

## Oponentský posudek

disertační práce Mgr. Terezy Jančuškové, studentky doktorského studijního programu v biomedicině, 3. lékařské fakulty University Karlovy v Praze, obor Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie.

Název práce: „**Využití nových molekulárních technologií v identifikaci unikátních klonálních markerů pro monitorování minimální residuální nemoci u akutních leukémií**“

Cílem doktorské disertační práce Mgr. Terezy Jančuškové bylo využití molekulárně-genetických technik, založených na PCR, pro určení vhodného molekulárního markeru pro sledování minimální residuální nemoci (MRN) u nemocných s akutní leukémií (AL). Cíl práce byl rozdělen na dílčí úkoly zahrnující určení změny v karyotypu nemocných s AL, pomocí mikrodisekce izolovat derivované chromosomy a mapovat zlomová místa pomocí sekvenování a long-range PCR pro určení zlomu a navrhnout marker pro sledování MRN.

Disertační práce má 91 stran bez příloh, přičemž přílohy I-IV představují prezentaci výsledků a publikované práce. Celkem 3 z uvedených prací byly publikovány v časopisech s IF. Dále součástí příloh je přehled prezentací na zahraničních a domácích konferencích a výčet publikací bez přímého vztahu k tématu disertační práce.

Práce je členěna na Abstrakt, po něm následují obsah, seznam obrázků, seznam tabulek, seznam zkratk a práce pokračuje úvodem.

Kapitola Úvod má 18 stran, kapitoly Materiál a metody 10 stran, Výsledky 29 stran, Diskuse se závěrem 8 stran. V textu je celkem 141 literárních odkazů. Práce je napsaná česky, stylisticky a obsahově má velmi dobrou úroveň.

Práce začíná **Úvodem**, který je rozčleněn na podkapitoly zabývající se současnými literárními poznatky a charakteristikou akutních leukemií, které jsou rozdělené podle FAB i WHO klasifikace. V každé skupině akutních leukemií jsou současné literární poznatky jak o cytogenetických, tak molekulárně genetických změnách, které jsou součástí prognostické stratifikace akutních leukemií. Tento teoretický úvod je napsaný se znalostí problematiky a s využitím současných literárních poznatků.

V úvodu mi chybí kapitola o hematopoéze jak normální, tak nádorové. Její zařazení by pro čtenáře bylo jasným úvodem do problematiky hematopoesy a jejich chorob.

Dále mi pro jasnější přehlednost chybí schémata popisovaných chromosomových a genových přestaveb.

Kapitola **Materiál a metody** je sepsaná na 9 stranách. Je napsaná přehledně, se znalostí jednotlivých postupů a stručně. Vzhledem k zavádění nových postupů a optimalizaci některých přístupů bych očekávala detailnější popisy některých kroků a podrobnější popis některých postupů, např. mikrodisekce, včetně obrazové dokumentace.

Kapitola **Výsledky** má celkem 21 stran. Kapitola popisuje výsledky celkem 7 vyšetřených případů a jedné přestavby karyotypu u linie K562.

V podkapitole zabývající se analýzou chromosomové změny u buněčné linie K562, je v charakterizaci mFISH nálezů popsán mBAND chromosomu 3, který však není zobrazen. Pro správnost určení by tento důkaz neměl chybět.

Druhá část výsledků je zaměřena na analýzy konkrétních celkem 7 pacientů s akutní leukemií z nich se podařilo splnit stanovaný cíl a určit marker pro možné sledování MRN pouze u 5 z nich.

Na str 48 je tabulka popisující cytogenetické nálezy. Nález pacienta č.2 je pro popis karyotypu ne zcela běžný zápis a to popis každého derivovaného chromosomu. Podle mého názoru se jedná o komplexní změnu představující inserci a translokaci, které se účastní tři chromosomy. U pacienta č.7 s komplexním karyotypem a hypodiploidním počtem chybí potvrzení chybějících chromosomů metodou FISH s centromerickými sondami. Není totiž zcela jasné, zda derivovaný chromosom 2 není dicentrický či tricentrický.

V analýze jednotlivých případů mi chybí klinický dopad, sledování a využití právě výsledků takové analýzy. Neméně zajímavé by u popisů případů byly i některá hematologická data, jako je počet blastů a imunofenotypová klasifikace. Popis jednotlivých případů je velmi stručný.

**Diskuse** zabírá celkem 9 stran. Je sepsaná logicky a jsou v ní využity recentní literární data a porovnány s vlastními výsledky. Této části také chybí již zmíněný klinický dopad zjištěných aberací a porovnání se současnými studiemi. Například kapitola týkající se genu KMT2A (MLL), promiskuitního genu u AL je možné ze současných poznatků podrobit analýze z hlediska prognózy a tedy i cíle zavádění těchto postupů.

Kapitola **Závěr** konstatuje, že disertační práce popisuje zcela unikátní způsob identifikace molekulárních markerů pro sledování MRN. Již sama práce ukázala, že postup je unikátní, ale není universální a v některých případech neúspěšný v hledání markeru.

Nicméně práce, která je předložena je pro svou komplexnost přístupu velmi dobře zpracována a neznámá to, že by postupy zde popsány nemohl být alternativním přístupem v hledání markerů MRN.

Zpracované téma je stále aktuální a potvrzuje, že význam cytogenetických a molekulárně biologických metod a jejich kombinace v rutinní klinické praxi má své místo.

Práce splnila stanovené cíle.

Na autorku mám následující otázky:

1. Podle jaké ISCN nomenklatury byly popsány karyotypy? Je uveden v práci odkaz?
2. Jak je v praxi realizována mikrodisekce na Vašem pracovišti? Pokračujete v tomto přístupu v laboratoři rutinně?
3. Proč jste si vybrali pro zavedení metod velmi nestabilní linii K562?
4. Které z uvedených technik, které jsou součástí unikátního postupu, jste prováděla sama?
5. Můžete popsat skupinu leukemií, který se označuje Ph-like ALL.
6. Můžete nám přiblížit současné znalosti o genu KMT2A a jeho roli v hematopoeze?

## **ZÁVĚR HODNOCENÍ**

### **CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE BYLY SPLNĚNY.**

Předložená práce je obsahově a odborně na dobré úrovni, splnila stanovené cíle a je odrazem teoretických znalostí problematiky i praktického přístupu ke studiu chromosomových a genových změn u vybrané skupiny hematologického maligního onemocnění.

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 10.3.2015

Prof. RNDr. et Mgr. Marie Jarošová, CSc  
HOK LF UP a FN Olomouc  
Hněvotínská 3, 77515 Olomouc