

Oponentský posudek na disertační práci *Prognóza akutní lymfoblastické leukémie u dětí v závislosti na nových klinicko-biologických faktorech* MUDr. Jany Volejníkové

Předložená disertační práce přispívá k dynamicky se rozvíjícímu studiu biologické podstaty akutní lymfoblastové leukémie (ALL) dětského věku. Míra nových poznatků týkajících se patofyziologie tohoto onemocnění v uplynulých 10 letech vedla k zásadním změnám v procesu hodnocení rizika při diagnóze a v hodnocení individuální odpovědi na léčbu. Diplomantka svou prací prokazuje hluboký vhled do molekulárně genetických i imunologických principů studia ALL. Díky svému přesahu do oboru klinické medicíny a vlastní lékařské praxi na Klinice dětské hematologie a onkologie FN v Motole kriticky vyhodnocuje možnosti inkorporace nových poznatků do léčebných protokolů dětské ALL.

První část práce se zabývá studiem minimální reziduální nemoci (MRN). Po úvodním přehledu prognostických faktorů dětské ALL přistupuje k definici MRN a metodice jejího vyšetřování u ALL. Jádrem experimentální části je vyhodnocení parametrů MRN v kohortě 118 dětí léčených podle protokolu ALL IC-BFM 2002. Diplomantka nejprve popisuje metodiku identifikace klonálně specifických přestaveb v genech pro Ig/TCR, navržení specifických primerů, optimalizace konkrétních RQ-PCR systémů a vlastní kvantifikace MRN. Tyto činnosti jsou v současnosti součástí rutinního provozu laboratoře, je však třeba zdůraznit, že konsensuální standardy pro vyšetřování MRN byly konsorciem Euro-MRD publikovány až v roce 2008 a jsou nadále upřesňovány. Laboratoř CLIP, kde předkládaná práce vznikala, je aktivním členem tohoto konsorcia a diplomantka se jeho jednání osobně aktivně účastnila. Vlastní analýzy se týkají stanovení hladin MRN v konkrétních časových bodech léčby, zjištění míry korelace hladin MRN v jednotlivých kompartmentech (kostní dřeň vs. periferní krev), jejich vztahu ke standardním klinicky relevantním rizikovým faktorům a jejich prognostickému významu při léčbě dle výše uvedeného protokolu. Z originálních závěrů bych vyzdvihl zejména identifikaci hladiny MRN v 15. den léčby jako samostatného prognostického ukazatele.

Druhá část práce si všímá charakteristik vzácné a obtížně diagnostikovatelné skupiny akutních hybridních leukémií. Projekt je dominantně řešen v laboratoři průtokové cytometrie, diplomantka se na něm podílela vyšetřováním přestaveb Ig/TCR, monitorace MRN a molekulárně genetickou analýzou transkripčního faktoru *IKZF1*. Je však třeba vyzdvihnout autorskou účast na publikacích, které jsou v případě popisu leukemií s liniovým přesmykem doslova objevné; primát si připisují za hodnocení homogenní kohorty pacientů diagnostikovaných a léčených podle jednoznačně formulovaných pravidel.

Třetí část zkoumá na 395 patientských vzorcích fyziologické a patofyziologické vlastnosti transkripčního faktoru *IKZF1* u dětských ALL. Diplomantka zavedla metodu detekce isoform *IKZF1* metodou Lab-on-a-chip, stanovila rozmezí fyziologické exprese isoform *IKZF1* v rozličných kompartmentech krvetvorné tkáně, stejnou kohortu pacientů vyšetřila na přítomnost delecí v exonech tohoto genu metodou MLPA. Zajímavé je zjištění, že přítomnost genových delecí nekoreluje s aberantní expresí genu *IKZF1* a že správná funkce tohoto transkripčního faktoru se odvíjí od relativní, nikoli absolutní exprese jednotlivých isoform. Původní je také zjištění, že nejen přítomnost delecí, ale i aberantní exprese *IKZF1* je špatným prognostickým ukazatelem. Návrhem vyšetřovat aberace *IKZF1* spolu s hodnocením MRN metodou průtokové cytometrie u pacientů léčených podle protokolů, které nevyužívají kvantifikace MRN metodami PQ-PCR, diplomantka na základě vlastních objektivních dat poukazuje na možnost identifikovat jednotlivce s vyšším rizikem relapsu, kteří by mohli profitovat z intenzifikace léčby.

