

Oponentský posudek disertační práce

Název práce: Význam kmenových buněk v patogenezi spinocelulárního karcinomu dutiny ústní

Autor práce: MUDr. Michal Krump

Předložená disertační práce je věnována zhodnocení významu kmenových tumorózních buněk při patogenezi spinocelulárního karcinomu dutiny ústní. **Téma** disertační práce je **aktuální** v rámci četnosti a morbiditě tohoto onemocnění. Vzhledem ke studijnímu oboru, kterým je patologická anatomie, se práce zabývá imunohistochemickým vyhodnocení sledovaných markerů.

Za **cíl práce** si autor klade imunohistochemicky detekovat expresi markerů nádorových kmenových buněk a analyzovat ji ve vztahu k anatomické lokalizaci, objemu a diferenciaci tumoru.

Disertační práce se skládá z úvodu, čtyř hlavních kapitol a použité literatury. Doplnkem práce je seznam použitých zkratk a kompletní kopie publikací autora, které se vztahují k danému tématu.

V teoretickém úvodu (první kapitola) autor podrobně popisuje aktuální informace týkající se epidemiologie a etiologie spinocelulárního karcinomu dutiny ústní. Dále zde popisuje prekancerózní léze a poznatky o klinickém obraze, diagnostice a terapii tohoto typu tumoru. Konečná část úvodu je věnována kmenovým buňkám zdravé a tumorózní tkáně, charakteristice sledovaných markerů a principu jejich imunohistochemické detekce.

V druhé kapitole autor jasně formuluje a stanovuje cíle disertační práce.

Třetí kapitola se zabývá materiálem a metodikou. V první části autor charakterizuje zkoumaný soubor 34 pacientů léčených v období let 1989 – 2006 na klinice ÚČOCH FN a LF UP Olomouc pro danou diagnózu. V druhé části je podrobně uveden postup přípravy a imunohistologického vyšetření vzorků. V třetí části je uveden metodický postup statistického vyhodnocení výsledků.

Čtvrtá kapitola se zabývá získanými výsledky. Ty jsou rozděleny vzhledem k předpokládaným cílům práce do třech částí. V první části je uveden vztah mezi expresí markerů a anatomickou lokalizací. V druhé části je exprese zkoumaných markerů vztažena k diferenciaci tumoru. Třetí část pak hodnotí expresi markerů vzhledem k objemu tumoru. Kapitola je obrazně doplněna přehlednými tabulkami a grafy, které statisticky hodnotí dosažené výsledky.

V páté kapitole autor uvádí dosažené výsledky s vlastním závěrem a náměty na diskusi.

Přehled literatury zahrnuje 260 odkazů, které svědčí o výborné a aktuální orientaci autora v dané problematice.

Pro lepší orientaci v disertační práci je přehledně uveden seznam použitých zkratk.

Na závěr práce jsou přiloženy kopie publikovaných článků v recenzovaných časopisech, které splňují požadavky pro studenty Ph.D. dle článku 22 směrnic LF UP, kladené na doktorandy.

Po formální stránce je práce napsána velmi přehledně, srozumitelně a pečlivě.

Závěr: Předložená práce a autorovy výsledky jasně prokazují **samostatné vědeckovýzkumné schopnosti** studenta v daném oboru. Z výše uvedených důvodů **doporučuji** disertační práci MUDr. Michala Krumpa k obhajobě.

Otázky k disertační práci:

- 1, Vzhledem k datování odběru vzorků, byly tyto uchovány způsobem, aby byla možná pozdější jasná analýza sledovaných markerů?
- 2, Byl autor přítomen při klinickém odběru vzorků?
- 3, Jaký je klinický dopad studie tj. lze výsledky aplikovat do praxe?

Olomouc 23.5.2013

doc. MUDr. Martin Starosta, Ph.D.

Dr. h. c. prof. MUDr. Andrej Jenča, CSc.

**Klinika stomatológie a maxilofaciálnej chirurgie UPJŠ LF a UN L. Pasteura Košice,
Rastislavova 43, 040 01 Košice**

V Košiciach, dňa 20. 5. 2013

Oponentský posudok

na písomnú prácu k dizertačnej skúške externého doktoranda MUDr. Michala Krumpa v študijnom odbore Patologická anatómia a súdne lekárstvo na tému „Význam kmeňových buniek v patogenéze spinocelulárneho karcinómu ústnej dutiny“

Úvod

Písomná práca k dizertačnej skúške externého doktoranda MUDr. Michala Krumpa je zviazaná v tvrdej väzbe, rozsah napísaných strán je 114, vrátane literatúry a publikácií autora. V závere je zviazaných 5 publikácií autora. V práci sa nachádza 19 tabuliek, 53 obrázkov, z ktorých 18 je klinického, 18 histopatologického a 17 grafového spracovania materiálu práce. Práca je členená podľa obsahu do piatich kapitol s podkapitolami, literatúrou, zoznamom skratiek a publikáciami autora.

