

OPONENTSKÝ POSUDEK DIZERTAČNÍ PRÁCE

Autor: **MUDr. Eva Lukešová**

Pracoviště: Univerzita Karlova v Praze, 1. Lékařská fakulta, Klinika otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku, Fakultní nemocnice v Motole, Ústav hematologie a krevní transfúze, oddělení experimentální virologie

Studijní obor: Biomedicína

Studijní program: Experimentální chirurgie

Název práce: **Imunofenotypizace pacientů s HPV-asociovanými a neasociovanými karcinomy hlavy a krku**

Školitelé: Prof. MUDr. Jan Klozar, CSc., RNDr. Ruth Tachezy, Ph.D.

Předkládaná dizertační práce byla vypracována na Klinice otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku, 1. LF UK a FN v Praze-Motole a na oddělení experimentální virologie Ústavu hematologie a krevní transfúze v Praze pod vedením školitelů Prof. MUDr. Jana Klozara, CSc. a RNDr. Ruth Tachezy, Ph.D. Práce byla podpořena grantovým projektem IGA MZ ČR NT 12483 a 11542, což dokládá aktuálnost řešeného tématu. Mnohaleté zaměření obou pracovišť na problematiku karcinomu hlavy a krku a na studium úlohy lidských papilomavirů (HPV) v etiopatogenezi lidských nádorů bylo dostatečnou zárukou všestranné připravenosti zvolené téma úspěšně řešit.

Volba a aktuálnost tématu

Dizertační práce zahrnuje tři hlavní tematické okruhy: 1) studium prognostického významu HPV u karcinomů hlavy a krku, včetně porovnání různých metodik detekce HPV, 2) studium změn v imunitním systému u nemocných s karcinomy hlavy a krku a 3) studium virologického a imunologického faktoru ve vztahu k prognóze nemocných.

Zaměření výzkumu na doposud velmi málo známé změny imunitního systému u nemocných s karcinomem hlavy a krku a zjišťování jejich souvislosti s HPV statutem nádorového onemocnění je mimořádně vhodné a velmi aktuální. Z tohoto hlediska je volbu tématu dizertační práce nutné jednoznačně ocenit.

Formální úprava disertační práce

Dizertační práce má celkem 95 stran textu, včetně obsáhlého výčtu použité literatury zahrnujícího celkem 206 recentních citací, což ukazuje na výbornou orientaci uchazečky v dané problematice. Součástí práce je rovněž 7 přehledných tabulek a 15, resp. 24 obrázků umístěných přímo do vlastního textu. Samostatnou kapitolou disertačního spisu (kap. 8) je seznam publikací in extenso (10 publikací, z toho 3 s impakt faktorem k tématu dizertace, z toho 1x uchazečka jako první autor) a 3 plnotextové reprinty publikací s impakt faktorem k tématu dizertace.

Práce je členěna standardním způsobem do sedmi logicky navazujících kapitol a je velmi čtivě napsána jazykem vysoké úrovně, jemuž jsou bohužel na škodu četné překlepy, kterých si oponent všiml celkem 29x (mj. i v „identifikačním záznamu“) a kterých bylo lze se v době možnosti automatických oprav v textových editorech snadno vyvarovat. Jako samostatnou kapitolu bylo možné zařadit seznam tabulek a obrázků, spolu s odkazem na příslušnou stránku. Celkové grafické uspořádání práce je zdařilé.

Úvod

V obsáhlé úvodní kapitole, které je věnováno 36 stran a která je členěna do 19 podkapitol, autorka seznamuje čtenáře s dosud známými poznatky o studované problematice. Celkové zpracování této kapitoly je i přes uvedení značného množství dílčích poznatků koncise a uvádí čtenáře srozumitelným způsobem do řešeného tématu.

V této kapitole lze autorku upozornit na dva drobné nedostatky:

1. Tvzení, že „karcinom děložního hrdla je ve 100 % etiologicky spjatý s infekcí HPV“, jak je uvedeno na s. 10, je zavádějící. V dalších částech úvodní kapitoly (např. na s. 32 a s. 36) se však již tato nepřesnost nevyskytuje.

2. Termín „děložní krček“ (s. 10) se nepoužívá. Lépe děložní hrdlo, event. děložní čípek.

Cíle studie

Šest cílů disertační práce je jasně formulovaných a výsledky práce shrnuté v kapitole „Závěr“ dokazují, že stanovené cíle byly splněny a že celá dizertace splnila svůj účel.

Materiál a metodika

Této kapitole je věnováno 11 stran textu, počínaje charakteristikou studovaného souboru čítajícího nejprve 60 a posléze 110 nemocných. Následuje popis odběru materiálu, popis použitých metod zjišťování HPV statusu v nádorové tkáni, popis průtokové cytometrie

a výčet metod užitých při statistickém zpracování výsledků. Použité metody byly zvoleny vzhledem ke stanoveným cílům dizertace adekvátně.

