

Vážený pan
Prof. MUDr. Jaroslav Pokorný, DrSc.
Předseda oborové rady DSP
1. LF UK Praha – děkanát
Kateřinská 32
121 08 Praha

Věc: Oponentský posudek doktorské disertační práce MUDr. Hany Votavové

V Olomouci dne 19. 4. 2011

Vážený pane profesore,
k oponentuře mi byla předložena doktorandská disertační práce **MUDr. Hany Votavové** s názvem: **Odlišení primárně mediastinálního a difúzního velkobuněčného B-lymfomu s využitím metody real – time kvantitativní polymerázové řetězové reakce.**

Práci tvoří souhrnná **úvodní část** v rozsahu 22 stran, která obsahuje popis molekulární genetiky a kliniky mediastinálního (PMBL) a difúzního velkobuněčného B-lymfomu (DLBCL). Dále jsou zde zařazeny kapitoly diagnosticky využívané metody a geny vyšetřované v předkládané práci. Teoretická úvodní část vychází z 64 literárních odkazů. Doktorandka rozebírá zejména molekulární podstatu choroby a podrobně se věnuje využití imunohistochemie a zejména RTqPCR k odlišení PMBL a DLBCL. V závěru kapitoly jsou popsány geny vyšetřované v předkládané práci – CD23 (Fcer2), Pdl2 a Blk (RTqPCR), resp. CD20, CD5, CD30, CD23, CD10, bcl6 a Mum1/Irf4 (imunohistochemie). Kapitola je celkově přehledně psaná, jako kliník bych ocenil rozsáhlejší popis morfologie, imunofenotypu, genetiky a klinických dat PMBL. Těžiště práce je však v metodách molekulární genetiky, proto zvolenou stručnost doktorandky v klinicko-patologických oblastech respektuji, na druhé straně pečlivost a rozsah zpracování oddílů o izolaci RNA a RTqPCR oceňuji. Mám však výhrady k používání termínu „genová signatura“, jelikož slovo signatura je jen prostým způsobem převzaté z anglického originálu a v českém textu je významově velmi neurčité. Podobně by se jistě daly najít

české (nebo jiné) ekvivalenty pro výrazy „enhancer“ a prognostický „prediktor“

Dále následuje oddíl **hypotézy a cíle práce**. Hypotéza je jasně a stručně formulovaná (2 tvrzení), cíle stanovené v práci (celkem 5) jsou vhodně zvolené.

Metodika je popsána detailně, důraz je kladen na popis izolace RNA z parafinových bloků, kontrolu její kvality a RTqPCR (Metody I, RNA z 8 parafinových bloků), srovnání RTqPCR a imunohistochemie při sledování vlivu nespecifického genového pozadí vzorků na výsledek měření genové exprese sledovaných genů (Metody II, 69 vzorků) a vlastního postupu při analýze genové exprese PMBL a DLBCL (Metody III, 82 pacientů, z toho 32 pacientů v testovacím setu). Statistické metody sloužící k finálnímu zhodnocení dat jsou vybrány adekvátně.

V kapitole **Výsledky I** doktorandka uvádí, že nejlepší výsledky z hlediska kvality izolace RNA z parafinového vzorku dává metoda izolace komerčním kitem. Dále autorka uvádí, že množství RNA, kdy je možné předpokládat přijatelný průběh PCR je 5700 ng na vzorek. Z hlediska reverzní transkripce byly nejlepší výsledky dosaženy pomocí reverzní transkriptázy Transcriptor (Roche). Dále jsou uvedeny výsledky detekce fluorescence pomocí jednotlivých sond a závěrem se zabývá sestavením konečného protokolu a jeho ověření. Protokol byl sestaven z nejúspěšnějších a nejefektivnějších jednotlivých kroků. Ověřen byl na detekci housekeepingových genů B2m a Rplp0 ve validačním setu. Úspěšnost vyšetření byla 95% (62/65 FFPE vzorků). 51/65 vzorků (78%) překročilo hranici minimálního množství izolované RNA pro úspěšnou PCR.

Kapitola **Výsledky II** je věnována vlivu exprese nenádorového stromatu na výsledky exprese v nádorových buňkách. Zde doktorandka zjistila, že CD10+ stroma u CD10- tumoru nezvýší expresi CD10 mRNA na takovou úroveň, jakou vykazují nádory CD10+. CD10+ nádory vykazovaly přibližně stejnou expresi mRNA CD10, a to bez ohledu na pozitivitu či negativitu stromálních buněk pozadí.

