

Oponentský posudek na disertační práci RNDr. Pavla Procházky:

Sledování chemorezistence dtských nádor molekulárn cytogenetickými metodami

Pestože v posledních letech došlo k obrovskému rozvoji nových molekulárn biologických diagnostických metod, cytogenetická a molekulárn cytogenetické analýzy z stávají stále významnou sou ástí vyšet ení nemocných s nádorovým onemocn ním. Je obecn známo, že zejména u hematologických malignit a n kterých typ solidních nádor existují specifické chromozomové aberace, které mají nezastupitelnou roli pro up esn ní diagnózy, prognózy a monitorování úsp šnosti terapie. V sou asnosti je Mitelmanov databázi chromozomových aberací u nádor popsáno více než 58 000 p ípad nestability genomu nádorových bun k.

Dtská nádorová onemocn ní v tomto sm ru p edstavují specifickou skupinu malignit, která se asto vyzna uje výraznou genetickou rozmanitostí a variabilním pr b hem onemocn ní. V pr b hu uplynulých let byla i u t chto typ nádorových onemocn ní popsána ada specifických cytogenetických a molekulárn biologických marker , pomocí kterých lze predikovat chování onemocn ní a up esnit volbu individuální terapie.

Diserta ní práce RNDr. Pavla Procházky p edstavuje ucelenou studii, jejímž spojovacím prvkem je výzkum chemorezistence dtských nádorových onemocn ní, detekce cytogenetických zm n, které s ní souvisí a expresních zm n na úrovni mRNA i protein . V širším kontextu napl uje tato práce jednu ze sou asných priorit biomedicínského výzkumu - využít genetické abnormality jako prediktivní a prognostické ukazatele odpov di na nádorovou lé bu s cílem umožnit up esn ní i individualizaci lé ebného postupu u jednotlivých pacient – v tomto p ípad nalézt znaky a p edpov d t efekt lé by s ohledem na možný vznik rezistence.

Celá práce (146 s.) sestává ze stru ného literárního úvodu shrnujícím sou asné poznatky o vybraných nádorových onemocn ních dtského v ku, komentovaného souboru výsledk šesti p iložených publikací a diskuzi k vlastním výsledk m.

Zp edložené práce je patrné, že autor v pr b hu doktorského studia získal mj. adu zkušeností z oblasti cytogenetiky solidních nádor . V provedených studiích bylo použito široké spektrum cytogenetických metod – od techniky interfázni fluorescen ní *in situ* hybridizace (FISH), mnohobarevné FISH) až po technologie CGH a aCGH.

Hlavní část disertační práce tvoří šest předložených publikací, prvoautorské jsou z toho tři (jedna je v recenzním řízení). Zatímco první práce je přehledová, zaměřená na význam sekundárních chromozomových aberací u Ewingova sarkomu, v dalších práci již autoři prezentují vlastní výsledky v podobě zajímavých cytogenetických nálezů u lidských feochromocytomů. Z ostatních práce dizertace lze považovat následující publikace zaměřené na výzkumy molekulárních mechanismů chemorezistence k ellipticinu v buňkách lidského neuroblastomu, zejména na genetické změny vyvolané kultivací s ellipticinem, a na sledování změny počtu kopií a exprese N-myc onkogenu coby klíčového prognostického markeru u neuroblastomových linií vystavených cytostatiky. Předložené práce byly oponenty v recenzním řízení a nemá smysl je podrobně rozebírat.

Lze konstatovat, že získané výsledky, které jsou shromážděny v této disertační práci, přinesly řadu nových informací týkajících molekulárních mechanismů vzniku chemorezistence a významu specifických cytogenetických změn, které s ní souvisejí. Z klinického hlediska považují za zajímavé, že autor jednoznačně prokázal efekt vypuzování amplifikovaných kopií genu N-myc z HSR u studovaných u senzitivních neuroblastomových linií při kultivaci s cytostatikou a zvýšení exprese MYCN po dlouhodobé kultivaci s cytostatikem což může přinést nový pohled na mechanismy vzniku chemorezistence u lidských nádorových onemocnění.

Z pohledu splnění stanoveného cíle disertační práce i nárok kladených na studenty doktorského studia považují za zcela zásadní již zmiňovaný fakt, že předložené výsledky disertační práce tvoří součást kvalitních publikací uveřejněných v mezinárodních i tuzemských recenzovaných časopisech.

Souhrnně lze tedy říci, že disertační práce RNDr. Pavla Procházky přinesla nové a důležité poznatky z oblasti výzkumu chemorezistence lidských nádorových onemocnění molekulárními a cytogenetickými metodami. Zvládnuté experimentální postupy, dosažené výsledky i jejich prezentace v mezinárodních odborných časopisech prokazují, že doktorand splňuje kritéria nutná pro získání titulu PhD. a z těchto důvodů předloženou práci doporučuji k obhajobě a na jejím základě navrhuji dle Zákona vysokých školách č. 111/98 udělit titul PhD.

V Brně 17.10.2012

doc. RNDr. Petr Kuglík, CSc.

Oddělení genetiky a molekulární biologie
ÚEB, Přírodovědecká fakulta MU

K diserta ní práci RNDr. Pavla Procházky bych m l n kolik dopl ujících komentá a dotaz :

- K formální stránce práce – p estože autor pojal svoji diserta ní práci jako komentovaný soubor p iložených publikací, literární úvod je z pracován dle mého soudu dosti povrchn . Nap íklad u neroblastomu, jehož cytogenetické analýzy tvo í podstatnou ást autorových studií, byla krom N-myc amplifikace identifikována celá ada dalších chromozomových abnormalit, které napomáhají ke stratifikaci pacient do jednotlivých prognostických podskupin. Navíc se stale více využívají p i stratifikaci tohoto onemocn ní výsledky celogenomových analýz (aCGH). Mohly by autor komentovat sou asný stav a strategii cytogenetických vyšet ení u neroblastomu?
- Nep esnosti lze najít i v dalších kapitolách – nap . na stran 27 u Obr. 2 hovo í autor v souvislosti s DNA sondami pro techniku FISH o “barvi kách” . Rhodamin je skute n barvi ka?
- Zajímav p sobí další v ta v témže odstavci, ve které autor íká, že ...”Pro zdravou bu ku v G0 a G1 fázi bun ného cyklu, ve kterých je nejv tší podíl bun né populace, vyjma pohlavních chromozom , získáme dva signály”. Mohl by to autor up esnit?
- Stejná p ipomínka platí i u kapitoly Výsledky – autor mohl u každé publikace podrobn popsát dosažené výsledky alespo tak, jak jsou uvedeny v abstraktech publikovaných prací. V kapitole Výsledky autor spíše popisuje, o em vlastní práce jsou a konkrétní experimentální výsledky oponent musí hledat v p iložených (a n kdy dosti nekvalitn zkopírovaných–nap . práce III) publikacích.
- Za zásadní dotaz k získaným výsledk m považuji fakt, že jsem nikde v p edložené práci nenašel konkrétní podíl doktoranda na provedených experimentech. P edložené práce jsou kolektivní a není mn tedy jasné, jaké molekulárn cytogenetické techniky doktorand osobn provád l. Tak nap íklad u molekulárn cytogenetické charakterizaci feochromocytom pomocí CGH jsou uvedeni cytogenetici z Olomouce. U další práce s ellipticinem, kde byla použita technika I-FISH, mFISH a CGH je spoluautorkou doc. Zemanová z Prahy. Mohly by autor i každé práce konkretizovat jeho vlastní podíl?