K této kapitole mám následující připomínky:

3. Obecný komentář

V rámci jednotlivých metod jsou výrazné rozdíly v detailnosti jejich popisu. Zatímco popis detekce HPV v nádorové tkáni je velmi precizní a lze jej považovat za detailní pracovní postup, tak popis imunohistochemické detekce proteinu p16 je načrtnut pouze v hrubých obrysech (viz níže).

Z charakteru jednotlivých použitých metod vyplývá, že jejich provedení a hodnocení výsledků přinejmenším některých z nich bylo prováděno ve spolupráci s pracovníky z příslušných pracovišť, což není explicitně uvedeno.

ad oddíl 3.1.

3.1.1 Není explicitně uvedeno, zda studie byla koncipována jako retrospektivní či prospektivní. Že se jedná o prospektivní studii je uvedeno až v oddílu „Diskuze“ na s. 77.

3.1.2. Bylo vhodné jednoznačně uvést, že byly studovány „dlaždicobuněčné“ karcinomy.

3.1.3. Není jasné, podle jakých kritérií byli pacienti zařazováni do studie. Jednalo se o všechny nemocné s uvedenou diagnózou, kteří byli v daném období operováni, nebo např. jen o ty, kteří souhlasili se zařazením do studie, nebo byl klíč úplně jiný?

3.1.4. Soubor diagnóz je z topograficko-anatomického hlediska heterogenní. Bylo by lépe se zabývat pouze jednou konkrétní diagnózou, např. karcinomem orofaryngu. O biologickém chování karcinomů hlavy a krku rozhodují i jiné parametry než jen HPV status a karcinomy dutiny ústní, orofaryngu a např. hrtanu se jistě budou chovat poněkud odlišně, i když všechny budou HPV-negativní.

3.1.5. Chybí detailní popis „základních demografických údajů“ a „klinicko-patologických charakteristik“, které byly u každého případu zaznamenávány a které jsou uváděny ve výsledcích. Pokud byly tyto údaje zjišťovány pomocí dotazníků či strukturovaných formulářů, pak bylo velmi vhodné tyto formuláře zařadit do dizertačního spisu.

ad oddíl 3.2

Není přesně uvedeno, kdy byla odebírána krev nemocným (v době stanovení diagnózy?, těsně před operací?, v průběhu operace?).

ad oddíl 3.2.5

Popis metodiky imunohistochemické detekce exprese proteinu p16 je nedostatečný a kontrastuje s precizním popisem PCR metod. Navíc je popis hodnocení exprese proteinu p16 nepřesný až zavádějící.

ad oddíl 3.2.6

Není dostatečně vysvětleno, proč byly za cut-off považovány nejdříve hodnoty $> 10 \%$, pak $5,2 \%$ a posléze $4,2 \%$.

Výsledky, diskuze a závěr

Výsledkům, diskuzi a závěru je věnováno 34 stran disertačního spisu.

Kapitola „Výsledky“ je přehledně členěna do podkapitol popisujících dosažené výsledky, doplněné přehlednými tabulkami a obrázky. Kromě deskriptivních výsledků jsou uvedeny i výsledky statického zpracování.

K této kapitole mám následující poznámky:

ad oddíl 4.1

1. U některých parametrů, např. věk, chybí podrobnější statistické charakteristiky, např. medián, rozmezí apod.
2. Proč bylo kouření hodnoceno odlišně ve skupině pacientů (současný kuřák – bývalý kuřák – nekuřák) a ve skupině kontrol (kuřák – nekuřák)?
3. V tabulce 2a nesouhlasí celkové počty pacientů ($n = 110$) u parametru kouření ($n = 108$), alkohol ($n = 103$), velikost nádoru ($n = 107$), uzlinové postižení ($n = 108$) a diferenciacie nádoru ($n = 106$)!
4. V tabulce 2b nesouhlasí celkový počet kontrol ($n = 52$) u parametru kouření ($n = 46$)!
5. Součty procent v tabulkách 2a a 2b nedávají 100% .

ad oddíl 4.2

1. Údaj o častější HPV-pozitivitě karcinomů orofaryngu oproti karcinomům dutiny ústní je jistě ovlivněn velmi rozdílným počtem vyšetřovaných případů (81 karcinomů orofaryngu oproti 16 karcinomům dutiny ústní).
2. Výsledky PCR metod použitých k detekci HPV bylo lze doložit obrazovou dokumentací.

ad oddíl 4.3

1. Výsledky hodnocení exprese proteinu p16 jsou popsány nedostatečně. Chybí např. tabulka, ve které by byly uvedeny procentuální počty pozitivních buněk, příp. intenzita exprese, která se také hodnotila. Příklady různé exprese proteinu p16 bylo velmi vhodné doložit obrazovou dokumentací. Dle současných doporučení se za p16-pozitivitu v dlaždicobuněčné karcinomu hlavy a krku považuje silná difúzní exprese ve více než 70% nádorových buněk. Hodnoty diagnostické shody, senzitivity a specificity je proto třeba pokládat přinejlepším za orientační.

