

Oponentský posudek na doktorskou disertační práci RNDr. Markéty Kalinové.

Název práce: Kvantitativní detekce exprese genu WT1: prognostický význam a sledování reziduální nemoci u dětských hematologických onemocnění.

Předkládaná disertační práce RNDr. Markéty Kalinové se zabývá diagnostickým a prognostickým významem hladiny exprese genu WT1 a možnostmi jejího využití při sledování minimální reziduální nemoci (MRN) a predikci relapsu u dětí s různými typy hematologických malignit.

Zvolené téma je v současné době velmi aktuální. I přesto, že v posledních letech došlo ke značnému pokroku v léčbě dětských hematologických onemocnění, stále zůstává řada pacientů, kteří nereagují na léčbu stávajícími léčebnými protokoly nebo u nich dochází k časným či pozdním relapsům onemocnění. Proto je nutné hledat nové ukazatele, které by umožnily identifikovat pacienty s vysokým rizikem relapsu a přispěly tak ke stratifikaci jejich léčby. Podle některých autorů by takovým ukazatelem u různých typů nádorových onemocnění mohla být aberantní exprese genu WT1, jiné práce naopak její prognostický význam nepotvrdily. Již dříve bylo prokázáno, že významným nezávislým prognostickým ukazatelem u dětských leukémií je hladina reziduálních leukemických buněk po indukční terapii. Sledování kinetiky MRN v různých časových intervalech má proto teoretický i praktický význam. Umožňuje posoudit nejen infiltraci kostní dřene a periferní krve nádorovými buňkami, ale i monitorovat účinky léčby a určit remisi či nastupující relaps onemocnění. Předkládaná disertační práce si klade za cíl sledování exprese genu WT1 při diagnóze a v průběhu léčby u dětských pacientů s vybranými hematologickými onemocněními, srovnání hladin exprese WT1 genu v průběhu terapie s výsledky sledování MRN metodou průtokové cytometrie a sledování exprese WT1 a jeho význam v buňkách zdravých osob a v regenerující se kostní dřeni u pacientů po léčbě TEL/AML1+ ALL. Velmi důležitou součástí disertační práce je zavedení a standardizace metodiky sledování exprese WT1 v rámci mezinárodní studie.

V první části práce, která představuje **úvod** do problematiky, autorka na základě literárních údajů shrnuje současné poznatky o genu WT1 a potenciálním významu hladiny jeho exprese jako nádorového markeru. Samostatné kapitoly jsou věnovány jednotlivým vybraným typům hematologických onemocnění dětského věku, tj. akutní lymfoblastické leukémii (ALL), myelodysplastickému syndromu (MDS), aplastické anémii (SAA), akutní myeloidní leukémii (AML) a anaplastickému velkobuněčnému lymfomu (ALCL). Na straně 22 jsou jasně formulovány **cíle** disertační práce. V další části jsou podrobně popsány principy **metod** a postupů použitých ve studii. Metoda kvantitativní PCR, na které je práce založena představuje moderní přístup ke sledování genetických aberací v nádorových buňkách a je ve světě široce využívána v diagnostice různých typů nádorových onemocnění. Jako biologický **materiál** pro molekulárně-genetickou analýzu byly v práci použity vzorky aspirátů kostní dřene, periferní krve a pupečnickové krve.

V kapitole **Výsledky** autorka na 22 stranách podrobně informuje o zjištěných hladinách exprese WT1 genu u kontrolních vzorků a u jednotlivých skupin nemocných v době stanovení diagnózy a v průběhu léčby chemoterapií či po transplantaci hematopoetických kmenových buněk. Výsledky jsou doloženy publikacemi v renomovaných odborných časopisech, které jsou k disertaci přiloženy. Přestože výsledky studie ukazují, že hladina exprese genu WT1 má v diagnostice většiny sledovaných souborů nemocných omezený nebo diskutabilní význam,

podařilo se autorce vyjasnit řadu sporných otázek spojených s touto problematikou. Výjimku tvoří skupina dětských pacientů s AML (kromě subtypu M3), kde dosažené výsledky svědčí pro signifikantně horší prognózu u dětí, kteří při diagnóze AML exprimovali gen WT1 ve vysokých hladinách. Proto je velmi důležitá probíhající prospektivní mezinárodní studie, na které se autorka významně podílí a která má za úkol ověřit skutečný diagnostický a prognostický význam aberantní exprese genu WT1 u větší skupiny dětských AML. V případě sledování MRN u pacientů s ALCL se jedná o první významnou studii zaměřenou na detekci MRN u pacientů s tímto typem onemocnění.

K disertační práci mám jeden dotaz:

Z pohledu cytogenetika by mě zajímalo, zda jste porovnávali hladinu exprese WT1 genu v době stanovení diagnózy s karyotypem nemocných zjištěným na základě konvenční a molekulárně cytogenetické analýzy nebo jen na základě specifických fúzních genů detekovaných metodou RT-PCR. Je známo, že kromě známých specifických aberací může v leukemických buňkách vznikat i řada dalších chromosomových přestaveb, které rovněž ovlivňují prognózu nemocných. Plánujete případně něco podobného do budoucna (třeba i v rámci výše jmenované mezinárodní studie u AML)?

Disertační práce je po odborné i formální stránce velmi dobře promyšlená a pečlivě a přehledně zpracovaná. Má 46 stran textu a je doložena 147 citacemi použité literatury. Rovněž je doplněna ilustrativními obrázky, tabulkami a grafy a seznamem použitých zkratk. Nedílnou součástí disertační práce jsou odborné publikace, dokumentující a shrnující a dosažené výsledky. Jedná se celkem o 5 prací, které se zabývají sledováním exprese WT1 genu u dětských hematologických onemocnění. Tři z těchto prací vyšly nebo byly přijaty do tisku v odborných časopisech s IF, jedna byla odeslána do časopisu *British Journal of Hematology* a jedna byla publikována v recenzovaném odborném časopise vydávaném v ČR. RNDr. Kalinová je autorkou dvou těchto prací (1x Transfuze a hematologie dnes, 1x práce přijatá do *Leukemia Research*) a spoluautorkou dalších tří. Kromě toho je disertační práce doplněna přehledem další publikační činnosti autorky. RNDr. Kalinová je první autorkou (3x) nebo spoluautorkou (15x) celkem osmnácti odborných článků, které byly vydány nebo přijaty do tisku v prestižních zahraničních časopisech s IF (13x) nebo v recenzovaných časopisech vydávaných v ČR (5x). Kromě toho byla RNDr. Kalinová autorkou nebo spoluautorkou posterů presentovaných na zahraničních vědeckých konferencích (13x abstrakt v časopisech s IF – 3x autorka a 10x spoluautorka) a dále autorkou (10x) nebo spoluautorkou (1x) odborných přednášek (9x v ČR, 2x v zahraničí).

Disertační práce má vynikající úroveň, výsledky studie jsou dobře zdokumentovány. Zvolené téma je velmi aktuální s možností okamžité aplikace do klinické praxe. Použité metodiky jsou moderní a tematicky práce navazuje na současné výsledky zahraničních studií. Rovněž vysoká publikační aktivita RNDr. Kalinové prokazuje, že autorka má tvůrčí schopnosti a splňuje všechny předpoklady pro samostatnou vědeckou práci.

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

RNDr. Zuzana Zemanová, CSc.
Centrum nádorové cytogenetiky
Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky
Všeobecná fakultní nemocnice a 1.LF UK
U nemocnice 2, 128 08 Praha 2