



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Děkanát, Hněvotínská 3, 779 00 Olomouc

V Olomouci 28. června 2018

**Zápis o konání obhajoby disertační práce v oboru Lékařská chemie a
biochemie**

Mgr. Soňa Andree, forenzní genetička, Krajské ředitelství policie Moravskoslezského kraje, studentka kombinované formy doktorského studijního programu *Lékařská chemie a biochemie* na LF UP v Olomouci.

Téma práce: „**MikroRNA miR-29: exprese a biologická aktivita**“

Obhajoba se konala v Olomouci dne 28. června 2018 v 13:00 hod.

Komise:

předseda: prof. RNDr. Jitka Ulrichová, Ph.D. ✓

místopředseda: doc. Ing. Kateřina Valentová, Ph.D. ✓

členové: doc. Mgr. Jiří Vrba, Ph.D. ✓

doc. RNDr. Ondřej Slabý, Ph.D. ✓

doc. RNDr. Jitka Vostálová, Ph.D. ✓

Oponenti:

doc. RNDr. Ondřej Slabý, Ph.D. ✓

CEITEC – Středoevropský technologický institut v Brně

Mgr. Mária Janíková, Ph.D. ✓

Ústav klinické a molekulární patologie LF UP a FNOL

Školitel:

prof. Mgr. Martin Modrianský, Ph.D. ✓

Předseda komise přednesl stručnou charakteristiku uchazeče, hodnocení školitele a vedoucího školicího pracoviště. Poté uchazeč vyložil podstatný obsah své disertace. Oponenti přednesli své posudky. Uchazeč odpověděl na připomínky a dotazy oponentů.

Ve vědecké rozpravě vystoupili: viz příloha – zápis o diskusi.

Hlasování se účastnilo ...5... členů komise. Kladně hlasovalo ...5... členů, záporně ...0... členů, neplatných lístků bylo odevzdáno ...0...

Usnesení:

Přítomní členové komise tajným hlasováním rozhodli, že **Mgr. Soňa Andree** obhájila disertační práci a doporučili udělení akademického titulu doktor ve zkratce Ph.D. dle § 47 Zákona o vysokých školách č. 111/98 Sb.

.....
prof. RNDr. Jitka Ulrichová, Ph.D.
předsedkyně komise

ZÁPIS

OBHAJOBA DISERTAČNÍ PRÁCE

Dne: 28.06.2018

Jméno: Mgr. Soňa Andree

Dotazy oponenta – Mgr. Mária Janíková, Ph.D.

1. Co hodnotí Sokalův index a co to pro pacienta znamená, když je nízký, střední nebo vysoký?

Sokalův index se užívá k odhadu prognózy, jehož výpočet se opírá o prognostické parametry zjistitelné v době diagnózy (věk, velikost sleziny, počet trombocytů, procento blastů). Nemocné lze podle této hodnoty zařadit do skupin s nízkým, středním a vysokým rizikem, což napomáhá při stanovení optimální léčebné strategie.

$$\{0,016x (\text{věk}-43,4) + 0,0345x (\text{lien}-7,51) + 0,118x [(Tr:700)20,563] + 0,08887x (\text{blasty}-2,1)\}$$

< 0,8 nízké riziko

0,8 – 1,2 střední riziko

>1,2 vysoké riziko

2. Na jakém principu fungují detekční systémy sloužící k identifikaci specifických proteinů v buňkách, tkáních, resp. v jejich lysátech? Jak je možné získaný signál amplifikovat?

- Princip interakce antigen-protilátka : elisa, western blot, imunofluorescenční mikroskopie, průtoková cytometrie, PLA (proximity ligation assay)

- Amplifikace signálu: CARD (catalyzed reporter deposition) peroxidázou přeměněný substrát se naváže na protein v bezprostřední blízkosti, akumuluje se a pak je detekován další protilátkou s peroxidázou

3. Srovnávali jste změny exprese jednotlivých členů rodiny miR-29 u pacientů s CML v porovnání se zdravými kontrolními dárci krve?

Všechny uvedené výsledky změřené na pacientech jsou srovnávány se zdravými kontrolními dárci krve, nicméně na změny exprese jednotlivých členů rodiny miR-29 vs. zdraví kontrolní dárce krve jsme se nezaměřili.