ad oddíl 4.4

1. V tabulce 3 je místo znaku „<“ prázdné místo (4x).

ad oddíl 4.6

1. U parametru doba sledování chybí další statistické údaje, např. medián, rozmezí apod.

V kapitole „Diskuze“ autorka podrobně rozebírá vlastní dosažené výsledky a konfrontuje je s dosud publikovanými závěry jiných studií. Tato část dizertační práce svědčí o velmi dobré orientaci autorky v dané problematice a o schopnosti získané poznatky kriticky hodnotit. Autorka si je rovněž vědoma nutnosti získané výsledky dále ověřit budoucím výzkumem.

V kapitole „Závěry“ jsou stručně a výstižně uvedeny nejdůležitější výsledky dizertační práce, z nichž za nejvýznamnější lze považovat níže uvedené. Dle názoru oponenta je závěr č. 2 vzhledem k výše uvedeným námitkám k metodice sporný.

1. HPV je prognosticky významným faktorem pro DSS u pacientů s karcinomy hlavy a krku.
2. Detekci markeru aktivní virové infekce - HPV 16 E6 mRNA nelze nahradit kombinací markerů HPV 16 DNA + p16, především ne u karcinomů jiné, než orofaryngeální lokalizace.
3. Zastoupení jednotlivých lymfocytárních subpopulací v periferní krvi se liší u pacientů s karcinomem hlavy a krku a u zdravých jedinců.
4. U pacientů s HPV-asociovanými karcinomy hlavy a krku byly v periferní krvi detekovány zvýšené hladiny CD3- CD56+ CD16+ NK buněk, CD8+ T lymfocytů a součet CD4+ CD8+ T lymfocytů.
5. Lepší prognózu měli pacienti s HPV-asociovanými karcinomy a s vyšší hladinou CD4+ CD25+Treg v periferní krvi ve srovnání s pacienty s HPV-neasociovanými karcinomy a nižší hladinou CD4+ CD25+Treg v periferní krvi.

Otázky pro uchazečku

1. Na základě jakých údajů byly nastaveny hodnoty cut-off při hodnocení jednotlivých lymfocytárních populací při průtokové cytometrii?
2. Jak lze vysvětlit „protichůdné“ nálezy mezi skupinou pacientů a kontrolní skupinou v parametrech (CD4+ CD25+ Treg) a (CD4+ CD25+ FoxP3 Treg)?
3. Je z literatury známo, zda byly u karcinomů hlavy a krku, příp. u jiných zhoubných nádorů, zjišťovány počty/hladiny jednotlivých buněk imunitního systému současně v nádorové tkáni, v okolí nádoru a v periferní krvi a vzájemně korelovány? S jakými výsledky?
4. Jsou z literatury známy údaje o změně hladin jednotlivých typů buněk imunitního systému u nemocných se zhoubnými nádory po ukončení léčby v průběhu doby sledování? Dala by se jejich případná změna využít ke včasné diagnostice lokoregionální či vzdálené recidivy onemocnění?

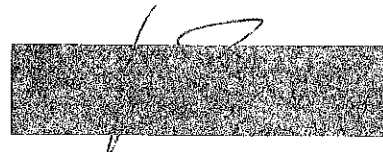
Celkové zhodnocení

MUDr. Eva Lukešová předložila pečlivě vypracovanou dizertační práci, která navazuje na recentní výzkum v oblasti dlaždicobuněčného karcinomu hlavy a krku a která významně přispívá k hlubšímu pochopení biologických vlastností tohoto typu zhoubného nádoru. Zvláště je třeba ocenit výsledky korelace HPV statusu s výsledky imunofenotypizačního vyšetření buněk imunitního systému v periferní krvi, z nichž některé jsou prioritní a ze kterých vyplývá, že některé markery by mohly být v budoucnu využity jako prognostické, příp. prediktivní faktory v léčbě.

Autorka prokázala hluboké znalosti studované problematiky a jí vytčené cíle dizertační práce byly splněny, a to i přes výše zmíněné dílčí limitace studie metodického charakteru. Předpokladem úspěchu bylo rovněž obdivuhodné zvládnutí velkého počtu metodicky náročných postupů.

Autorka osvědčila své schopnosti samostatně vědecky pracovat, kriticky hodnotit dosažené výsledky a prezentovat je formou publikací. Lze předpokládat, že uchazečka bude v započaté práci nadále úspěšně pokračovat.

MUDr. Eva Lukešová jednoznačně splnila všechny požadavky kladené na dizertační práci stanovené podle § 47 Zákona o vysokých školách č. 111/98 Sb. Doporučuji, aby jí byl, na základě úspěšné obhajoby, udělen akademický titul doktor ve zkratce Ph.D.



Doc. MUDr. Jan Laco, Ph.D.

V Hradci Králové, 10. listopadu 2014

