

Vážený pan  
Prof. MUDr. RNDr. Miroslav Červinka, CSc.  
Lékařská fakulta UK, Hradec Králové  
Děkan fakulty

**Věc: Posudek disertační práce Mgr. Filipa Vrbackého „Studium nových prognostických faktorů u pacientů s chronickou lymfocytární leukémií“**

Předložená práce Mgr. Filipa Vrbackého byla vypracována Ústavu lékařské biologie a genetiky LF UK v Hradci Králové pod vedením školitele prof. MUDr. RNDr. Miroslava Červinky ve spolupráci se IV. Interní hematoonkologickou klinikou FN Hradec Králové, kde doktorand úzce spolupracoval s konzultantem doc. MUDr. Pavlem Žákem a doc. MUDr. Lukášem Smolejem. Dizertační práce se věnuje studiu exprese 4 vybraných genů v buňkách chronické lymfocytární leukemie (CLL), nejčastější leukémie dospělých v naší populaci. Přestože se prognostickým faktorům u CLL v posledních cca 20 letech věnuje nespočet prací, jde o téma stále aktuální a řada otázek z této problematiky zůstává stále otevřených. Práce analyzuje skupinu genů ovlivňujících angiogenezi a analyzuje jejich význam v patogenezi CLL. Práce o celkovém rozsahu 142 stran má standardní formální členění, obsahuje úvod do problematiky, popis cílů, metod a souboru nemocných, výsledky a diskuzi v adekvátním rozložení. Z přiloženého seznamu publikací je zřejmé, že výsledky shrnuté v předkládané práci byly publikovány ve 4 původních článcích v časopisech s IF, přičemž doktorand je u dvou z nich prvním autorem (u článku v časopise Hematology, IF 1,3, a v časopise Neoplasma, IF 1,6). Kromě toho se doktorand podílel na publikování dalších článků a kapitol v monografiích.

Z disertační práce Mgr. Filipa Vrbackého vyplývají následující zajímavé skutečnosti:

- 1) Buňky CLL mají zvýšenou expresi genu pro angiopoetin-2 ve skupině s nemutovaným genem pro IGHV.
- 2) Zvýšená exprese genu pro endoglin koreluje s horší prognózou a kratším celkovým přežitím.

3) Míra exprese genu pro fibroblastový růstový faktor 2 (FGF2) a jeho regulátoru NUDT6 nekoreluje s prognózou onemocnění.

Po stránce formální hodnotím práci, jako přehlednou, logicky uspořádanou a srozumitelně napsanou. Mám drobné výhrady ke zbytečně podrobné metodické části – vzhledem k tomu, že většina popsaných postupů byla prováděna podle návodu výrobce, nebylo nutno do podrobností popisovat všechny provedené úkony včetně „nasávání pipetou“. Oproti tomu se popis použité statistické analýzy jeví jako nepřiměřeně krátký (6 řádků).

Dále mám k práci následující připomínky:

1. Některé zkratky nejsou vysvětleny (např. IPTG, LB, atd.).
2. V kapitole věnované separaci CD19+ mě zaujal krok, kdy jsou po separaci přes ficoll buňky znovu smíchány s dalším čistým ficollem (bod 9) a stočeny. K čemu tento krok sloužil?
3. Používání laboratorního slangu v textu (např. „vyklávat“) považuji v dizertační práci za nevhodné.
4. Jakým způsobem byla analyzována kvalita RNA, která je pro qRT-PCR klíčová? Chybí údaj o vstupním množství analyzované RNA.
5. Pro stanovení mutačního statusu genu pro IGHV je v metodách nevhodně citován článek odkazující na detekci zbytkové choroby pomocí jiné metody, než jaká je v kapitole popisována.
6. Křivky času do progrese (a pravděpodobně i celkového přežití) jsou počítány od odběru vzorku a ne od data diagnózy. Vysoká exprese Ang-2 i endoglinu tedy spíše koreluje s aktivitou onemocnění.

Na Mgr. Filipa Vrbackého mám v souvislosti s jeho disertační prací následující otázky:

1. Proč byly testovány pouze angiopoetin-2, endoglin, fibroblastový růstový faktor 2 a NUDT6 a ne další geny angiogeneze, kterým jsou věnovány jednotlivé kapitoly v úvodu?
2. Jakou mají testované geny míru exprese ve zdravých B-lymfocytech ve srovnání s CLL lymfocyty?
3. Expresi endoglinu (CD105) lze sledovat průtokovou cytometrií. Pokoušeli jste se o analýzu exprese endoglinu i na proteinové úrovni? Mělo by podle vás flowcytometrické vyšetřování exprese tohoto znaku na CLL buňkách nějaký význam?
4. Co přesně znamená, že „hraniční hodnota nízké a vysoké exprese byla stanovena empiricky“?
5. Kolik pacientů bylo vyšetřeno v době diagnózy? Byla u pacientů prováděna i opakovaná měření v čase?
6. Pokud jste FGF2 zvolili na základě rozdílných hladin v plazmě, provedli jste korelaci?

Na otázky rozhodující k posouzení disertační práce odpovídám:

1. Zvolené téma hodnotím jako aktuální - vzhledem k incidenci CLL, její závažnosti a mnoha nejasnostem, které v oblasti CLL patogeneze stále přetrvávají.
2. Metody zpracování výsledků odpovídají cílům práce. Kvalitu předkládaných dat by v budoucnu nepochybně mohly podpořit další analýzy, např. korelace exprese endoglinu na úrovni RNA s expresí na úrovni proteinu, kterou lze detekovat pomocí průtokové cytometrie. Lze také zvážit volbu metod pro statistické zpracování a interpretaci výsledků.
3. Výsledky práce byly publikovány v zahraničních časopisech s IF, což dokládá kvalitu získaných výsledků.

Závěr:

Práci **doporučuji** k obhajobě (podle § 47 VŠ zákona 111/98 Sb.). Mgr. Filip Vrbacký předloženou prací i svojí dlouhodobou odbornou činností prokazuje, že má o problematice prognostických faktorů CLL a jejich diagnostiky dobrý přehled, má tvůrčí schopnosti a že je schopen kvalitně naplánovat, provést a vyhodnotit laboratorně-klinické experimenty.

V Brně dne 31. 5. 2016

.....  
Prof. RNDr. Šárka Pospíšilová, Ph.D.  
LF MU, CEITEC MU a FN Brno