

## Posudek oponenta habilitační práce

<b>Universita Karlova</b>	Lékařská fakulta v Hradci Králové
<b>Obor řízení</b>	Vnitřní lékařství
<b>Uchazeč</b>	<i>MUDr. Darina Kohoutová, Ph.D.</i>
<b>Pracoviště uchazeče</b>	II. interní klinika gastroenterologická LFUK a FN Hradec Králové
<b>Habilitační práce(název)</b>	<i>Změny mitózy a apoptózy u kolorektálních neoplázií</i>
<b>Oponent</b>	Prof. MUDr. Jiří Ehrmann, CSc.
<b>Pracoviště oponenta</b>	II. interní klinika-gastro-enterologická a hepatologická LF UP a FN Olomouc

### Text posudku

#### **Rozsah práce a dokumentace:**

Předložená habilitační práce je napsaná na 93 stranách. Součástí práce je i 5 in extenso článků, vztahujících se k tématu habilitační práce, publikovaných v časopisech s IF. Práce je členěna klasicky tj. literární přehled současné problematiky na stranách 4-29, cíle práce jsou uvedeny na straně 29, výsledky tj. stanovení míry mitotické a apoptotické aktivity epiteliálních buněk sliznice tlustého střeva u pacientů s kolorektálními neoplaziemi včetně diskuze a závěrů jsou na stranách 30 až 71. Literárních odkazů je 209. Jsou recentní a odrážejí dramatický vývoj studované problematiky. Ve 29 případech jsou citováni naši autoři, z toho 9krát je autorka habilitace coby první autor citovaných prací. Už jen literární odkazy jsou odrazem systematického vědeckého zájmu MUDr. Kohoutové o danou problematiku, který vyústil napsáním habilitační práce a publikacemi v impaktovaných časopisech. Text habilitační práce je napsán kultivovaným, čtivým jazykem. Vůbec celá práce má kromě vědecké hodnoty i výbornou edukační úroveň. V práci jsou 3 tabulky, 31 barevných obrázků (endoskopických a histologických nálezů ev. dalších) a 14 grafů s výsledky studie. Všechny vhodně doplňují text.

#### **Cíle práce:**

1. zavedení metodiky a vyšetření míry mitózy a apoptózy sliznice tlustého střeva u nemocných s nepokročilým a pokročilým kolorektálním adenomem, dále u osob s kolorektálním karcinomem (CRC) a u osob s normálním nálezem při koloskopii a negativní osobní anamnézou kolorektální neoplazie a IBD (kontrolní skupina).

2. zjistit, zda stupeň mitózy a apoptózy v oblasti kolorektální patologie je ve vztahu k histologickému nálezu.
3. zjistit, zda míra mitózy a apoptózy zdravé sliznice kolem kolorektální patologie je stejná nebo odlišná ve srovnání se sliznicí kontrolní skupiny.
4. zjistit, zda lokalizace kolorektální patologie má vliv na míru mitózy a apoptózy.
5. predikovat případné klinické konsekvence – progrese CRC- ovlivněním apoptózy.

#### **Zpracování tématu s ohledem na dosavadní stav dané problematiky:**

Nejdůležitějším prognostickým faktorem 5letého přežívání nemocných CRC je stadium, ve kterém byla nemoc diagnostikovaná. Ve vývoji kolorektálního adenomu a karcinomu hraje klíčovou roli dysregulace v procesu proliferace, diferenciaci a apoptózy kolorektálních slizničních buněk. Postihnout tyto změny již v iničiálním stadiu může mít význam nejen v časné diagnostice kolorektální patologie, ale jejich ovlivněním i v léčbě. Dnes užívaná molekulárně genetická vyšetření poruchy signálních drah receptorové funkce (např. TP53 nebo APC) nebo detekce chromozomální či mikrosatelitní nestability nebo defektů na basi DNA metylace se týkají zejména patologie buněčné proliferace a diferenciaci. Proces apoptózy je poměrně nový. Autorka habilitační práce sice uvádí, že alteraci proliferace a i apoptózy u adenomů a karcinomů kolorekta zkoumaly vědecké týmy již v 90. letech minulého století (Sträter 1995, Weiss 1996, Kikuchi 1997), nicméně originalita této práce (ve světové literatuře nejsou k dispozici informace) je v tom, že stanovuje mitotickou a apoptickou aktivitu ve vztahu k současně platné definici pokročilosti změn v jednotlivých stadiích sporadické kolorektální neoplazie. Z tohoto pohledu řeší předložená habilitační práce aktuální problematiku gastroonkologie a je nejen u nás originální.

