

OPONENTSKÝ POSUDEK

dizertační práce *Mgr. Lenky Krůzové*, doktorandky studijního programu Lékařská genetika, s názvem *Molekulární cytogenetika chronické lymfocytární leukémie*.

Popis dizertační práce

Dizertační práce Mgr. Lenky Krůzové byla vypracována v doktorském studijním programu Lékařská genetika pod vedením Mgr. Heleny Urbánkové, Ph.D. Tématem práce je studium molekulárně cytogenetických změn u chronické lymfocytární leukémie (CLL). Zvolené téma je vysoce aktuální, neboť studium dané problematiky pomáhá blíže pochopit složitou patogenezu CLL a posoudit prognózu nemocných s CLL mj. i v terapeutických souvislostech. Rozsah práce činí 118 stran. Práce obsahuje 18 obrázků a 7 tabulek. Literární odkazy představují 235 citací, z toho 15 z pera domácích autorů. Cílem práce bylo shrnout literární údaje v oblasti molekulárně-cytogenetických aberací u CLL, detailně prozkoumat jednotlivé genetické aberace v rámci komplexního karyotypu u CLL a posoudit jejich výskyt a prognostický význam mj. i v asociaci s jinými známými prognostickými faktory a dále podrobně vyhodnotit prognostický význam a bližší genetické charakteristiky u nemocných s delecí chromozomu 6q a u pacientů se zmnožením krátkých ramen chromozomu 2. Teoretická část práce má přiměřený rozsah, detailně pokrývá studovanou problematiku a má jen drobné nedostatky (např. opomenutí diagnostického významu exprese znaku CD79b u CLL). Velmi cenná je zde zejména kapitola týkající se Richterovy transformace CLL, která vyčerpávajícím způsobem shrnuje poznatky o genetickém pozadí této nepříznivé klinické situace. Vlastní studium zahrnuje skupinu nemocných s komplexním karyotypem (79 ze 644 nemocných s CLL), skupinu nemocných s delecí 6q (91 z 1158 nemocných s CLL) a skupinu nemocných se zmnožením dlouhých ramen chromozomu 2 (52 ze 604 nemocných s CLL), jejichž periferní krev, kostní dřeň či lymfatická uzlina byly vyšetřeny metodami konvenční a molekulární cytogenetiky. Ve skupině pacientů s komplexním karyotypem byl zhodnocen jeho prognostický význam a detailně analyzován výskyt a význam jednotlivých chromozomálních aberací v rámci komplexního karyotypu.

Ve skupinách nemocných s delecí 6q a se zmnožením dlouhých ramen chromozomu 2 byla popsána asociace těchto změn s jinými chromozomálními aberacemi a stanoven jejich prognostický význam. Bylo provedeno srovnání dvou genetických podskupin nemocných s delecí 6q, stanovena minimální deletovaná oblast 6q21 a relativní exprese kandidátních genů s důrazem na prognostický význam exprese genu *FOXO3*.

Metody, výsledky a formální úroveň dizertační práce

Vyšetření materiálu zahrnovalo konvenční cytogenetiku (G-pruhování) a molekulární cytogenetiku (FISH, mFISH, arrayCGH) po předchozí kultivaci. Pro celkové přežívání byly sestrojeny Kaplan-Meierovy křivky. Výskyt komplexního karyotypu v souboru 644 nemocných byl 12.3 %. Byl popsán výskyt jednotlivých cytogenetických abnormit v rámci komplexního karyotypu a asociace nejčastěji postižených chromozomů a zhodnoceno celkové přežití pacientů také s ohledem na vybrané genetické změny a počet aberací. Frekvence chromozomálních aberací a jejich společný výskyt byly hodnoceny mj. formou sítě využívající algoritmus vycházející z analýzy nejbližších sousedů (metodika mohla být v práci pro úplnost blíže popsána). Celkové přežívání nemocných s komplexním karyotypem bylo stanoveno také s ohledem na věk a pohlaví pacientů. Výskyt delece 6q v souboru 1158 nemocných byl 7.8 %. Byla popsána asociace delece 6q s přídatnými chromozomálními aberacemi a komplexním karyotypem, zhodnocen prognostický význam této chromozomální aberace a provedena komparativní analýza podskupin nemocných s delecí 6q s přídatnými chromozomálními aberacemi a bez nich s ohledem na věk, pohlaví, mutační stav *IgVH* a OS (některé metodologické detaily této analýzy mohly být v práci blíže popsány). Byla stanovena minimální deletovaná oblast 6q21 a relativní exprese kandidátních genů a popsán prognostický význam exprese genu *FOXO3*. Výskyt zmnožení dlouhých ramen chromozomu 2 v souboru 604 nemocných byl 8.6 %. Byly popsány výskyt jednotlivých chromozomálních aberací v rámci zmnožení dlouhých ramen chromozomu 2, asociace s přídatnými chromozomálními aberacemi a podskupinami mutačního stavu *IgVH* a komplexním karyotypem a byl zhodnocen prognostický význam této genetické změny. U všech pacientů s výjimkou jednoho byla provedena arrayCGH; určení minimální zmnožené oblasti a exprese kandidátních genů ovšem nebyly provedeny z objektivních důvodů.

