

Oponentský posudek na disertační práci

**MUDr. Jana Boučka**

Tema : Imunobiologické aspekty spinocelulárních karcinomů  
v oblasti hlavy a krku (HNSCC)

1.LF UK Studijní program : Biologie a patologie buňky

Doktorská disertační práce MUDr. Jana Boučky je zpracována klasickým postupem doktorské práce, tj. v první části se autor zabývá přehledem problematiky vzniku nádorových onemocnění z celosvětového hlediska, výčtem všech prokázaných faktorů, které se na vzniku nádorového onemocnění podílí a uvádí stručný aktuální přehled o výskytu a frekvenci nádorových chorob v celosvětovém měřítku. Druhá část předložené práce je zaměřena na podrobný rozbor problematiky nádorů ORL oblasti, jmenovitě spinocelulárních karcinomů hlavy a krku.

Dizertační práce má 77 stran textu, citací 273, 6 barevných obrázků, 1 tabulku a přehled vlastní publikační aktivity s kompletním textem šesti nejvýznamnějších odpublikovaných studií

Vlastní problematika týkající se imunobiologických aspektů spinocelulárních karcinomů v oblasti hlavy a krku je probírána v jednotlivých kapitolách – se zdůrazněním role infekce lidským papilomavirem (HPV).

Nejvíce podrobných informací přináší autor v přehledu o současných znalostech mikroprostředí nádoru, významu stromálních elementů, makrofágů, T lymfocytů a jejich podtypů se zaměřením zejména na T regulační lymfocyty.

Progrese nádorového bujení je výrazně závislá na mikroprostředí, kde se uplatňují nejen elementy stromatu, zejména fibroblasty, ale především imunokompetentní buňky různých subtypů T lymfocytů, makrofágy a řada cytokinů.

Autor disertační práce věnoval nejvíce pozornosti především těmto aspektům :

Buněčnému substrátu nádorového mikroprostředí, intracelulárnímu jadérovému proteinu – nukleostemínu, nukleární přítomnosti adhezních/růstových regulačních galektinů v normálních a maligních buňkách dlaždicového epitelu, významu struktury postranních řetězců v HPMA polymerních léčivech vázajících doxorubicin.

Ve studii týkající se významu mikroprostředí věnoval pozornost především fenotypickým změnám zdravých keratinocytů kokultivovaných s nádorovými fibroblasty bez přítomnosti nádorových buněk. Pozoruhodným nálezem bylo zjištění, že stromální nádorové fibroblasty indukují v normálních keratinocytech tvorbu keratinu 8 a 19 a jadérový protein nukleostemin – což jsou znaky asociované s nádorovou přeměnou, kdy jejich zvýšená exprese koreluje s horší prognózou. Za prioritní uvádějí autoři této studie, na které participoval i Dr Boučka, zjištění, že stromální nádorové fibroblasty jsou schopny ovlivnit fenotyp normálních epitelálních buněk aniž by muselo docházet k jejich vzájemnému kontaktu.

Na tuto studii navazuje další pozorování týkající se nukleostemínu, jehož přítomnost je univerzální v jadérech kmenových buněk dlaždicového epitelu orofaryngu a hrtanu, ale i v buňkách spinocelulárního nádoru i jiných. Imunohistochemickými metodami byla prokázána signifikantně vyšší exprese v maligních buňkách (vzorky karcinomů, tkáňová linie FaDu buňky propagované jak *in vitro* tak *in vivo*). Autoři se domnívají, že by bylo vhodné zařadit přítomnost nukleostemínu v jadérech jako jeden z markerů diferenciací nádoru a jeho biologické povahy – znamená vyšší malignitu a agresivitu.

Další studie týkající se mikroprostředí – především regulace buněčných aktivit jako jsou růst, adheze, migrace je zatím jen okrajovým zaměřením vhodným k dalším experimentálním studiím. Předmětem zájmu byly galektiny, jejichž expresní profil a jejich vazebná místa u různých typů buněk v různých stadiích diferenciaci může pomocí imunohistochemických metod určit závislost lokalizace s růstovou aktivitou.

Mimo tyto studie, na kterých autor dizerační práce spolupracoval prezentuje především vlastní klinickou studii na souboru nemocných nádory karcinomu krku a hlavy s cílem zjistit, zda je možné současnými poměrně levnými a jednoduchými metodami odhalit prognostické markery, které by mohly předurčit rozsah a délku protinádorové léčby

Vlastní klinická studie byla publikována v r. 2010 v J Cell Mol Med pod názvem Regulatory T cells and their prognostic value for patients with squamous cell carcinoma of the head and neck.

