od 28 TEL/AML 1 pozitivních ALL a bylo shledáno, že kvantitativní detekce TEL/AML 1 u nově diagnostikovaných pacientů s ALL v iniciační fázi léčby je vhodným doplňkovým cílem pro detekci MRN u daných pacientů. V souvislosti s tímto bylo také zjištěno, že znaky nízkého rizika a rychlá morfologická odpověď na iniciační fázi léčby nekorelují s dynamikou MRN. Rozdílné jsou zde výsledky dle rizikového profilu.

V souvislosti se studováním přestavby genů pro imunoglobuliny a T-buněčné receptory u fyziologických krevních buněk je jistě významné zjištění, že tzv. liniově promiskuitní přestavby nejsou specifickou vlastností leukemických buněk, ale mohou jako přirozené markery proběhlé rekombinázové aktivity identifikovat i jiné typy buněk. Výsledky vyplývající z této analýzy potvrzují proběhlou aktivaci rekombinázového systému ve všech lymfoidních liniích na rozdíl od buněk myeloidní řady.

K práci mám následující dotazy a připomínky:

1. Vzhledem k rozdílu ALL u dětí a dospělých – jaké existují rozdíly mezi přestavbou Ig/TCR leukemických buněk mezi dětmi a dospělými ?
2. Přináší zmíněná liniová promiskuita u leukemických blastů klinické důsledky u nemocných s ALL nebo je běžným zjevem u lymfoidní populace?
3. Významným zjištěním je jistě nalezení většího množství přestaveb a vyššího stupně zralosti u TEL/AML1 pozitivních sledovaných nemocných, což koresponduje s lepšími léčebnými výsledky u tohoto typu onemocnění. Jak jsou tyto údaje hodnoceny v literatuře ?
4. Je zmiňována prognostická hodnota kvantitativního stanovení TEL/AML1; jaká je strategie indikace tohoto vyšetření ?
5. Zajímavý je vztah mezi odpovědí na léčbu spolu s dalšími známkami rizikového profilu pacienta a MRN, kterýžto vztah, jak bylo naznačeno, nemusí být v korelaci. Je tedy dán nejspíše biologickým charakterem onemocnění, který může mít proměnlivý charakter. Může analýza přestaveb napomoci odhadnout biologickou agresivitu onemocnění ?

Dizertační práce MUDr. Evy Froňkové se zaměřuje na významný diagnostický problém s velkým klinickým důsledkem. V úvodu prokazuje autorka dokonalou znalost studovaného předmětu. Použité metody jsou na vysoké úrovni. Cíle jsou přehledně formulovány a autorka je při zpracování studie splnila. Závěry práce jsou jasné a jsou přínosem jak z praktického hlediska, tak i z hlediska další vědecko-výzkumné činnosti. To je koneckonců dokumentováno i vcelku obsáhlou publikační aktivitou autorky.

Je třeba vysoce ocenit exaktní pojetí celé práce, což na druhé straně nepřekvapuje, vezmeme-li v potaz, že autorka je členkou jednoho z našich nejlepších týmů, které se diagnostickým otázkám hematologických malignit věnují.

Závěr:

Předložená dizertace svědčí o autorčině velkém zájmu a o zaujetí pro daný problém a o znalostech, kterými v daném směru disponuje. Předloženým dílem prokazuje schopnost samostatné a tvůrčí vědecké práce. Přínos samotné práce spočívá především ve formulování diagnostických tezí a doporučení.

Dizeratce MUDr. Evy Froňkové splňuje podmínky stanovené v § 47 VŠ zákona 111/98 Sb., a proto **doporučuji** vědecké radě 2. Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze, aby práci přijala k obhajobě za účelem získání titulu **doktor – Ph.D.**

V Brně dne 28. 3. 2006

Prof. MUDr. Miroslav Penka, CSc.
Lékařská fakulta Masarykovy
univerzity