



V Olomouci 25. 6. 2020

Zápis o konání obhajoby disertační práce v oboru Lékařská genetika

Mgr. Lenka Krůzová, přírodovědná analytička-diagnostička laboratoře molekulární cytogenetiky Hemato-onkologické kliniky LF UP a FNOL, studentka prezenční formy doktorského studijního programu *Lékařská genetika* na LF UP v Olomouci

Téma disertační práce: „**Molekulární cytogenetika chronické lymfocytární leukémie**“

Obhajoba se konala v Olomouci dne 25. června 2020 v 11:00 hodin.

Komise:

předseda: prof. MUDr. Martin Procházka, Ph.D.přítomen.....

místopředseda: doc. RNDr. Radek Vrtěl, Ph.D.přítomen.....

členové: prof. MUDr. Jiří Šantavý, CSc.přítomen.....

prof. RNDr. Marie Korábečná, Ph.D.přítomna.....

doc. MUDr. Alena Šantavá, CSc.přítomna.....

doc. Mgr. Radek Vodička, Ph.D.přítomen.....

Školitel: Mgr. Helena Urbánková, Ph.D.přítomna.....

Oponenti: doc. RNDr. Zuzana Zemanová, CSc.přítomna.....
Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF UK a VFN v Praze

MUDr. David Starostka, Ph.D.přítomen.....
Oddělení klinické hematologie, Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o.

Předseda komise přednesl stručnou charakteristiku uchazeče, hodnocení školitele a vedoucího školicího pracoviště. Poté uchazeč vyložil podstatný obsah své disertace. Oponenti přednesli své posudky. Ve vědecké rozpravě vystoupili: viz příloha – zápis o diskusi.

Hlasování se účastnilo ...6.... členů komise. Kladně hlasovalo ...6.... členů, záporně ...0..... členů, neplatných lístků bylo odevzdáno ...0.... .

Usnesení:

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

.....
prof. MUDr. Martin Procházka, Ph.D.
předseda komise

*nehodící se škrtněte

Otázky I. oponenta prim. MUDr. D. Starostky, Ph.D.:

1. Jaký rozsah a frekvenci genetického testování u nemocných s CLL byste doporučila s ohledem na výsledky své práce?

Odpověď doktorandky:

Současná doporučení - cytogenetické vyšetření a CLL panel před léčbou

Doporučení s ohledem na výsledky práce - v době diagnózy + před léčbou cytogenetické vyšetření a rozšířený panel CIL, v případě neúspěšného vyšetření i vyšetření ALK/NMYC a arrayCGH, před každou další léčbou cytogenetické vyšetření + rozšířený panel CLL, v případě refrakterního/ progresivního onemocnění, popř. relapsu cytogenetické vyšetření + rozšířený panel CLL, příp. mFISH a arrayCGH. Kontroly do půl roku — zopakovat sondy pro detekci původních aberací + ATM/TP53

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?

Odpověď doktorandky:

Významně nezhoršuje. Důl. zda v rámci jednoho/dvou klonů -ž současná delece v jednom klonu horší OS. Současná mutace daných genů? mechanismus inaktivace p53. Komplexní karyotyp — větší význam než TP53 delece/mutace u pacientů léčených ibrutinibem

3. Unikátním a velmi zajímavým zjištěním je diametrální rozdíl OS skupin nemocných se zmnožením krátkých ramen chromozomu 2 již v době diagnózy CLL a se vznikem této změny až během klonálního vývoje nemoci. Jak si vysvětlujete tento fenomén?

U pacientů se získkem 2P v době diagnózy — většinou součástí komplexního karyotypu — agresivní průběh onemocnění, chemorezistentní. U pacientů se získkem 2P v průběhu onemocnění záleží na době uběhlé od stanovení diagnózy i na předchozích liniích léčby.

4. Může být nepříznivý prognostický význam genetických změn u CLL smazán použitím některé léčebné modality?

Zcela ne. Nové léčebné přístupy — inhibitory buněčných signálních drah prodloužení kvalitního života nemocných i s komplexním karyotypem a/nebo delecí/mutací genu TP53 ibrutinib (nepředlčení pacienti s delecí 11q, ale v ČR není schválený v 1. linii). Jediná skutečně kurabilní metoda léčby (bohužel spojená s vysokou mortalitou; zvažovat u mladších pacientů s nepříznivými genetickými aberacemi s relapsem do 2 let od léčby ICHT, relapsem po inhibitorech) - alogenní transplantace kostní dřeně/periferních kmenových buněk.

Oponent je spokojen se zodpovězením otázek.

Otázka Zoponentu doc.RNDr. Zuzana Zemanové, Ph.D.:

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

Odpověď doktorandky:

V souboru pacientů s KZ bylo: 7 pacientů s chromothripsis, 4 pacienti s chromothripsis-like nálezem (nejčastěji chr. 1, 3; 2, 6, 12; 4, 11). Dále 9 pacientů s aJPd (nejčastěji chr. 1, X, 2, 10, 11, 18; 4, 5, 9, 12, 17). V souboru pacientů s delecí 6q byl 1 pacient s chromothripsis chromozomu 6, aUPD nelze určit, pouze málo pacientů vyšetřeno pomocí SNP array. Soubor pacientů s duplikací 2p: 5 pacientů s chromothripsis, 5 pacienti s chromothripsis-like nálezem (nejčastěji chr. 2, 8, 9; 1, 11, 3, 8, 10, 16, 17). 16 pacientů s aUPD (nejčastěji chr. 2, 8, 12, 13, 1, 10, 17; 5, 7, 9, 16, 20).

Otázka prof. MUDr. M. Procházky, Ph.D.:

Co to je chromotripse?

