

Oponentský posudek

disertační práce RNDr. Ivety Šárové, studentky postgraduálního doktorského studijního programu v biomedicině, studijního oboru Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie na 1.lékařské fakultě, University Karlovy v Praze na téma:

„Molekulárně cytogenetická analýza aberací chromosomu 11 u hematologických malignit“

Doktorská disertační práce RNDr. Ivety Šárové se zabývá cytogenetickou a molekulárně cytogenetickou analýzou nádorové tkáně pacientů s akutní myeloidní leukémií s aberací chromosomu 11. Hlavním cílem bylo přesně, za pomoci molekulárně cytogenetických metod charakterizovat změny chromosomu 11 u dětských i dospělých pacientů v době diagnózy AML, zmapovat zlomová místa a určit možné kandidátní geny lokalizované ve zlomových oblastech, vyhodnotit vztah mezi zlomovým místem a klinickými ukazateli a posoudit význam pro prognózu nemocných. V neposlední řadě zhodnotit význam skrínigového molekulárně cytogenetického vyšetření u AML.

Disertační práce má 108 stran, vlastní textová část práce má 80 stran, seznam literatury má celkem 136 literárních odkazů. V práci je zařazeno celkem 7 obrázkových příloh.

Práce je napsaná česky, stylisticky a obsahově má velmi dobrou úroveň.

Práce začíná **Seznamem zkratk** a **Abstraktem** a pokračuje předepsanými kapitolami jako je Úvod, cíle práce, přehled literatury, materiál a metody, výsledky, diskuse a závěr. Součástí je také seznam publikací, přednášek a posterových sdělení studentky v průběhu postgraduálního studia. Studentka je první autorkou celkem 3 prací s IF a jedné odeslané do časopisu s IF a všechny se týkají tématu práce. U dalších 5 prací, ve kterých je studentka spoluautorkou, se přímo tématu práce týkají další dvě. Studentka práci prezentovala dále formou přednášek a posterů nejen na konferencích v ČR, ale i na mezinárodních. I tyto výsledky svědčí o velmi dobré úrovni vědecké práce.

Kapitola **Přehled literatury** je sepsaná na 17 stranách s použitím recentních literárních údajů. V podkapitole Molekulární podstata nádorových onemocnění opírající se o obecné poznatky o kumulaci genetických a epigenetických změn jejich role v leukemogenezi. Velmi dobře je zpracovaná část týkající se současných poznatků o chromosomu 11 a detailní části týkající se nejčastěji alterovaných genů lokalizovaných na chromosomu 11 u hematologických malignit, včetně nejdůležitějších genů jako je gen *MLL*, *ATM* nebo *CCND1*. Součástí této kapitoly jsou základní informace o léčbě AML a obecný popis chromosomových změn u AML a jejich prognostický význam.

K této kapitole mám následující drobné připomínky:

Str.15 - vysvětlivky pod tabulkou - chybně je uvedeno vysvětlení zkratky CML jako chronická lymfatická leukémie, je to zkratka pro chronickou myeloidní leukemii

Str.19 - citace místo příjmení je chybně uvedeno jméno autora a spoluautorů stejně jako v seznamu literatury, odkaz 86.

V kapitole o genu *CCND1* mi chybí zásadní sdělení a tom, že je to genetický marker lymfomu plášťové zóny (mantle cell lymfomu - MCL). Termín leukémie z plášťových buněk je použit nesprávně, takový typ leukemie neexistuje.

V části o léčbě AML není úplně odborně správně uveden jako léčebný postup transplantace kostní dřeně. Současným hlavním terapeutickým přístupem je transplantace hematopoetických kmenových buněk, transplantace buněk kostní dřeně se provádí vyjimečně.

Na straně 10 a opakovaně na straně 25 a 80 je nesprávně uvedeno, že ATRA je inhibitor kyseliny retinové.

V kapitole **Metody** jsou popisy použitých metod velmi stručné, včetně metody arrayCGH, stejně jako velmi stručně popsaná RT-PCR a sekvenování MLL genu. Kapitola zahrnuje necelé 4 strany.

Kapitola **Výsledky** má 29 stran a je rozdělena na jednotlivé podkapitoly. Součástí výsledků je 10 stran tabulek a obrázků. Výsledky se týkají především dospělých nemocných s AML, u kterých změny chromosomu 11 byly určeny u 55(18%) z celkového počtu 300 nemocných. Nalezené změny na chromosomu 11 jsou popsány jak podle lokalizace, krátká nebo dlouhá ramena, tak podle typu změny. V samostatné kapitole jsou zajímavé parciální tandemové duplikace MLL. Vzhledem k tomu, že se jedná o molekulárně genetickou metodu, není z textu ani metodiky jasné, zda toto vyšetření prováděla studentka sama nebo je použito těchto výsledků na doplnění ostatních cytogenetických výsledků změn chromosomu 11. Součástí výsledků je i statistické hodnocení přežívání ve vztahu k nalezeným chromosomovým změnám.