V kapitole **Výsledky III** jsou shrnuty výsledky analýzy genové exprese DLBCL a PMBL. Ve skupině PMBL byla ve srovnání s DLBCL statisticky významně

vyšší exprese genů *Fcer2*, *Pd12*, zatímco u DLBCL byla vyšší exprese *Blk*. Výsledky exprese sloužily pro následné vygenerování predikční rovnice. Pomocí ní byl dále analyzován celý soubor pacientů. Z testovacího setu 32 pacientů byly objeveny 3 případy neshody genetické predikce s očekávanou diagnózou (klinicko-patologickou). Ve 2 případech byly očekávané DLBCL geneticky klasifikovány jako PMBL, poslední případ klinicko-patologicky hodnoceného PMBL byl geneticky popsán jako DLBCL. Ve validačním setu 50 případů bylo 9 z 28 klinicko-patologicky diagnostikovaných PMBL geneticky klasifikováno jako DLBCL, kdežto všech 22 pacientů s DLBCL bylo genetickou metodou potvrzeno jako DLBCL. Celý soubor 82 pacientů byl finálně analyzován pomocí predikční rovnice. 26% pacientů s diagnózou PMBL bylo po genetické analýze spíše řazeno mezi DLBCL a naopak 5% DLBCL bylo překlasifikováno geneticky jako PMBL. Doktorandka dále uvádí korelaci klinických dat s jednotlivými podskupinami pacientů (PMBL a DLBCL), podrobně také popisuje rozdíly v klinických projevech u konkordantních a diskordantních pacientů. Analýza přežití (PFS) byla provedena ve skupině klinicko-patologicky očekávaných, tak ve skupině geneticky predikovaných diagnóz. Ve skupině geneticky predikovaných diagnóz se výsledek blížil statistické významnosti ($p=0,084$). Doktorandka dále velmi názorně srovnala výsledky genetické predikce s výsledky imunohistochemické analýzy. Ve skupině PMBL našla vyšší četnost pozitivitu *CD23* a *CD30*, podrobně dále zanalyzovala skupinu diskordantních PMBL.

Následuje kapitola **Diskuse**, která má necelé 4 strany. Zde autorka uvádí, že odlišení DLBCL a PMBL je důležité z hlediska zařazení pacientů do klinických studií, s čímž lze naprosto souhlasit. Jí nalezené počty diskordantních pacientů to jen potvrzují. Za důležité rovněž považuji zjištění, že skleróza tumor není diagnostickým kritériem PMBL a že byla nalezena až ve 33 % vzorků pacientů s DLBCL. Výsledky doktorandky jsou z hlediska algoritmu diferenciací PMBL pomocí genové exprese originální a dosud jinými skupinami nepublikované, přesto bych přivítal poněkud širší diskusi zaměřenou na problematiku diagnostiky PMBL, resp. s jejími možnými dopady na léčbu nemocných v éře imunochemoterapie.

Závěry práce jsou uvedeny v bodech, které korespondují s cíli práce. Doktorandka prokázala, že metoda analýzy genové exprese z FFPE tkáně s použitím RTqPCR je technicky možná, dává reprodučibilní výsledky, je rychlá a finančně nenáročná. Při vyšetření genové exprese z tkáňových řezů obsahujících alespoň 80% nádorových buněk je vliv nenádorového stromatu na konečný výsledek zcela minimální. Na základě genové exprese tří genů lze v rámci klinicko-patologicky stanovených PMBL odhalit cca 1/4 pacientů, kteří geneticky, klinicky i prognosticky patří spíše mezi klasické DLBCL. Tento algoritmus odlišení PMBL a DLBCL zatím ve světové literatuře publikován nebyl. V posledním bodě doktorandka doporučuje další výzkumné kroky zacílit k přímému porovnání metod RTqPCR a genových čipů.

Na konci práce je uvedena **Použitá literatura**, která čítá 64 recentních a vhodně citovaných odkazů.

Přílohou předložené disertační práce jsou 2 publikované články na téma související s disertací v renomovaných impaktovaných zahraničních periodických. Autorka shrnuje svoji vědeckou aktivitu přehledem publikací, posterů a abstrakt, ten je zařazen před vlastní práci. Z něho je zřejmé, že další článek o expresi CD10 autorka odeslala do impaktovaného časopisu, zároveň je spoluautorkou dalšího článku, který je přijat k publikaci, i když s disertační problematikou přímo nesouvisí. Doktorandka je rovněž první autorkou 2 posterů a 1 abstraktu přijatých na konferenci EHA, 1 poster (spoluautorka) byl prezentován na XV. Č-S HaT sjezdu

Předložená doktorandská disertační práce MUDr. Hany Votavové:

- a. je zvolena na aktuální téma
- b. zvolená metodika zpracování je adekvátní, přehledná a graficky pečlivě provedená
- c. práce má význam pro další rozvoj diagnostiky nemocných s ne-hodgkinskými lymfomy
- d. k předložené práci mám tyto doplňující otázky:
 1. V kapitole o metodice jsem nenalezl údaj o tom, zda všechny vybrané vzorky (řezy FFPE) obsahovaly nejméně 80% patologických buněk

lymfomového klonu (jak je uváděno v závěru). Má doktorandka tyto údaje k dispozici?

2. V diskusi autorka píše, že k odlišení podtypů DLBCL se dnes jako zlatý standard používá vyšetření na genových čípech. Myslí si doktorandka opravdu, že se jedná o standard?

3. V diskusi dále doktorandka uvádí, že prognóza PMBL a DLBCL je odlišná. Jaká má pro své tvrzení důkazy?

e. práci jednoznačně doporučuji k obhajobě podle § 47 VŠ zákona 111/98 Sb.

Doc. MUDr. Tomáš

Hematò-onkologick

Olomouci

LF UP v