Práce dále obsahuje dva fundované komentáře publikací s úzkým vztahem ke studované problematice, jichž je doktorandka spoluautorkou.

Výběr hodnocených parametrů a použité statistické metody plně vyhovovaly cílům práce. Práce je napsaná precizně se snahou o úplný výčet literárních souvislostí v teoretickém úvodu i diskuzi, což dokazuje autorčinu výbornou orientaci v problematice. Lingvistická úroveň dizertační práce je vynikající, nevyskytují se formulační neobratnosti, gramatické chyby ani překlepy.

Význam dizertační práce pro obor Lékařská genetika

Předložená dizertační práce v teoretické části vyčerpávajícím způsobem didakticky shrnula problematiku genetických změn u CLL. Ve skupině pacientů s komplexním karyotypem byly podrobně prostudovány jednotlivé genetické aberace a jejich vliv na celkové přežití a byla diskutována prognostická stratifikace vycházející z komparace jednotlivých genetických podskupin nemocných včetně inovativního zohlednění jejich věku a pohlaví. K mimořádně preciznímu hodnocení nemocných s komplexním karyotypem přispěla zejména skutečnost vysoce komplexní genetické analýzy se systematickým využitím FISH, mFISH a arrayCGH. Podobně precizním a detailním způsobem byly charakterizovány skupiny pacientů s delecí 6q a zmnožením dlouhých ramen chromozomu 2. Předložená dizertační práce tak významným způsobem rozšiřuje poznání u vzácnějších a méně probádaných genetických skupin nemocných s CLL.

Na doktorandku mám následující otázky:

1. Jaký rozsah a frekvenci genetického testování u nemocných s CLL byste doporučila s ohledem na výsledky své práce?
2. V rámci komplexního karyotypu se u CLL jen velmi vzácně vyskytují současně aberace chromozomu 11 a 17. Zhoršuje jejich současný výskyt ještě dále prognózu nemocných s CLL?

3. Unikátním a velmi zajímavým zjištěním je diametrální rozdíl OS skupin nemocných se zmnožením dlouhých ramen chromozomu 2 již v době diagnózy CLL a se vznikem této změny až během klonálního vývoje nemoci. Jak si vysvětlujete tento fenomén?
4. Může být nepříznivý prognostický význam genetických změn u CLL smazán použitím některé léčebné modality?

Závěr:

Dizertační práce je zvolena na vysoce aktuální téma. Vytčené cíle dizertační práce byly beze zbytku splněny. Metody zpracování jsou na vysoké úrovni. Výsledky dizertační práce jsou originální, přinášejí nové poznatky a mají nesporný význam pro další rozvoj vědy a též medicínské praxe. Doktorandka prokázala detailní znalost studované problematiky a osvědčila schopnost koncepční výzkumné práce. Precizní metodika, detailní popis a způsob hodnocení získaných výsledků, jakož i formulace závěrů práce a jejich fundovaná diskuze svědčí v plné míře o odborné způsobilosti a vědecké zralosti doktorandky. Výsledky práce byly v dostatečném rozsahu publikovány v renomovaných zahraničních periodících a v domácím písemnictví s doktorandkou jako první autorkou či spoluautorkou publikačních výstupů.

Práci hodnotím jako vynikající a doporučuji ji k obhajobě podle § 47 Zákona o vysokých školách 111/98 Sb.; po úspěšné obhajobě pak doporučuji udělení vědeckého titulu Ph.D.

MUDr. David Starostka, Ph.D.

Primář Oddělení klinické hematologie

Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o.

Dělnická 1132/24, 73601 Havířov

V Havířově 18.5.2020

Oponentský posudek na doktorskou disertační práci Mgr. Lenky Krůzové

Název práce: MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKA CHRONICKÉ LYMFOCYTÁRNÍ LEUKÉMIE.

