

## **Oponentský posudek na disertační práci: MUDr. Petera Turcsányiho**

### **Název disertační práce: Biologické charakteristiky nově diagnostikované chronické lymfocytární leukémie a jejich vztah k léčbě a prognóze**

Školitel: prof. MUDr. Tomáš Papajík, CSc.

Pracoviště: Hemato-onkologická klinika LF UP a FN Olomouc

Dizertační práce je zaměřena na problematiku biologické charakteristiky nově diagnostikované chronické lymfocytární leukémie se zřetelem na vysoce rizikovou skupinu nemocných a jejich vztah k prognóze a léčbě.

Vlastní text disertační práce má 74 stran, 165 literárních odkazů, 7 tabulek, 12 obrázků. Práce má teoretický úvod, cíle disertační práce, vlastní soubor, metodiku, výsledky, diskuzi, závěry a souhrn.

#### **Téma práce:**

Zvolené téma práce je vysoce aktuální.

Chronické lymfocytární leukémie je onemocnění, které je známé svým heterogenním klinickým průběhem. Studium prognostických faktorů nabývá stále větší význam v dnešní době, kdy se před námi otevírají nové léčebné možnosti a koncept individualizované léčby. Práce je zaměřena na skupinu prognosticky nejrizikovějších pacientů, jejichž nepříznivá prognóza je definována genetickými změnami, jako je delece 17p, mutace *TP53*, delece 11q a přítomnost komplexního karyotypu. Tyto změny jsou spojovány u CLL s krátkým celkovým přežitím, krátkou dobou do zahájení léčby a krátkou odpovědí na podanou terapii.

#### **Cíl práce:**

Dizertační práce je zaměřena na studium biologických charakteristik nově diagnostikované CLL a jejich vztahu k léčbě a prognóze a dále na určení ultra-rizikových skupin pacientů, kteří by profitovali z léčby novými léčebnými modalitami.

Cílem bylo studovat expresi HLA-DR a imunomodulační účinek ibrutinibu na leukemické buňky, T lymfocyty a monocyty u pacientů s CLL.

Stanovit dynamické změny v počtu a aktivaci leukemických buněk, T lymfocytů a monocytů během krátkodobé a dlouhodobé léčby ibrutinibem.

Určit klíčové klinické, demografické a laboratorní parametry mající vztah k prognóze pacientů s CLL léčených chemoimunoterapií.

Identifikovat ultra-rizikové pacienty s genetickými změnami, kteří by profitovali z léčby BCR inhibitory a blokátory bcl-2 signální dráhy.

Stanovit dynamické změny v HLA – DR expresi během krátkodobé a dlouhodobé léčby ibrutinibem u pacientů s CLL.

### **Zvolené metody zpracování:**

Použitá kombinace multivariačních a síťových přístupů prokázala vysoký potenciál pro identifikaci rizikových pacientů.

Všechny statistické analýzy (Mann-Whitney-Wilcoxon test, receiver operating characteristic curves (ROC), Kaplan-Meierovy křivky přežití) byly provedeny za použití R statistického software. Celkové přežití (OS) bylo definováno jako čas od doby diagnózy do data posledního sledování nebo data úmrtí z jakékoliv příčiny. P hodnota  $< 0,05$  byla považována za signifikantní.

Pro vizualizaci vnitřních vztahů (podobností) mezi klinickými, demografickými a laboratorními daty u jednotlivých pacientů byla použita metoda síťových konstrukcí na bázi analýzy nejbližšího souseda.

### **Výsledky:**

Kohorta pacientů se sestávala ze 116 pacientů s CLL.

První část práce je věnována studiu exprese HLA-DR a *in vitro* a *in vivo* imunomodulačnímu účinku ibrutinibu.

Prokázán byl nejen imunomodulační efekt ibrutinibu na expresi molekuly HLA-DR, která hraje klíčovou roli v nastolení účinné protinádorové imunitní odpovědi, nejen na leukemické buňky ale také na T lymfocyty a monocyty mikroprostředí.

Dále byly prokázány dynamické změny v počtu i aktivaci CLL buněk, T lymfocytů a monocytů během krátkodobé a dlouhodobé léčby ibrutinibem.

Jedná se o první zmínku pojednávající o změnách v kinetice B buněčného antigenního receptoru (BCR) a internalizaci maligních buněk u CLL po krátkodobém a dlouhodobém užívání ibrutinibu.

Další část práce byla zacílena na skupinu vysoce rizikových pacientů (HR-CLL).

Data odhalila tři hlavní podskupiny HR-CLL pacientů na základě kombinace klíčových prognostických faktorů (del17p/mutace *TP53*, del11q, přítomnost komplexního karyotypu, lymfadenomegalie, přítomnost splenomegalie a pohlaví pacientů).