#### **Kvalita dosažených výsledků a jejich rozbor v porovnání se současným stavem znalostí:**

##### Metodika:

Mitotická a apoptotická aktivita byla stanovena ve třech kompartmentech krypt sliznice kolorekta, tj. dolním, horním a superficiálním v biotického vzorku odebraného z rekta 17 jedinců s normálním koloskopickým nálezem, 18 pacientů s nepokročilým kolorektálním adenomem – biotický materiál byl odebrán přímo z neoplazie a dále ze zdravé sliznice 10 cm od neoplazie. Totéž bylo provedeno u 13 pacientů s pokročilým kolorektálním adenomem a u 13 pacientů s kolorektálním karcinomem. Vzorky po rychlém zpracování byly následně obarveny hematoxylin-eosinem a byl v nich stanoven apoptotický a mitotický index (počet apoptotických bb. resp. mitotických figur x 100/množství hodnocených buněk) a to ve všech třech kompartmentech. V každém bylo hodnoceno minimálně 750 buněk. Apoptotická aktivita byla dále hodnocena imunohistochemicky detekcí štěpené kaspázy-3, nicméně pro falešnou pozitivitu v okrajových oblastech byla aktivita hodnocena jen v horním a dolním kompartmentu ve vzorcích dostatečně velkých.

Klinická část, tj. výběr nemocných, odběr biopsií a klinické vyšetření byly provedeny na II. Interní gastroenterologické klinice LF UK a FN Hradec Králové, měření apoptotické a mitotické aktivity bylo provedeno na Fakultě vojenského zdravotnictví v Hradci Králové. Statistické zpracování velkého množství dat bylo pomocí softwaru Statistika resp. Mann-Whitneyova testu.

Výsledky jsou v habilitační práci vyjádřeny jednak slovně ale hlavně ve 14 přehledných grafech,

#### Výsledky:

Ve vzorcích sliznice zdravých osob byla pozorovaná mitotická a částečně i apoptotická aktivita v dolní - basální části krypt, v horní části krypt aktivity obou klesly na téměř nulové hodnoty, ale v povrchovém – superficiálním kompartmentu byl patrný opět nárůst aktivity apoptotické.

Přeměna zdravé sliznice v nepokročilý adenom byla signifikantně provázená zvýšenou apoptotickou aktivitou ve všech třech kompartmentech, zejména v horním. Zvýšená mitotická aktivita byla ve srovnání se zdravou sliznicí nalezena v dolním a horním kompartmentu, nikoliv superficiálním.

Transformace nepokročilého adenomu v pokročilý nebyla provázená dalším navýšením apoptotické aktivity, došlo ale k signifikantnímu dalšímu nárůstu mitotické aktivity v horním ale také superficiálním kompartmentu.

Statisticky významný pokles apoptotické aktivity ve všech kompartmentech byl prokázán ve vzorcích z CRC ve srovnání a apoptotickou aktivitou u pokročilého adenomu.

Při porovnání mitotické a apoptotické aktivity vzorků ze zdravé sliznice pacientů s neoplazii se sliznicí rektu zdravých osob nebyly nalezeny žádné rozdíly v žádném kompartmentu.

Lokalizace neoplazie tj. levé kolon / pravé kolo (rektum, c. sigmoideum, c. descendens / cékum, c. ascendens, c. transversum) neměla vliv na míru změn apoptotické resp. mitotické aktivity vliv.

Imunohistochemická detekce aktivované kaspázy-3 prokázala nárůst apoptotické aktivity v horní části krypt během transformace zdravé sliznice v nepokročilý a v pokročilý adenom.

Práce potvrdila, že míra mitotické a apoptotické aktivity v jednotlivých kompartmentech kolorektální neoplasie závisí na histologickém profilu patologie.