K této kapitole mám následující připomínky:

Přehled cytogenetických a molekulárně cytogenetických výsledků je uveden v grafu č.1. Text uvádí, že změny byly pozorovány u 211 nemocných, ale z grafu se mi tento údaj nepovedl odečíst.

V kapitole jsou také popsány výsledky nálezů zajímavých pozorování přestaveb obou homologních chromosomů. Jedním z popisů je odkaz na pacienta č. 10 a č.42. Pacient č. 10 má však v tabulce jen jednoduchou reciprokní translokaci t(11;20). U pacienta 42 se jedná o komplexní karyotyp, ale z uvedeného zápisu nevyplývá, která změna/y se týkají homologních chromosomů.

V textu je uvedeno, že změny chromosomu 11p byly pozorovány u 13 nemocných, ale podle údajů v tabulce to bylo jen 12 nemocných.

V této kapitole chybí a to nevím zda záměrně, číslování stránek. Poslední číslovaná strana je str. 38 a pak až str. 50.

Na straně 51 je popis zajímavé inserce u dvou nemocných č.18 a č.26, ale v tabulce tento nález jako inserce není popsán. Pokud byla inserce určena metodou FISH, měl by tento být součástí zápisu podle ISCN.

V kapitole o MLL duplikacích se používá termín tandemová a netandemová duplikace, ale také nesprávně je uvedeno neparciální tandemová duplikace – str. 52 poslední odstavec.

Součástí výsledků je i statistická analýza. Statistická analýza byla provedena na celkem 10 definovaných podskupinách, ale v některých případech provedena na statisticky hraničně hodnotitelném počtu pacientů, a proto jsou v některých případech křivky přežívání poněkud zvláštní. Např. ve skupině porovnávací změny 11p, q a přestavby chr 11 je hodnoceno 8 a 9 nemocných proti 26. Asi nejvíce zvláštní je výsledek – křivka, graf č.5, která ukazuje, že nemocní s přestavbou MLL přežívají stejně jako nemocní s normálním karyotypem, což úplně neodpovídá literárním údajům. Definici normální karyotyp by asi bylo vhodnější specifikovat jako normální karyotyp s MLL PTD negativní nálezem, jak je uvedeno v tabulce 11. Na výsledku křivek přežívání se může samozřejmě podílet i léčba – transplantace hematopoetických buněk. V takovém případě by bylo zajímavé zjistit, zda právě HSCT nesmazává negativní prognosu přestavby chromosomu 11.

Kapitola: Změny chromosomu 11 u dětí s AML - kapitola není číslována a nelze ji podle obsahu najít. Kapitola je dobře zpracována a dokumentována.

Kapitola **Diskuse** je velmi dobře a logicky sepsaná. V diskusi jsou bohatě využity a porovnány literární data a vlastní výsledky. Diskuse je vedena jak k celkovému nálezu změn chromosom 11 u AML, tak k jednotlivým nalezeným změnám, včetně komplexních translokací.

Kapitola **Závěr** jasně shrnuje výsledky cytogenetické a molekulárně genetické analýzy velkého souboru nemocných a potvrzuje tak splnění stanovených cílů disertační práce.

Na autorku mám následující otázky:

1. Jaký je současný pohled na roli leukemické kmenové buňky a její roli při vzniku leukemie?
2. Můžete uvést příklady významu metod molekulární cytogenetiky pro monitorování odpovědi na léčbu a sledování MRN?
3. Zmínili jste se o miRNA jako epigenetických změnách u AML. Znáte nějaké jiné epigenetické změny a můžete uvést příklady některých epigenetických studií u AML?
4. Můžete ukázat a popsat princip působení ATRA (all trans retinové kyseliny) v léčbě APL?


ZÁVĚR HODNOCENÍ

CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE BYLY SPLNĚNY.

Předložená práce je obsahově a odborně na dobré úrovni a je odrazem jak teoretické znalosti problematiky, tak praktického přístupu ke studiu chromosomových změn u vybrané skupiny hematologického maligního onemocnění. Publikace, soubor přednášek a posterových sdělení potvrzují nejen zájem studentky o tuto problematiku, ale i schopnost systematické vědecké práce. Předložená disertace přináší soubor velmi hodnotných vědeckých výsledků.

Na základě těchto skutečností doporučuji předloženou práci k obhajobě a na základě úspěšné obhajoby doporučuji udělení akademického titulu Ph.D. podle §47 Zákona o vysokých školách č.111/98 Sb.

V Olomouci 10.1.2013



Prof. RNDr. et Mgr. Marie Jarošová, CSc
HOK FN a LF UP Olomouc
I.P.Pavlova 6, 77520 Olomouc