Subanalýza identifikovala dvě ultra-rizikové HR-CLL podskupiny sestávající se z i) mužů s poruchou *TP53* s / bez CK a ii) žen s poruchou *TP53* a CK.

Kromě toho byla identifikována skupina pacientů s CK + del (11q) s velmi špatnou krátkodobou prognózou.

Identifikace ultra-rizikových HR-CLL pacientů může v blízké budoucnosti pomoci stratifikovat CLL pacienty dle prognózy a pomoci při rozhodování o léčbě.

Tato práce vychází ze zkušenosti pracoviště Hemato-onkologické kliniky FN Olomouc s neselektovanou populací CLL pacientů, se širokým spektrem komplikací a nežádoucích účinků na rozdíl od komerčních studií.

Výsledky práce přispěly k aktualizaci doporučení vyšetřování prognostických faktorů v klinické praxi HOK LF UP a FN Olomouc.

### **Splnění stanoveného cíle:**

Předložená práce jednoznačně splnila svůj cíl.

### **Dotazy:**

1. Které prognostické faktory jsou nejdůležitější při výběru léčby pacientů s CLL novými léky BCR inhibitory a blokátory bcl-2 signální dráhy?

2. Hodláte se uvedenou tematikou dále zabývat?

### **Závěr**

Jedná se o práci, která je velmi dobře zpracovaná, srozumitelná a aktuální s klinickým dopadem. Má všechny formální náležitosti vyžadované pro řešení vědecké hypotézy. Dokazuje schopnost autora k samostatné vědecké práci a kritického zpracování literárních a vlastních poznatků. Přináší některé nové vědecké poznatky. Práce je precizní, s dostatečným množstvím literatury, doplněna tabulkami a grafy. Zcela odpovídá požadavkům pro vypracování disertační práce.

Pakliže splňuje i ostatní kritéria kladená na studenty postgraduálního programu Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci, **doporučuji** práci přijmout v předložené formě jako podklad k obhajobě a na jejím podkladě doporučuji přidělit uchazeči titul Ph.D. dle §47 Zákona o vysokých školách č. 111/98 Sb.

doc. MUDr. Jaroslav Bačovský, CSc.

Hemato-onkologická klinika

LF UP a FN Olomouc

I. P. Pavlova 6

779 00 Olomouc

Email: Bacovskyj@post.cz

Olomouc 8.8.2018

## Posudok oponenta na dizertačnú prácu

**Autor:** MUDr. Peter Turcsányi

**Názov práce:** Biologické charakteristiky nově diagnostikované chronické lymfocytární leukémie a jejich vztah k léčbě a prognóze

**Školitel:** Prof. MUDr. Tomáš Papajík, CSc.

**Oponent:** doc. MUDr. Mária Bucová, CSc.

Chronická lymfocytárna leukémia (CLL) je nádorové ochorenie, ktorú charakterizuje progresívna akumulácia funkčne nekompetentných klonálnych B-lymfocytov typickej morfológie a imunofenotypu. V západných krajinách patrí k najrozšírenejším leukémiám medzi dospelými (25 až 30 % leukémií).

CLL je choroba, ktorá má veľmi variabilný priebeh. Kým u niektorých pacientov s CLL dĺžku života neskracuje, u iných sa chová veľmi agresívne, rýchle progreduje a prežitie pacienta od stanovenia diagnózy je 2–3 roky. V jej patogenéze majú dôležitú úlohu genetické zmeny – delécia dlhého ramienka chromozómu 11 (del 11q), 13 (del 13q), ale aj krátkeho ramienka 17p, tiež mutácie TP53 ako aj prítomnosť komplexného karyotypu a ďalšie. Okrem genetických faktorov sa v sére pacientov sledujú aj viaceré parametre (beta-2-mikroglobulín, laktátdehydrogenáza, thymidínkináza, CD38 transmembránový proteín, tyrozínová kináza 75 ZAP-70 („Zeta-chain Associated Protein“) a ďalšie, ktoré s uvedenými genetickými zmenami slúžia v prognózovaní pacientov a v sledovaní efektu liečby. Stanovenie somatických mutácií génov NOTCH1, SF3B1, TP53, MYD88 a BIRC3 začalo naberať na význame najmä v poslednej dobe, a to vďaka používaniu inhibítorov signalizácie B - bunkových receptorov.

Z uvedených skutočností vyplýva, že **téma** dizertačnej práce je vysoko aktuálna. Je zameraná na biologické charakteristiky novo diagnostikovanej chronickej lymfocytárnej leukémie, jej vzťahu k liečbe a prognóze a tiež na určenie vysoko rizikových pacientov, ktorí by mohli profitovať z liečby s novými liečebnými modalitami.

