

UNIVERSITAS PALACKIANA OLOMUCENSIS  
FACULTAS MEDICINAE



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI  
LÉKAŘSKÁ FAKULTA  
tř. Svobody 9, 771 26 Olomouc

## Oponentský posudek

dizertační práce MUDr. Lucie Šrámkové

### **"Využití minimální reziduální nemoci v průběhu léčby relapsu a po alogenní transplantaci kostní dřeně u dětských pacientů s akutní lymfoblastickou leukémií"**

Předložená dizertační práce je uvedena na 60 stranách textu, je členěna do 4 oddílů. Obsahuje 5 tabulek a 8 obrázků. Má 8 příloh, z nichž přílohy č. 5-8 tvoří reprints vlastních publikovaných prací autorky úzce souvisejících s problematikou dizertace (tři původní práce v impaktovaných časopisech, jedna v českém písemnictví). Za přílohami následuje seznam publikací a přednášek autorky: 1x kapitola v monografii, 5 publikací v zahraničních časopisech, 6 v tuzemských, 12 abstrakt v impaktovaných časopisech. V závěru je uvedena použitá literatura: 39 publikací našich i zahraničních autorů, všechny práce se zabývají problematikou akutní leukémie u dětí.

V úvodní části jsou stručně shrnuty současné poznatky o akutní lymfoblastické leukémii u dětí. Kapitola pojednává o klinických a genetických prognostických faktorech, prognostickém významu jednotlivých translokací a významu stanovení MRN. Autorka uvádí základní aspekty diagnostiky a léčby dětské ALL včetně léčby relapsu onemocnění a problematiky transplantace hematopoetických buněk (SCT).

Ve druhé části autorka popisuje použité metody: metodiku vyšetření přestaveb těžkých řetězců imunoglobulinů. Autorka specifikuje detekci a výběr Ig/TCR cílů použitých u vyšetřovaných pacientů. Je popsáno určení klonality analýzou heteroduplexů, v závěru jsou navrženy klonálně specifické markery a optimalizace RQ-PCR. Pro detekci MRN bylo u každého pacienta provedeno 18 jednotlivých PCR reakcí u ALL z B řady a 12 reakcí u ALL z T řady. Pokud nebyly nalezeny vhodné cíle pomocí základního panelu, byla provedena detekce nekompletních přestaveb IgH a TCR. V příloze 2 je uveden základní panel primerů používaný pro detekci přestaveb IgH a TCR genů používaných u B-ALL a T-ALL. V komentáři k interpretaci výsledků odkazuje autorka na již publikovanou práci spolupracovníků laboratoře věnovanou metodám eliminace možných nepřesností v interpretaci výsledků.

V části Výsledky autorka analyzuje dva soubory pacientů.

1. Skupinu pacientů s relapsem leukémie léčených dle protokolu ALL REZ BFM 2002. Analyzován je hlavně soubor 27 pacientů s S2 relapsem, ze kterého bylo 13 pacientů stratifikováno dle hladiny MRN pro další léčbu - do ramene chemoterapie nebo transplantace. 5 pacientů s hladinou MRN  $\geq 10^{-3}$  bylo indikováno k SCT, u zbývajících byla použita pouze chemoterapie. 14 zbývajících pacientů bylo indikováno k SCT z jiných důvodů. Celkové přežití bez události u pacientů z S2 skupiny je 70%, přežití bez události celé skupiny pacientů s relapsem je 70%. Velmi dobré přežití bylo zjištěno ve skupině S1 (pacienti s pozdním mimodřeňovým relapsem), naproti tomu přežití bez události pacientů ve skupině S3-4 je neuspokojivé (33%).
2. Další sledovanou skupinu pacientů tvoří 34 dětí s relapsem ALL, u kterých byla hladina MRN prospektivně sledována před a po alogenní SCT. Vzhledem k relativně malým počtům dětských pacientů s ALL, kteří podstupují SCT, byla založena mezinárodní skupina prospektivně monitorující hladinu MRN (Česká Republika, Holandsko, Velká Británie, Německo a Dánsko). Individuální monitorování v této skupině pacientů bylo prováděno před a po SCT v předem stanovených časových bodech po dobu 24 měsíců po transplantaci, výsledky byly využívány pro rychlou indikaci adoptivní imunoterapie v případech hrozícího relapsu. Stratifikace pacientů podle hladiny MRN jasně ukazuje špatnou prognózu pacientů s hladinou MRN vyšší než  $10^{-3}$  -  $10^{-4}$ . 4/6 pacientů s touto hladinou MRN zemřelo na další relaps nemoci, jeden pacient na komplikace. Autorka detailně analyzuje jednotlivé pacienty a diskutuje možnosti ovlivnění nepříznivé prognózy. Všichni pacienti souboru s negativitou MRN naopak žijí ve 2. remisi onemocnění. Výsledky práce s tímto souborem pacientů autorka publikovala – reprint textu je uveden v příloze č 5.