Do studie bylo zařazeno celkem 112 nemocných nádory HNSCC s diferenciací G1 (25% vyšetřených), nemocných řazených dle nádorové diferenciaci G2, ale i G3-4 bylo po 39%, T stage převážně 35%, postižení uzlin převážně N2 (nodal status). Nemocným byla odebrána periferní krev na laboratorní vyšetření, komplexní zpracování výsledků bylo provedeno po jednom roce sledování a léčby.

Vyšetření se soustředilo na běžně prováděné laboratorní testy uznávané jako prognosticky cenné tj. CRP, KO – jmenovitě Hb, AAT, nádorové markery CEA, Cyfra 21-1.

Z imunologických testů pak autor dizertace doplnil o imunoglobuliny a především populace a subpopulace lymfocytů (CD3+, CD4+, CD4+CD25+, CD8, CD4/CD8, CD14+, CD19+, CD56+, CD45+, CD4+CD45RA, CD3CD56). Tato fenotypizace je v současné době běžně dostupná ve všech akreditovaných imunologicky orientovaných laboratořích a nejsou finančně nedostupné.

Studie prokázala ve shodě s literárními údaji odchylky v mnoha parametrech – týkaly se absolutního počtu i procentuálního zastoupení CD4, CD8 lymfocytů, NK buněk a snížení B lymfocytů. Typickým statisticky signifikantním zjištěním bylo zvýšení Treg buněk (konkrétně CD4+ CD25 pozitivních) ve srovnání se zdravými kontrolami. Zvýšení této subpopulace bylo nápadné zejména u těch nemocných, kteří měli časné recidivy onemocnění v průběhu prvního roku po ukončení léčby tj. byla zjištěna přímá korelace zvýšeného počtu Treg buněk s progresí onemocnění.

Tento náález je zatím jedinečný a naznačuje možnost určení prognózy onemocnění již po prvním vyšetření, může pomoci při rozhodování o volbě terapie a pokud se dalším pozorováním potvrdí, byl by i měřítkem pro častější a kratší kontroly v dispenzarizačním sledování.

V diskusi o významu a příčině takto vysokých hodnot Treg buněk u spinocelulárních nádorů hlavy a krku ( u jiných malignit zatím nebylo popsáno tak jednoznačné zvýšení) se autor dizertace zamýšlí nad některými známými fakty, zejména o supresivním působení Treg buněk obecně a u nádorových chorob. Vyšší hodnoty Treg buněk nebyly závislé ani na T stage ani na diferenciacním stadiu – G1,2,3 a 4. Ve shodě s literárními údaji dizertant prokázal, že hladiny SCC, CRP, Cyfra 21-1 korelují s T stadiem, zatímco Cyfra 21-1 a CRP s postižením uzlin nádorovým bujením. Pozitivní korelaci vykazuje procento naivních T lymfocytů s T stadiem nádoru. Zjištěná fakta jsou ve shodě se zatím nečetnými sděleními v literatuře, které se týkají HNSCC.

K autorovi dizertační práce mám několik dotazů :

1. Byli nemocní vyšetřeni na přítomnost infekce HPV ? Pokud ano, byl sledován rozdíl v progresi onemocnění nebo rezistenci na léčbu?
2. Ve studii se prokázalo snížení B lymfocytů – zjistili jste, zda u nemocných byly také sníženy imunoglobuliny ?

3. Patří vyšetření, která jste ve studii prováděli, již k rutinním vyšetřením před zahájením terapie na Vašem pracovišti ?

Provedenou studii oceňuji, patří mezi ojediněle komplexní nejen v rozsahu vyšetřovaných imunobiologických parametrů, ale především i počtem vyšetřených nemocných, precizně definovaných a vzájemně srovnatelných skupin.

Dizertační doktorskou práci MUDr. J. Boučka považuji za vynikající, interpretace výsledků z diskuse publikované práce je na vysoké odborné úrovni, znalosti a přehled, který ve své dizertační práci prezentuje, shledávám za odborně kvalifikovaný a na úrovni akademického pracovníka.

MUDr. Jaroslav Boučka ve svých publikacích dosáhl celkového IF 23,4, citován 91 x a H index je 6.

Udělení titulu PhD podle mého názoru MUDr. J. Boučkovi plně náleží a doporučuji komisi jeho udělení a přijetí jeho dizertační studie jako práce doktorské.

V Praze 15.7.2011

prof. MUDr. Terezie Fučíková DrSc.  
oponent