Práce odkazuje na 181 literárních pramenů, vesměs vysoce aktuálních (nejmladší práce byla publikována v září 2012). Seznam literatury představuje prakticky úplný souhrn relevantní literatury publikované ke studované problematice.

Projekty, na nichž diplomantka v laboratoři CLIP pracovala, jsou výsledkem týmové spolupráce zahrnujícími obory molekulární genetiky, imunologie a pediatrické onkologie. Autorský podíl MUDr. Jany Volejníkové na nich je v diplomové práci zřetelně definován a v prvním a třetím projektu jej lze označit za principiální. Originální výsledky i prestižní publikační výstupy, jimiž diplomantka své postgraduální studium završuje, odrážejí dynamickou a tvůrčí atmosféru laboratoře vedené prof. MUDr. Janem Trkou, Ph.D., stejně jako cílené vedení školitelkou MUDr. Evou Froňkovou, Ph.D.

K tématu disertační práce diplomantka publikovala 3 práce v časopisech s impact faktorem (úhrnný IF = 14,955), ve dvou z nich je prvním autorem; rukopis čtvrté publikace je v přípravě. Další práce byla publikována v českém písemnictví (recenzovaný časopis bez IF). Citační ohlas v databázi SCOPUS čítá k dnešnímu dni 8 citací. K problematice MRN a prognostického významu genetického profilu *IKZF1* se vyjádřila na řadě domácích a zejména prestižních zahraničních fórech, kde byla v diskusi schopna pružně odpovídat na řadu položených dotazů (čehož byl autor oponentského posudku svědkem).

K předložené práci mám několik poznámek:

- 1) Str. 16: pojem minimální reziduální nemoci není precizně definován, chybí odkaz na primární literaturu.
- 2) Současným standardem ortografie názvů genů je používání velkých písmen a kurzívy (např. *MLL*) a zápis fúzních genů přes pomlčku (např. *BCR-ABL*).
- 3) Částečnou slabinou práce je její jazyková úroveň. Nevyskytují se v ní sice gramatické chyby, ale objevují se formulační a skladebné problémy. Zejména spojování vět do komplikovaných souvětí, může ztížit porozumění jejich sémantickému obsahu.

Otázky k obhajobě:

- 1) Z jakého důvodu byly z definice ALL s liniovým přesmykem uvedené na str. 41 vyčleněny případy ALL s translokací genu *MLL*?
- 2) Delece genu *IKZF1* jsou součástí definic tzv. „*BCR-ABL-like*“ fenotypu u Ph negativních ALL. Můžete popsat vztah alterací *IKZF1* k dalším genům definujícím tuto podskupinu (zejména *CRLF2*)?

Práci jako celek hodnotím jako velmi zdařilou. Přináší původní závěry, které přispívají k poznání biologické podstaty dětské ALL a definují klinicky relevantní momenty pro prognostickou stratifikaci ALL na základě sledování MRN pomocí PCR technik. Diplomantka v ní prokazuje ovládnutí široké škály relevantních molekulárně genetických metod i samostatný tvůrčí přístup k řešení problémů; má tedy předpoklady k další samostatné vědecké činnosti. Předloženou disertační práci proto doporučuji oborové radě k obhajobě. Po zodpovězení uvedených otázek a řádném vykonání obhajoby doporučuji, aby MUDr. Janě Volejníkové byl dle platné legislativy udělen titul Ph.D.

V Praze 28. listopadu 2012

MUDr. Mgr. Cyril Šálek, Ph.D.
Ústav hematologie a krevní transfuze
U Nemocnice 1
128 20 Praha 2