4. Co znamená zkratka „UT“ použitá v obrázku 15 (str. 66) a v tabulce 12 (str. 74)?

Zkratka „UT“ je odvozena z anglického slovíčka untreated = neošetřené. Znamená skupinu kontrolních buněk neošetřených žádnou substancí.

5. Je efekt zvyšující se hladiny miR-29 po podání imatinibu s následným poklesem po dosažení remise onemocnění pozorován i u jiných nádorových onemocnění, u kterých se k léčbě využívá právě imatinib?

Imatinib se používá kromě léčby CML také v léčbě gastrointestinálního stromálního tumoru, ALL (akutní lymfatická leukémie, Ph+), MDS/MPD (myelodysplastické/myeloproliferativní onemocnění),

HES (syndrom hypereozinofilie), CEL (chronická eozinofilní leukemie), DFSP (dermatofibrosarkom protuberans). U těchto onemocnění dosud nebyla provedena obdobná studie.

Dotazy oponenta – doc. RNDr. Ondřej Slabý, Ph.D.

1. V čem spočívá rozdílné biologické chování miR-29 u CLL a CML? Čím si toto rozdílné chování vysvětlujete?

- U CLL se rozlišují dvě skupiny pacientů - pacienti s indolentním charakterem onemocnění a s agresivním. Nízká hladina miR-29 je asociována s agresivní formou onemocnění a naopak. Na souboru pacientů měřeném v diplomové práci jsme neměli takto rozlišené skupiny pacientů, takže hladiny exprese miR-29 u CLL je irelevantní hodnotit.
- Jedná se o dvě naprosto odlišná onemocnění, u kterých nelze hledat společné pojítko.

2. Na souboru pacientů s CML jste studovala dynamiku hladin rodiny miR-29 a hladin BCR-ABL v průběhu léčby imatinibem. Zkoušeli jste tyto miRNA studovat také u pacientů rezistentních na imatinib? Jaké hladiny miR-29 byste zde očekávala a proč?

- Skupina pacientů rezistentních na imatinib nebyla k dispozici. Určitě má význam pro budoucí studii.
- V souvislosti s léčbou imatinibem bych očekávala stabilně vysoké hladiny exprese BCR-ABL a zároveň bych neočekávala nárůst hladiny exprese rodiny miR-29, ale její stabilní nízké hladiny. Jiná účinná léčba by mohla způsobit zvýšení hladiny exprese rodiny miR-29, jako nádorového supresoru, a navodit tak apoptózu nádorových buněk.

3. V diskuzi uvádíte, že možným pojítkem mezi působením BCR-ABL a miR-29, které by mohlo vysvětlit vzájemné souvislosti změn jejich exprese by mohl být onkogen c-Myc. C-Myc je totiž zapojen jak do regulace BCR-ABL, tak negativně reguluje expresi rodiny miR-29. Jak byste tento zajímavý model verifikovala v in vitro experimentu? Pokoušela jste se o to?

- Tato hypotéza zatím nebyla experimentálně ověřena.
- Sledování hladiny c-Myc na buňkách ošetřených a neošetřených imatinibem (western blot)
- Porovnání hladiny c-Myc s hladinami BCR-ABL a hladinami miR-29 (real-time PCR)
- Využití c-Myc siRNA pro potlačení exprese c-Myc a sledování s hladinami BCR-ABL a hladinami miR-29 (transfekce, western blot, real-time PCR)

4. V čem spatřujete možné budoucí klinické využití rodiny miR-29 u hematologických malignit?

Významný biomarker v hematologii

- diagnostický (klasifikace, subtypy)
- prognostický (celkové přežívání, čas do relapsu onemocnění)
- prediktivní (léčebná odpověď, individualizace léčby)

Substituční terapie

- doplněk Imatinibu při podezření na rezistenci
- cíl - navodit fyziologický stav

Diskuse

Doc. RNDr. Jitka Vostálová, Ph.D.: Co může způsobovat rezistenci na imatinib u pacientů?

Mgr. Soňa Andree: Mechanismů je několik, jedna z nich je například overexprese BCR-ABL

Prof. Mgr. Martin Modrianský, Ph.D.: ABC-transportéry

Doc. RNDr. Ondřej Slabý, Ph.D.: mutace.

Prof. RNDr. Jitka Ulrichová, Ph.D.: Jsou dnes již některé mikroRNA využívány v klinické praxi?

Mgr. Soňa Andree: Nejdále je výzkum s miR-122 na léčbu hepatitidy typu C, který je ve fázi III klinického testování.