Předkládaná disertační práce Mgr. Lenky Krůzové se zabývá studiem známých i méně častých rekurentních genetických změn v leukemických buňkách dospělých pacientů s chronickou lymfocytární leukémií (CLL), jejich vzájemnými vztahy, korelací s ostatními klinickými a hematologickými ukazateli a jejich prognostickým významem. Autorka se přitom zaměřila zejména na méně časté a tím pádem i méně prostudované aberace. Téma práce je v současné době velmi aktuální a odpovídá světovým trendům ve výzkumu CLL buněk. Přestože v posledních letech došlo k obrovskému pokroku v diagnostice a léčbě CLL, především díky rychle se rozvíjejícím znalostem o genetické podstatě tohoto onemocnění, stále existuje relativně početná skupina pacientů, jejichž prognóza je nepříznivá. Proto je důležité hledat další markery, které by bylo možné využít jak k přesnější diagnostice a monitorování léčby, tak v budoucnu třeba i k vývoji nových cílených léčebných přístupů.

Jedná se o komentovanou formu disertační práce, která je postavena zejména na výsledcích dvou odborných publikací a jedné diplomové práce, u které byla Mgr. Krůzová školitelkou. V úvodní kapitole autorka přináší ucelený přehled současných poznatků o genetických změnách v CLL buňkách. Rovněž shrnuje současné možnosti léčby pacientů s CLL. Na straně 37 jsou pak jasně formulovány jednotlivé cíle disertační práce, které se vztahují k výše zmíněným třem publikacím. V první části kapitoly Výsledky a diskuze se autorka věnuje problematice komplexních karyotypů a jejich vlivu na celkové přežívání CLL pacientů v souvislosti s delecemi dlouhého ramene chromosomu 11, krátkého ramene chromosomu 17 a mutacemi genu *TP53*. V další části se zaměřuje na detailní analýzu delecí na dlouhých ramenech chromosomu 6, u kterých se podařilo určit minimální deletovanou oblast a vytipovat gen *FOXO3*, u kterého byla posléze prokázána snížená relativní exprese. V poslední části se autorka zabývala studiem zisku chromosomového materiálu na krátkých ramenech chromosomu 2, který je obvykle asociován s komplexními karyotypy a/nebo dalšími rizikovými aberacemi. Výsledky studie potvrdily, že všechny studované aberace jsou spojeny s negativní prognózou a kratším celkovým přežitím nemocných.

Práce má celkem 113 stran včetně seznamu zkratk, seznamu literatury, seznamu vlastních publikací a seznamu příloh a je po formální stránce velmi pečlivě a přehledně zpracovaná. Vlastní text práce má 79 stran a je tradičně členěn na kapitoly Úvod, Cíle, Soubor pacientů a metody, Výsledky a diskuze a Závěr. Práce je doložena vysokým počtem citací použité literatury (celkem 235 referencí), které svědčí o širokém rozhledu autorky v dané problematice. Je doplněna rovněž seznamem použitých zkratk, řadou ilustrativních obrázků, přehlednými grafy a tabulkami.

Nedílnou součástí disertační práce jsou publikace, ze kterých samotná práce vychází. Jedná se o celkem 4 publikace v časopise s IF, na kterých se autorka různou měrou podílela. Mgr. Krůzová je první autorkou práce publikované v roce 2019 v časopise *Leukemia Research* (IF 2.066) a spoluautorkou dalších tří prací publikovaných v časopisech *Leukemia Research* (2019; IF 2.066), *American Journal of Hematology* (2007; IF 5.303) a *Neoplasma* (2015; IF 1.961). Kromě toho jsou přiloženy i dvě publikace z časopisu *Transfuze a hematologie dnes* (1x první autorka a 1x spoluautorka). Součástí disertační práce je i podrobný přehled dalších autorčiných odborných aktivit včetně posterů a přednášek prezentovaných na českých i zahraničních odborných konferencích.