Téma dizertační práce je vysoce aktuální a důležité. Výrazné pokroky v léčbě a prognóze dětské akutní lymfoblastické leukémie vedly ke snaze zajistit intenzivnější léčbu pacientů s vysokým rizikem relapsu. Jedním z cílů současného výzkumu je nalezení vhodných prognostických znaků. Velmi slibné se zdají být právě protokoly stratifikující léčbu pacientů podle MRN, jejíž hladiny jsou jedním z velmi důležitých nezávislých prognostických znaků dětské ALL a jejíž stanovení je dnes již používáno v klinických studiích pro stratifikaci pacientů. Výběr nevhodnější techniky MRN analýzy je dikována dostupnými cíli u jednotlivých typů leukémie. Kinetika clearance MRN je funkcí biologie nemoci, podané léčby a senzitivity použitého testu. Přestavby imunoglobulinových a TCR genů jsou nejčastěji používanými DNA cíli pro molekulární monitorování léčebné odpovědi vzhledem k vysoké prevalenci u lymfoblastické leukémie.

Autorka se aktivně zapojila do výzkumu Laboratoře molekulární genetiky Kliniky dětské hematologie a onkologie LF UK a FN v Motole, která má dlouhodobé zkušenosti a přispěla řešením problematiky MRN u pacientů indikovaných k SCT a u pacientů s relapsem ALL, jehož léčba přináší dodnes s sebou stále mnoho problémů a komplikací. Longitudinální sledování MRN významně přispívá k identifikaci nových vlastností leukemických buněk, jejichž detekce může v budoucnu ovlivnit osud některých pacientů.

## Závěr oponenta

Autorka se dlouhodobě zabývá problematikou relapsu dětských leukémií včetně sledování MRN. Je publikačně aktivní, její publikační i přednášková aktivita dokazuje rozsáhlé teoretické znalosti i praktické zkušenosti. O kvalitě její práce svědčí publikace výsledků v impaktovaných časopisech a také udělení ceny za nejlepší orální prezentaci EBMT kongresu v roce 2003.

Práce je jednoznačně přínosem pro současnou praxi oboru. Téma je zpracováno sice stručně, ale výstižně. Nevýznamné výhrady lze mít k přepisům a drobným chybám v textu. V úvodu chybí přesnější specifikace cílů práce, což trochu ztěžuje orientaci v textu. Počet pacientů v prvním hodnoceném souboru je sice malý, je však dán celkovým počtem relapsů dětské leukémie v České republice ve sledovaném období. V práci bych přivítala více tabulek a vysvětlujících schémat či obrázků.

Autorky se dotazují na následující:

1. Vysoká pozitivita minimální reziduální nemoci je výrazem nepříznivých vlastností nádorových buněk pacienta. U většiny pacientů s vysokou hladinou MRN lze tento nálezn vysvětlit přítomností některých všeobecně známých nepříznivých klinických nebo laboratorních znaků (přítomnost Ph1 chromozomu, hypodiploidie, přestavba MLL genu). Jak autorka zmiňuje v závěru, u některých pacientů vysoká hladina minimální reziduální nemoci neodpovídala původně dobré prognóze pacientů podle klasických prognostických znaků (hyperdiploidní c-ALL, TEL/AML1 pozitivita, dobrá odpověď na léčbu v indukci atd.). V S2 skupině jsou mezi pacienty stratifikovanými k SCT pro hladinu MRD  $\geq 10^{-3}$  tři pacienti s BCP a dva pacienti s TEL/AML1 pozitivní ALL. Pokusila se již autorka o detailnější analýzu znaků leukemických buněk těchto pacientů? Mají například některé neobvyklé cytogenetické charakteristiky?
2. Je přínosné stanovovat hladinu MRD u pacientů s přítomností fúzního genu TEL/AML1 oběma způsoby: sledováním přestaveb imunoreceptorových genů i kvantitativní detekcí množství transkriptu hybridního genu? Pokud ne, který způsob sledování by autorka doporučila?
3. Do jaké míry koreluje výsledky sledování MRD metodou průtokové cytometrie a RQ-PCR u dětí s relapsem ALL a kterou z obou metod vidí autorka jako perspektivnější?

Dizertační práce MUDr. Lucie Šrámkové splňuje všechna kritéria pro úspěšné obhájení práce a udělení akademického titulu Ph.D. dle § 47 Zákona o vysokých školách č.111/98 Sb. Doporučuji udělení titulu.

V Olomouci 2.11.2006

Doc.MUDr.Dagmar Pospíšilová, Ph.D.

Dětská klinika LF UP a FN v Olomouci

Lékařská fakulta Univerzity Palackého  
Klinika dětského lékařství  
775 20 Olomouc