#### **Vyhodnocení použitých metod a postupů a zhodnocení kvality práce:**

Jde o nadstandardně kvalitní habilitační práci na aktuální téma gastroonkologie jejíž výsledky jsou originální, v dostupné literatuře zatím nepublikované. Byla zavedena metodika a stanovení míry apoptotické a mitotické aktivity buněk kolorektální sliznice v jednotlivých kompartmentech slizničních krypt a hodnocena ve vztahu k histologickému profilu patologie tj. nepokročilému a pokročilému adenomu a KRC v srovnání se sliznicí zdravých osob. Z řady pozoruhodných výsledků je zvláště významné, že při transformaci zdravé sliznice v adenom nepokročilý či pokročilý došlo k zvýšení apoptotické aktivity v rozsahu celé krypty a mitotické aktivity hlavně v basální její části. Při transformaci pokročilého adenomu v CRC byl prokázán naopak pokles apoptotické aktivity ve všech částech krypt. Mitotická a apoptotická aktivita ve sliznici z okolí neoplazii se nelišila od aktivity v rektální sliznici zdravých osob. Autorka habilitace dedukuje, že jedním z cílů převedení poznatků do praxe by mohlo být ovlivnění např. poklesu apoptotické aktivity při transformaci adenomu do CRC.

Součástí práce jsou rovněž články v časopisech s IF zejména: *Kohoutová D. et al: Anti-Outer membrane protein C and anti-glycoprotein 2 antibodies in inflammatory bowel diseases and their association with complicated forms of Crohn's disease. BMC Gastroent 2014.* *Kohoutová D et al. Importance of correct colorectal cancer screening timing in the average-risk Czech population. Abdom Oncol 2013.* *Kohoutová D et al. Escherichia coli strains of*

*phylogenetic group B2 and D and bacteriocin production are associated with advanced colorectal neoplasia. BMC Infect Diseases 2014; Kohoutová D et al. Anti-Outer membrane protein C antibodies in colorectal neoplasia. Fol Microbiol. 2015. Moravkova P, Kohoutova D et al. Role of S100 protein in colorectal carcinogenesis. Gastroent Res Pract 2016.*

Metodika a statistické zpracování splňují všechna kritéria pro plauzibilitu studie.

Velmi hodnotnou součástí práce je literární přehled současné problematiky. Zejména kapitoly týkající se vývoje sporadického kolorektálního karcinomu a apoptózy (programované sebevraždě buněk) koncizně zpracované jsou ukázkou edukační dovednosti autorky habilitační práce.

### **Dotazy oponenta k obhajobě habilitační práce**

*Připomínky* technické ani věcné nemám. Mám však na autorku tyto dotazy.

- a. Numerické stanovení mitotické a apoptotické aktivity je hlavně časově ale i z hlediska personální erudice náročné. Jsou na obzoru jiné metody této detekce.
- b. V kapitole 1.6.8 Efekt žlučových kyselin na apoptózu buněk sliznice tlustého střeva je mimo ostatní uveden odkaz na práce McMillana, že kyselina ursodeoxycholová, řazená k sekundárním žlučovým kyselinám, vedla k aktivaci isoenzymu PKC- $\delta$ , a tedy působí anti-apoptoticky. Při uvážení časté medikace tohoto léku v praxi bych rád znal stanovisko autorky habilitace k této otázce.
- c. Již v 70. letech minulého století byl v souvislosti s nárůstem CRC intenzivní výzkum časné diagnostiky malignizace kolorektální neoplazie a metody byly různé. Například u nás Šetka s spol. již v roce 1974 (Čs. Gastroent. 28) a pak v roce 1986 (Rozhledy v chirurgii 65) publikují zkušenosti s měřením impedance v rektu endoskopickou cestou k odlišení stupně malignizace resp. diagnostiku zhoubných onemocnění GIT. Vycházelo z úvahy, že probíhající biologické změny ve tkáni mění současně i její biofyzikální vlastnosti, tedy i elektrické. Je v této oblasti něco nového?

### **Závěr**

Habilitační práce **MUDr. Dariny Kohoutové, Ph.D. Změny mitózy a apoptózy u kolorektálních neoplazií** splňuje požadavky standardně kladené na habilitační práce v oboru vnitřní nemoci.

V Olomouci dne 20. 4. 2017

.....  
podp