Přestože se jedná o velmi kvalitní práci, která přináší řadu zajímavých výsledků, mám k ní několik připomínek, které však nijak významně nesnižují její odbornou úroveň:

- Domnívám se, že kapitola Metody by si zasloužila podrobněji rozepsat. Některé informace k použitým metodám není možné dohledat ani v přiložených publikacích nebo jen velmi obtížně. Například v kapitole „Kultivace biologického materiálu“ autorka uvádí, že u pacientů byla vyšetřena periferní krev (PK), kostní dřeň (KD) nebo lymfatické uzliny (LU), ale nezmiňuje podrobnější informace o tom, u kolika pacientů byl konkrétní typ biologického materiálu vyšetřen. Rovněž

uvádí, že buňky PK byly kultivovány v příslušných médiích bez stimulace nebo za přítomnosti DSP30 nebo ECAMPO10 a interleukinu 2, opět bez dalších podrobností o počtu provedených kultivací. U buněk KD a LU pak autorka o stimulaci vůbec nehovoří, znamená to, že tyto vzorky nebyly stimulovány? Autorka také neuvádí, do jakého odběrového média byly odebrány vzorky LU.

- V metodice FISH není uvedeno, jaká konkrétní sonda byla použita k detekci zisku na 2p (ve výsledcích se pouze říká, že všichni pacienti byli vyšetřeni metodou FISH a u pozitivních nálezů bylo následně doplněno vyšetření aCGH). Dále je v této kapitole pro použité sondy uvedena cut off 5%, není však jasné, na základě čeho byla tato hodnota stanovena. Jedná se o např. o mezinárodní doporučení, nebo byla hodnota stanovena na základě vyšetření kontrolního souboru (pokud ano, jak velkého)? Prosím o doplnění těchto informací.
- V popisku k obrázku č. 7 na straně 46 je uvedeno, že do analýzy byli zařazeni pacienti vyšetřeni metodou FISH ke stanovení delece 17p a NGS ke stanovení mutace *TP53* a dále pacienti vyšetřeni metodou FISH ke stanovení delece 11q. Přitom v metodách je uvedeno, že příslušným FISH panelem byli vyšetřeni všichni pacienti. Není to v rozporu? Kolik pacientů tedy bylo do jednotlivých analýz zahrnuto?
- V nadpisu kapitoly 4.3. je chybně uvedeno „Zmnožení dlouhých ramen chromosomu 2“ – ve skutečnosti se jednalo o krátká ramena.
- Jedním ze závěrů studie je, že pacienti se ziskem v oblasti 2p mají kratší celkové přežití a tudíž horší prognózu. V této studii však byl zisk 2p detekován jako samostatná změna pouze u jednoho pacienta, převážná většina nemocných měla komplexní karyotyp (81%), případně jiné high risk aberace. Proto je velmi pravděpodobné, že špatná prognóza u těchto nemocných souvisí spíše těmito nálezy než přímo se ziskem v oblasti 2p.
- V diskuzi na str. 85, autorka uvádí, že v předkládané studii bylo zmnožení materiálu na 2p u většiny nemocných detekováno již v době stanovení diagnózy, což je údajně v rozporu s nálezy publikovanými v odborné literatuře, které uvádí, že se jedná spíše sekundární událost spojenou s klonálním vývojem a progresí onemocnění. Zároveň však autorka uvádí, že ve většině případů bylo zmnožení 2p součástí komplexních karyotypů, Proto se domnívám, že tyto skutečnosti v rozporu nejsou a opravdu se pravděpodobně jedná o sekundární změnu.

Autorky bych se ráda zeptala, zda u některého z pacientů vyšetřených metodou aCGH pozorovali znaky chromothripsis nebo získané uniparentální disomie (aUPD)?

Závěr: Předložená práce splňuje požadavky kladené na disertační práci. Má dobrou formální i odbornou úroveň. Zvolené téma je aktuální. Použité metodiky jsou moderní a tematicky práce navazuje na současné publikace zahraničních autorů. Disertační práce i soubor příložených publikací shrnují celou řadu velmi zajímavých výsledků, které přináší nové informace o genetických změnách a rekurentních zlomových místech v genomu CLL buněk. Mohu konstatovat, že stanovené cíle disertační práce byly splněny a přinesly významné výsledky, které mohou přispět ke zlepšení diagnostiky CLL a sloužit jako východisko pro další studie. Dosažené výsledky a forma jejich zpracování prokazují, že Mgr. Krůzová má všechny předpoklady k samostatné vědecké práci.

Vzhledem k výše uvedeným skutečnostem doporučuji postoupení práce k obhajobě před komisí a v případě, že bude úspěšně obhájena, doporučuji Mgr. Lence Krůzové udělit titul Ph.D. podle paragrafu 47 Zákona o vysokých školách č. 111/98 Sb.

Doc. RNDr. Zuzana Zemanová, CSc.
Centrum nádorové cytogenomiky VFN a 1. LF UK
Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky
U nemocnice 499/2, 128 08 Praha 2