



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Děkanát, Hněvotínská 3, 779 00 Olomouc

V Olomouci 31. srpna 2017

Zápis o konání obhajoby disertační práce v oboru Onkologie

MUDr. David Starostka, primář Oddělení klinické hematologie NsP Havířov, p.o., student kombinované formy doktorského studijního programu *Onkologie* na LF UP v Olomouci.

Téma práce: „Cytomorfologie a imunofenotyp zralých CD5 – pozitivních B-lymfoidních neoplazií“

Obhajoba se konala v Olomouci dne 31. srpna 2017 v 13:00 hod.

Komise:

předseda: prof. MUDr. Bohuslav Melichar, Ph.D. ✓

místopředseda: prof. MUDr. Jiří Klein, Ph.D. ✓

členové: prof. MUDr. Jindřich Macháček, CSc. ✓

doc. MUDr. David Feltl, Ph.D., MBA ✓

doc. MUDr. Josef Dvořák, Ph.D. ✓

Oponenti:

doc. MUDr. Daniel Lysák, Ph.D. ✓

Hematologicko-onkologické oddělení FN Plzeň

prof. MUDr. Edgar Faber, CSc. ✓

Hemato-onkologická klinika LF UP a FNOL

Školitel: prof. MUDr. Tomáš Papajík, CSc. ✓

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

Usnesení:

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

.....
prof. MUDr. Bohuslav Melichar, Ph.D.
předseda komise

Průběh odborné rozpravy při obhajobě dizertační práce MUDr. Davida Starostky na LF UP v Olomouci dne 31.8.2017:

Prof. Faber (oponent):

Po jakých stránkách je kvantitativní hodnocení imunofenotypu B-lymfoidních malignit náročnější ve srovnání s běžným kvalitativním hodnocením ?

Kvantitativní imunofenotypizace má softwarové požadavky na průtokový cytometr, kvantifikace exprese diagnostických markerů je ale dnes již standardní. Kvantifikace je časově náročnější, nese s sebou příslušné personální nároky a jedná se o vysoce expertní analýzu.

Upravil jste na základě výsledků datových sítí kvantitativního hodnocení imunofenotypu svůj původní panel protilátek ?

Na základě výsledků kvantitativního hodnocení imunofenotypu byla provedena redukce diagnostického panelu s vyřazením znaků CD35, CD22, CD25 a CD95, současně probíhá diagnostická evaluace znaků CD148 a CD160.

Jaké jsou rozdíly mezi vaším panelem a návrhem skupiny Euroflow ?

Rozdíl vyšetřovaných markerů je již při screeningovém vyšetření v „LST“ (Havířov CD45, CD19, CD3, CD4, CD8, CD16/56, kappa, lambda; Euroflow CD45, CD19, CD20, CD3, CD4, CD8, CD56, CD5, CD38, kappa, lambda, TCR gama/delta). Mezi panely je dále rozdíl v používaných klonech, resp. izotypech protilátek a konjugovaných fluorochromech a jejich řazení do jednotlivých zkumavek. Gatovací strategie Euroflow je preciznější – v každé zkumavce se vyšetřují pro gating znaky CD45, CD19 a CD20. Panel Euroflow navíc zahrnuje též méně významné diferenciálně diagnostické znaky CD27, CD31, CD39, CD49, CD62, HLA-DR (dif.dg. LPL, MZL, FL, DLBCL), CD185 (primární kožní FL), CD305 (HCL a VHCL).

Doc. Lysák (oponent):

Jak byla prováděna standardizace průtokového cytometru, resp. zajištění identické pozice okna analýzy během celé doby experimentu ?

Kalibrace průtokového cytometru s nastavením PMT se provádí automaticky s využitím kalibračních sfér BD Cytometer Setup and Tracking Beads (CST Beads) ve třech intenzitách fluorescence (bright, mid, dim; směs fluorochromů). Nová „baseline“ se stanovuje při změně šarže kalibračního materiálu. Vlastní měření se provádí 3x týdně s využitím softwaru FACSDiva. Porovnávají se naměřené a cílové hodnoty MFI se stanovením rCV pro všechny fluorochromy. Výstupem jsou Levey-Jennings grafy. Pro každý experiment se využívají „application settings“. Ke standardizaci analýzy navíc přistupuje vyhodnocování jednotlivých případů jedním expertem.

Použití relativních jednotek (MFI) pro vyjádření intenzity fluorescence je obtížně mezilaboratorně porovnatelné. Proč nebyly použity jiné jednotky, např. MESF, které jsou vhodnější pro porovnání kvantitativních dat v čase nebo mezi různými přístroji ?

V práci jsme využili nejjednodušší dostupný parametr použitelný běžně též v rutinní praxi. Využití MESF je složitější procedura s vyšší cenou a vyžaduje speciální software. Použití absolutních MFI

jsme opřeli o řadu významných publikací, které dokumentují využití stejné metody vyhodnocení expresních profilů:

[Mestrallet F, Sujobert P, Sarkozy C, Traverse-Glehen A, Callet-Bauchu E, Magaud JP, Salles G, Baseggio L](#). CD180 overexpression in follicular lymphoma is restricted to the lymph node compartment. [Cytometry B Clin Cytom](#). 2016 Sep;90(5):433-9. doi: 10.1002/cyto.b.21331. Epub 2015 Dec 11.

Raponi S, De Propriis MS, Intoppa S, Milani ML, Vitale A, Elia L, Perbellini O, Pizzolo G, Foá R, Guarini A. [Flow cytometric study of potential target antigens \(CD19, CD20, CD22, CD33\) for antibody-based immunotherapy in acute lymphoblastic leukemia: analysis of 552 cases](#). [Leuk Lymphoma](#). 2011 Jun;52(6):1098-107. doi: 10.3109/10428194.2011.559668. Epub 2011 Feb 24.

