

Oponentský posudek Dizertační práce

Student: MUDr. Michal Zápotocký

Pracoviště: 2. lékařská fakulta UK

Studijní program: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie

Školitel: Prof. MUDr. Jan Trka, Ph.D.

Název práce: Cílená léčba AML1-ETO pozitivní akutní myeloidní leukémie inhibitory deacetyláz histonů

Oponent: Dr. Martin Trbušek

Pracoviště: Fakultní nemocnice Brno

Interní hematologická a onkologická klinika

Centrum molekulární biologie a genové terapie

Posudek:

Dizertační práce MUDr. Michala Zápotockého se obsahově zabývá molekulárně-genetickým studiem cílené eliminace nádorových buněk, konkrétně účinkem inhibitorů deacetyláz histonů a z nich zejména kyseliny valproové na buňky AML s fúzním genem AML1-ETO. Práce je českou a z hlediska délky textu podstatně rozšířenou verzí publikace v impaktovaném časopise *Cancer Letters*. Je tedy zřejmé, že již prošla náročným oponentním řízením a její kvalita tomu také odpovídá. Celkově působí dizertace velmi dobrým dojmem a to jak po stránce obsahové, tak i po stránce formální.

Práce má 58 stran a obsahuje 155 citací (zmíněná publikace obsahuje citací 40) Toto svědčí o velmi pečlivém zpracování českého rozšířeného textu a také o velmi dobrém vhledu autora do studované problematiky. Tato dobrá orientace je patrná i v jednotlivých částech práce, které jsou nabitě fakty a souvislostmi. Autor mj. velmi přesvědčivě dokladuje některé záležitosti, které jistě nebylo lehké z metodického hlediska provést – např. mapuje vztah mezi diferenciací a apoptózou, ukazuje velmi dobrou korelaci mezi diferenciací a expresí klíčových genů apod. V celé práci jsou také pro studované jevy velmi dobře používány příslušné kontroly – např. jiné diferenciační agens v případě, že nefungovala VPA apod. Vyvozené závěry jsou tak na stěžejních místech práce relevantní.

V příloze se nachází kopie prvoautorské impaktované publikace doktoranda v prestižním časopise *Cancer Letters* s IF 4,2, která shrnuje stěžejní poznatky získané během dizertační práce. Tímto je tedy splněn základní předpoklad pro úspěšné zakončení doktorského studia. Navíc je MUDr. Zápotocký ještě spoluautorem čtyř dalších impaktovaných prací, na kterých se podílel během svého Ph.D. programu.

Celkově se dá říci, že:

a) Téma disertační práce je významné z pohledu medicínského a je velmi solidně zpracováno z pohledu molekulárně biologického, tedy co se týče použitých metodik a interpretace výsledků.

b) Cíle práce - tak jak byly stanoveny na str. 23-24 - byly splněny.

c) Celá práce působí konzistentním dojmem a přináší jasný výstup ohledně hlavní studované problematiky, tj. specifického účinku VPA na AML s přestavbou genů AML1-ETO. Práce může významně přispět k celosvětovému úsilí o personalizovanou terapii dětské AML.

K práci mám následující připomínky:

- Je škoda, že není ukázán ani jeden reálný graf z flow-cytometru s profilem buněčného cyklu po působení VPA. Zvláště proto, že výsledky se zdají být – na základě schematického grafického znázornění – velmi přesvědčivé.
- Práci by prospěly alespoň nějaké barevné obrázky. V kompletní černobílé verzi působí na čtenáře občas poněkud unavujícím dojmem.
- V práci mi vadilo velmi časté používání anglické skladby vět, zejména co se týče umístění podmětu nebo skládání několika slov v podmětu za sebe (K562 buňky byly.....namísto buňky K562 byly apod.)

K předložené dizertaci bych vznesl následující dotazy:

1) Koncentrace VPA použité pro ošetření buněčných linií i primárních blastů se zdají být velmi vysoké – 0,5 mM a 1 mM. Zejména pokud je srovnáme s koncentracemi dalších látek použitých pro diferenciaci leukemických buněk – TPA 1,62 μ M a TSA 120 nM. Nejsou tyto vysoké koncentrace VPA zavádějící – resp. dá se vyjádřit, jak odrážejí po přepočtu situaci *in vivo*, tedy koncentraci při které se VPA používá pro léčbu pacientů?

2) Práce ukazuje, že pozitivní účinek VPA na indukci buněčné smrti je z molekulárního hlediska specifický pro linii Kasumi-1, tedy VPA působí skrze fúzní gen AML1-ETO. Jak by se tedy dal vysvětlit pozitivní účinek VPA z hlediska indukce buněčné smrti na linii MV4;11, která tento fúzní gen neobsahuje?

3) Autor v práci mimo jiné velmi dobře ukazuje, že diferenciaci navozená pomocí VPA je výrazně lepší u proliferujících buněk (ve stádiu S/G2/M 68% z nich diferencovalo) než u těch v klidovém stádiu G0/G1 (29% prodělalo diferenciaci). Jak by se toto pozorování dalo příp. vysvětlit?

4) V práci je dobře ukázán účinek VPA na indukci apoptózy a to mj. i s využitím známého inhibitoru apoptózy, molekuly Z-VAD-fmk. Pozoroval autor nějaký negativní vliv tohoto samotného inhibitoru na buňky při nejvyšší použité koncentraci 100 μ M?

5) Z grafů na str. 39 i z doprovodného textu je zřejmé, že primární blasty odebrané od všech čtyř pacientů reagovaly velmi dobře – co se týče diferenciaci – na sloučeninu TPA. Používá se tato látka v léčbě pacientů?

6) V poslední části práce autor studuje období bez progresu a celkové přežití u dětských pacientů s AML a fúzním genem AML1-ETO, a to za období let 1994-2005. Zajímavé by v této souvislosti bylo srovnání se skupinou bez dotyčného fúzního genu? Jak by zhruba toto srovnání z hlediska EFS a OS dopadlo?

7) V samém závěru Diskuze je zmíněno, že pacienti s fúzním genem AML1-ETO nebudou nejspíše bohužel zařazeni do mezinárodní studie sledující účinek VPA v kombinaci

s chemoterapií. Jaký je k tomuto důvod, když např. tato práce jasně dokladuje, že zrovna tito pacienti by mohli mít z uvedené terapie profit?

Celkově se dá shrnout, že doktorand velmi dobře prokázal schopnost samostatné a tvůrčí vědecké práce. Předložená práce splňuje všechny požadavky kladené na disertační práci v daném oboru a doporučuji ji tedy k obhajobě.

V Brně dne 16. 9. 2013