Práca je napísaná na 74 stranách a je vhodne zdokumentovaná dostatočným počtom tabuliek (7) a obrázkov (12). V závere autor uvádza 165 literárnych odkazov.

**Ciele práce:** Sú vysoko aktuálne. Autor si dal za cieľ:

- 1., študovať expresiu HLA-DR a imunomodulačný účinok ibrutinibu na leukemické bunky, T-lymfocyty a monocyty u pacientov s CLL
- 2., stanoviť dynamické zmeny v počte a aktivácii leukemických buniek, T-lymfocytov a monocytov počas krátkodobej a dlhodobej liečby ibrutinibom u pacientov s CLL
- 3., určiť kľúčové klinické, demografické a laboratórne parametre k prognózovaniu pacientov na chemoimunoterapii
- 4., identifikovať ultra-rizikových pacientov zo skupiny rizikových CLL pacientov s prognosticky významnými genetickými zmenami, ktorí by profitovali z liečby novými cieľenými BCRi inhibítormi a blokátormi bcl-2 signálnej dráhy

**Zvolené metódy spracovania:**

Výber pacientov, laboratórných postupov ako aj štatistické spracovanie výsledkov je veľmi dobrý. Kombinácia multivariačných a sieťových prístupov sa ukázala ako vhodná na identifikáciu rizikových pacientov.

**Dosiahnuté výsledky:**

Prvá časť práce sa venovala sledovaniu expresie molekuly prezentujúcej antigén HLA-DR vplyvom krátkodobej a dlhodobej liečby ibrutinibom a to na CLL bunkách.

Po jednom mesiaci liečby ibrutinibom sa znížila expresia HLA-DR ako aj CD20 na CLL bunkách, súčasne došlo k nárastu absolútneho počtu CLL buniek v periférnej krvi. Naopak, dlhodobá liečba ibrutinibom viedla k vzostupu expresie HLA-DR ako aj CD20 na bunkách CLL.

Výsledky *in vivo* experimentov potvrdili autori aj experimentami *in vitro*. Použili PBMC izolované od pacientov neliečených s ibrutinibom s vysokým podielom CLL buniek. Po kultivácii týchto CLL buniek v prítomnosti ibrutinibu po dobu 24 a 48 hodín sa pozorovala výrazne znížená expresia HLA-DR na populácii CLL. Tieto výsledky sa potvrdili aj na úrovni mRNA.

Autori dokázali imunomodulačný vplyv ibrutinibu na expresiu molekuly HLA-DR, ktorá má úlohu aj v rozvoji protinádorovej imunity. Efekt liečby sa prejavil na bunkách CLL, ale tiež T-lymfocytoch a monocytoch.

V ďalšej časti práce dizertant pomocou kombinácie kľúčových prognostických faktorov (del 11q, del 17p, mutácia TP53, prítomnosti komplexného karyotypu, lymfadenomegalie, splenomegalie a pohlavia pacientov) odhalil tri skupiny vysokorizikových pacientov (HR-CLL). Následná subanalýza identifikovala dve ultra rizikové HR-CLL podskupiny, a to 1., mužov s mutáciou TP53s/bez CK a 2. ženy s mutáciou TP53 a CK. Okrem toho identifikoval skupinu pacientov s CK a deléciou dlhého ramienka chromozómu 11 (del 11q) s veľmi zlou krátkodobou prognózou. Identifikácia jednotlivých skupín HR CLL by mohla byť nápomocná pri stratifikácii pacientov podľa prognózy a pomôcť pri rozhodovaní o liečbe.

### **Ciele práce boli splnené.**

Napriek tomu, že ide o veľmi peknú prácu, mám zopár, pripomienok.

1. V časti Obsah by sa zišlo očíslovať strany jednotlivých kapitol.
2. Autor používa dosť často anglikanizmy, ako napr. recentní studie, PBMC boli „starved“, alebo performance stavu a ďalšie

### **Záver:**

Práca je vysoko aktuálna a je napísaná veľmi pekne. Je zrejmé, že autor sa v problematike veľmi dobre orientuje, podáva veľmi pekný komplexný literárny prehľad danej problematiky. Okrem toho si veľmi cením schopnosť spolupráce minimálne troch vysoko erudovaných pracovísk – hematónkológie, imunológie a tiež štatistov. Vďaka spolupráci erudovaných pracovníkov boli nastolené vysoko aktuálne ciele a dosiahnuté pekné výsledky, ktoré navyše boli veľmi pekne štatisticky zhodnotené a graficky zdokumentované. Autor výsledky svojej práce publikoval v karentových časopisoch.

Prácu odporúčam prijať a navrhujem, aby po jej obhájení bol MUDr. Petrovi Turcsányimu udelený vedecký titul PhD.

V Bratislave 14. 8. 2018

  
Doc. MUDr. Mária Bucová, CSc.