Odpověď doktorandky:

Náhlá katastrofická událost, při které dochází současně ke vzniku mnoha zlomů v rámci jednoho chromozomu, následně v rámci oprav poškození dojde k různým delecím, zmnožení jednotlivých oblastí, které se poté znovu pospojují, ne vždy ve správném pořadí. Pokud se jedná aspoň o 10 zlomových míst, hovoříme o chromotripsu. V rámci diskuze s dalšími členy komise bylo řečeno, že v prenatalní diagnostice je tento jev vzácný, u onkologických onemocnění se vyskytuje relativně častěji.

Připomínky 2.oponenta doc.RNDr. Zuzana Zemanové, Ph.D.:

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 'd' autorka uvádí, že u pacientů byla vyšetřena periferní krev (PK), kostní dřev (KD) nebo lymfatické uzliny (LU), ale nezmiňuje podrobnější informace o tom, u kolika pacientů byl konkrétní typ biologického materiálu vyšetřen.

Odpověď doktorandky: Soubor pacientů s KZ: 70x PK, 6x KD, 3x LU; Soubor pacientů s delecí 6q: 70x PK, 21x KD; Soubor pacientů s duplikací 2p: 47x PK, 3x KD, 2x LU

Rovněž uvádí, že buňky PK byly kultivovány v příslušných médiích bez stimulace nebo za přítomnosti DSP30 nebo ECAMPOIO a interleukinu 2, opět bez dalších podrobností o počtu provedených kultivací.

Odpověď doktorandky: do roku 2006 kultivace PK s TPA (12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate), následně kultivace se stimulací pomocí CpG-oligonukleotidů s interleukinem 2, od roku 2013 kultivace s ECAMPOIO a interleukinem 2 (ChromoLympho B Mix od roku 2015)

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. Odpověď doktorandky: Odběrové médium pro LU — RPMI 1640, KD do zkumavky s heparinem; LU ani KD nejsou při kultivaci stimulovány.

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).

Odpověď doktorandky: Sondy pro ALK, NMYC, popř. ZAP-70

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)?

Odpověď doktorandky: hodnoceno v naší laboratoři — preparát hodnotilo nezávisle na sobě 5 pracovníků (300 buněk od každé hybridizační reakce), počet buněk s počtem signálů mimo normální hodnoty se vyjádřil procentuálně a vypočítala se průměrná hodnota (20 pacientů + 20 kontrol pro každou sondu)

V popisku k obrázku č. 7 na straně 46 je uvedeno, že do analýzy byli zařazeni pacienti vyšetřeni metodou FISH ke stanovení delecí 17p a NGS ke stanovení mutace TP53 a dále pacienti vyšetřeni metodou FISH ke stanovení delecí 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?

Odpověď doktorandky: Všichni pacienti s CK vyšetřeni metodami FISH k detekci delecí ATM a TP53. Z analýzy byli vyřazeni pacienti, u kterých nebyla provedena FISH na ATM u kontrolního souboru (522 pacientů - vs. 79 pacientů s CK), u kterých nebylo provedeno NGS na mutaci TP53 a 202 pacientů v kontrolním souboru vs. 71 pacientů s CK.

V nadpisu kapitoly 4.3. je chybně uvedeno „Zmnožení dlouhých ramen chromosomu 2“ — ve skutečnosti se jednalo o krátká ramena.

Odpověď doktorandky: Ano, bohužel, jedná se o chybu, jde skutečně o krátká ramena chromosomu 2.

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.

Odpověď doktorandky: S tímto závěrem samozřejmě souhlasíme, 33 % pacientů v našem souboru s CK má duplikaci 2p, bylo by zajímavé porovnat přežití pacientů s CK bez zmnožení 2P vs. s CK se zmnožením, příp. bez CK se ziskem 2p. Vzhledem k malému počtu pacientů by toto však nebylo vypovídající.

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.

Odpověď doktorandky: Zmnožení 2P bylo prokázáno již v době diagnózy u 43 pacientů (83 %) jako součást CK, další 4 pacienti CK vyvinuli v průběhu onemocnění, na našem malém vzorku pacientů se tedy zdá, že zisk 2P spíše není sekundární změnou. Nicméně je pravděpodobné, že se patologické klonny vyvíjely již před stanovením diagnózy a prvním cytogenetickým vyšetřením, z toho pohledu by se tedy naopak jednalo o sekundární změny a v rozporu s literaturou nejsme.

Oponent je spokojen se zodpovězením otázek a připomínek.

Otázka prof. MUDr. J. Šantavého, CSc.:

Co přesně je „významný rozdíl“ v přežívání pacientů s CLL s nepříznivými genetickými změnami? Dá se nějak definovat?

Odpověď doktorandky: Statisticky významný rozdíl v přežívání byl určen jako statisticky významná hodnota $< 0,05$ a je přesně uveden v jednotlivých grafech v dizertační práci. Posléze doplněno školitelkou, že se jednalo např. konkrétně o rozdíl 60 měsíců mezi skupinami pacientů s CK a bez CK (77 měsíců versus 137 měsíců), tj. 5 roků.

Otázka doc. RNDr. Marie Korabečné Ph.D.

Jaký gen se používal jako kontrolní při stanovení exprese genu FOXO3 u pacientů s delecí 6q?

Odpověď doktorandky: Jednalo se o relativní kvantifikaci exprese provedenou na jiném pracovišti, ne přímo doktorandkou, proto přesně neví. Lze dohledat, ale toto již paní docentkou nepožadováno.

V Olomouci dne 25.6.2020,

zapsala

Mgr. Helena Urbánková