[CD45 expression in low-grade B-cell non-Hodgkin's lymphomas](#). Carulli G, Cannizzo E, Zucca A, Buda G, Orciuolo E, Marini A, Petrini M. [Leuk Res](#). 2008 Feb;32(2):263-7. Epub 2007 Aug 9.

Barna G, Reiniger L, Tátrai P, Kopper L, Matolcsy A. [The cut-off levels of CD23 expression in the differential diagnosis of MCL and CLL](#). [Hematol Oncol](#). 2008 Sep;26(3):167-70. doi: 10.1002/hon.855.

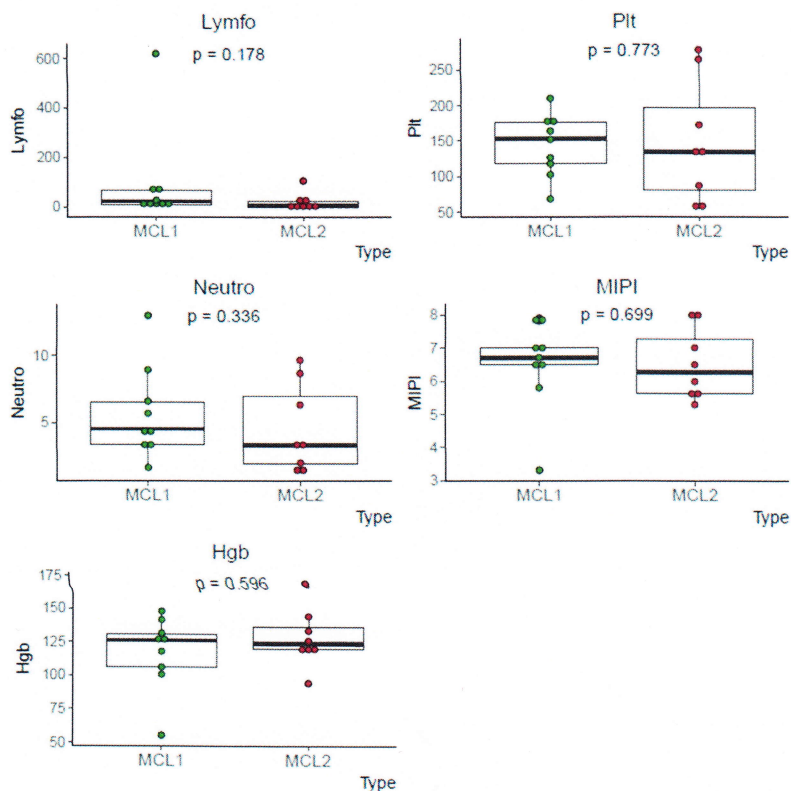
McGowan P, Nelles N, Wimmer J, Williams D, Wen J, Li M, Ewton A, Curry C, Zu Y, Sheehan A, Chang CC. [Differentiating between Burkitt lymphoma and CD10+ diffuse large B-cell lymphoma: the role of commonly used flow cytometry cell markers and the application of a multiparameter scoring system](#). [Am J Clin Pathol](#). 2012 Apr;137(4):665-70. doi: 10.1309/AJCP3FEPX5BEEKGX.

Rahman K, Kumar P, Gupta R, Singh MK, Nityanand S. [Role of CD200 in differential diagnosis of mature B-cell neoplasm](#). [Int J Lab Hematol](#). 2017 Aug;39(4):384-391. doi: 10.1111/ijlh.12637. Epub 2017 Apr 19.

Zhang W, Bai JF, Zuo MX, Cao XX, Chen M, Zhang Y, Han X, Zhong DR, Zhou DB. [PD-1 expression on the surface of peripheral blood CD4⁺ T cell and its association with the prognosis of patients with diffuse large B-cell lymphoma](#). [Cancer Med](#). 2016 Nov;5(11):3077-3084. doi: 10.1002/cam4.874. Epub 2016 Oct 5.

Vizualizace imunofenotypizačních dat v datových sítích naznačila existenci podskupin pacientů s MCL, event. s CLL. Nalezli jste mezi těmito nemocnými jiné odlišné laboratorní nebo klinické charakteristiky, byla-li taková analýza provedena ?)

Dvě oddělené skupiny nemocných s MCL se lišily expresí znaků CD38, CD35 a CD25. Nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly v parametrech hemogramu, v cytomorfologickém typu, typu postižení, MIPI ani v klinickém průběhu (viz obrázek). V síti se těsně vedle sebe vyskytly dva případy MCL se zcela indolentním průběhem nevyžadující doposud léčbu.



Jaké konkrétní praktické využití mají matematické modely, které vyplynuly ze zpracování imunofenotypizačních dat ? Jak byly tyto modely validovány ?

Síťový model může s určitou limitací sloužit jako vizuální klasifikátor CLL, MCL a CD5+ MZL při zařazení případu s neznámou diagnózou do sítě (viz obrázek). Na základě komplexních dat o imunofenotypu lze též konstruovat exaktní klasifikátory typu rozhodovací stromy (viz obrázek) a náhodný les, které umožňují automatizaci hodnocení kvantitativních dat a automatickou klasifikaci případů s neznámou diagnózou na principu učení se ze známých dat (trénovací a testovací sada, křížová validace). Výsledkem studie je takový klasifikátor s diagnostickou chybou nižší nežli 5% (viz obrázek).

