

Oponentský posudek diplomové práce Soni Hubáčkové „Srovnání detekce MRN definované průtokovou cytometrií a kvantitativní PCR u dětských pacientů s akutní lymfoblastickou leukémií“

Tato diplomová práce byla vypracována na klinice dětské hematologie a onkologie 2. lékařské fakulty UK pod vedením prof. Jana Trky. Její náplní je srovnání možnosti detekce MRN pomocí RQ-PCR a průtokové cytometrie ve vybraných patientských vzorcích.

V celé práci se vyskytuje řada výrazů laboratorního slangu (dobří odpovídači...) a anglikanismů (Philadelphský, down/up-regulován, gate, screening) což snižuje přehlednost a srozumitelnost celého textu. Také seznam zkratk by si zasloužil více pozornosti při vypracovávání, některé zkratky v něm nejsou uvedeny (KD, RTG, MLL). Ke srozumitelnosti celé práce by také prospělo začlenění odkazů na obrázky, tabulky a grafy přímo do textu.

Literární úvod na 16-ti stranách je přehledný a prokazuje autorčinu dobrou orientaci v dané problematice. Překlepů a gramatických chyb se zde i v celé práci vyskytuje zanedbatelné množství. Vyjadřování je občas kostrbaté, lehce nesrozumitelné. Co znamená „konsekutivní kohorta pacientů“ případně „dobří odpovídači“? K literárnímu úvodu mám následující dotazy: **1)** Co je vyneseno na ose x u obrázku 2 (str. 21)? **2)** Jakým způsobem se stanovuje DNA index pacientů? **3)** Proč lze pouze u 35 % pacientů využít pro detekci MRN fúzních genů (str. 26)?

Ke kapitole Metody mám největší výhrady. Podle mě zde není nutné uvádět princip PCR či RQ-PCR (obojí se hodí spíš do literárního úvodu) ke všemu ještě s nepříliš vhodnými citacemi. Stejně tak sem asi nepatří kapitola o vyhodnocování výsledků RQ-PCR. Nejsou zde uvedeny podmínky PCR ani RQ-PCR reakcí, tj. výsledné koncentrace vstupních složek včetně koncentrace DNA, časový a teplotní průběh PCR reakcí, počet cyklů PCR reakce ani sekvence diplomantkou navržených primerů. Není uveden přístroj použitý na průtokovou cytometrii, nejsou specifikovány použité protilátky konjugované s fluorescenčními značkami, ani program využitý při hodnocení získaných výsledků. Není zde popsáno sekvenování patientských vzorků, použité primery ani soupravy. Také nejsou uvedeni případní dodavatelé (či relevantní citace) „screeningových“ panelů pro BCP-ALL, T-ALL, IGH či TCR β (str. 32). K této části mám následující otázky: **1)** Jak byla izolována DNA z krevních vzorků pacientů? **2)** Jaký je rozdíl v proteináze (asi K) při izolaci „Mini kitem“ a „Mikro kitem“ (str. 42)? Závěrem této části lze konstatovat, že se popsané experimenty nedají opakovat případnými následovníky diplomantky a pravidla pro sepisování diplomové práce na KGM nebyla v tomto bodě dodržena. Na druhou stranu je nutné ocenit soupis všech hodnocených MRN subpopulací a přehled všech používaných antigenů využívaných k detekci MRN, dosahující úctyhodného rozsahu a svědčící o množství vykonané experimentální práce.

V experimentální části práce Soňa Hubáčková testovala možnost využití průtokové cytometrie v součinnosti s RQ-PCR pro analýzu MRN v klinické praxi. Optimalizace cytometrie je věc velmi náročná a vyžaduje většinou velmi mnoho úsilí. V první části práce autorka určovala minimální počet „sortovaných“ buněk potřebné k následné analýze pomocí RQ-PCR. Zjistila, že už v případě 100 buněk je detekce vcelku přesná, což je s přihlédnutím k tomu že většinou je z každého pacienta touto cestou získána subpopulace tisíců buněk, naprosto dostačující. Následně bylo u 7 nově zachycených pacientů s detekovanými Ig/TCR přestavbami testována možnost „sortování“ a následné detekce MRN pomocí RQ-PCR v časové škále 8 dní až 12 týdnů po zahájení léčby. Dále autorka analyzovala soubor 8 pacientů po relapsu onemocnění či po transplantaci kostní dřeně. V obou skupinách pacientů bylo prokázáno, že lze oddělit pomocí průtokové cytometrie na základě kombinace CD19 a CD45 maligní buňky od nemaligních. Původní hypotéza, že v obohacených „sortovaných“ subpopulacích bude, ve srovnání s „nesortovanou“ kostní dření, detekována vyšší hodnota

MRN se v případě nových pacientů s detekovanými Ig/TCR přestavbami ne úplně nepotvrdila; naopak v případě pacientů po relapsu tato hypotéza platí. Poslední částí práce bylo hodnocení 4 pacientů s hypodiploidním počtem chromozomů, což však nebylo příliš úspěšné, i díky vzácnosti (a tím nedostupnosti klinických vzorků) tohoto typu onemocnění. K této části mám následující dotazy či připomínky: **1)** U obrázku 14 (str. 49) nejsou popisky. **2)** Jaké množství kostní dřeně či periferní krve je třeba pro úspěšnou analýzu pomocí RQ-PCR resp. průtokové cytometrie? **3)** Hodnoty uvedené u obrázku 15 (str. 49) jsou po „sortování“? **4)** U obrázku 16 (str. 50) není popis osy y **5)** Jakého pacienta se týká obrázek 18 (str. 53)?

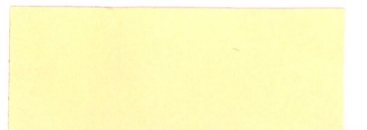
Diskuse je napsána vcelku srozumitelně, výsledky diskutovány se znalostí tématu a realisticky. Možná by neškodil větší rozsah této kapitoly. Dotazy k této kapitole: **1)** Myslíte, že půjde využít 8 barevnou průtokovou cytometrii v klinické praxi? Do jaké míry je tato metoda ovlivněna překryvem emisních spekter jednotlivých fluorescenčních značek? **2)** Uvádíte, že při malých počtech „sortovaných“ buněk dochází k ovlivnění následných RQ-PCR reakcí z důvodu přichycení těchto buněk na stěnu mikrozkmavek. Nepomohlo by třeba „sortování“ do pufru (PBS) aby nedocházelo k přichycení na stěny? **3)** Plánujete další využití průtokové cytometrie/RQ-PCR pro analýzu MRN?

Na závěr práce jsou uvedeny přehledné tabulky detailně charakterizující monoklonální přestavby Ig/TCR jednotlivých pacientů a velmi podrobně charakterizující výsledky „sortování“ a RQ-PCR včetně naměřených hodnot.

Seznam literatury obsahuje 92 relevantních citací.

Navzdory všem uvedeným připomínkám práci Soni Hubáčkové doporučuji k obhajobě.

V Praze 30.5.2007


Václav Vopálenký