Na úvodných stranách sa nachádza prehlásenie, poďakovanie a obsah. Na stranách 6, 7 je napísaný súhrn v jazyku slovenskom a na stranách 8, 9 v jazyku anglickom.

Pri štúdiách epitelových kmeňových buniek bolo zistené, že epitelové bunky produkujú aj malígne bunky in vitro rozpoznateľné odlišné kolónie buniek nazývané holoklony. Holoklonálne bunky vykazujú schopnosť sebaobnovy a pri ďalšom delení vytvárajú bunky exprimujúce markery diferencovaných buniek. V súvislosti s identifikáciou a izoláciou týchto nádorových buniek bolo zistené, že vykazujú vysoké hodnoty expresie určitých molekúl ako napr. E-kadherínu, β -kateínu, CD44 a iné.

Spinocelulárne karcinómy ústnej dutiny sa vyskytujú často (cca 7% všetkých nádorov). Táto progenitorové bunky vyskytujúce sa v malígnych nádoroch sú základom pre koncept nádorových kmeňových buniek. Imunohistochemickým detekovaním exprimujúcich

potenciálnych markerov nádorových kmeňových buniek vo vzťahu ku karcinómom ústnej dutiny možno analyzovať expresiu molekúl k topografii výskytu diferenciácii a objemu nádoru. Špecifičnosťou poukazujú na rozdiely a sú využiteľné vo vedeckom výskume a klinickej praxi.

V prvej kapitole „Teoretický úvod“ autor rozoberá epidemiológiu spinocelulárneho karcinómu ústnej dutiny z globálneho hľadiska. Špeciálne za roky 1977 – 1986 uvádza štatistiky v Českej republike. Od 80-tych rokov 20. storočia sa incidencia zvýšila o 0,5/100 000 obyvateľov a v roku 2005 činila 4 prípady na 100 000 obyvateľov. Z príčinných faktorov autor identifikuje štandardne známe faktory.

V tejto kapitole sa autor zmieňuje aj o vplyve UV žiarenia, rizikových faktorov životného prostredia, HPV, EBV, HSV a HIV infekciách, orálnej kandidóze, orálnej submukóznej fibróze, orálnom lichen planus a ostatných lichenoidných léziách, lupus erythematosus, výžive, rodinnej a genetickej predispozícii, prekancerózných léziám počnúc leukoplakiami, erytroplakiami, palatálnou keratózou a prekanceróznymi stavmi (orálna submukózna fibróza, aktinická keratóza, orálny lichen planus, diskoidný lupus erythematosus).

V podkapitole 1.4 autor poukazuje na klinické obrazy spinocelulárneho karcinómu ústnej dutiny a jeho prejavy podľa topografickej lokalizácie.

V podkapitole 1.5 popisuje problematiku kmeňových buniek od embryonálneho a fetálneho obdobia, potrebu kmeňových buniek v postembryonálnom období pre reparovanie a kompenzovanie strát poškodených tkanív v organizme v záujme udržania rovnováhy. Dôležitou časťou je lokalizácia a identifikácia kmeňových buniek epitelu, morfológické varianty epiteliálnych bunkových klonov.

V podkapitole 1.6 autor popisuje aktiváciu nádorových kmeňových, ich transformáciu, transformáciu skorých progenitorových buniek, dediferenciáciu, fúziu hematopoetických kmeňových buniek s bunkami tkaniva, izoláciu a identifikáciu nádorových kmeňových buniek, ktorá predpokladá, že všetky malígne nádory sú tvorené zmenou sebaobnovujúcich kmeňových buniek, TA progenitorov a diferencovaných buniek.

V podkapitole 1.7 „Adhezívne molekuly“ poukazuje na silné väzby na špecifické ligandy, ktoré zabezpečujú adhéziu medzi bunkami a extracelulárnou matrix ako aj medzi bunkami navzájom. Ich význam v procese bunkovej mobility, migrácii, diferenciácií alebo génovej transplantácie je nenahraditeľný.

V kapitole „Ciele dizertačnej práce“ si doktorand postavil problém imunohistochemicky detekovať expresiu potenciálnych markerov kmeňových buniek (CD44, E-kadherín) vo vzorkách spinocelulárneho karcinómu ústnej dutiny a štatisticky analyzovať

expresiu týchto molekúl vo vzťahu k anatomickej lokalizácii výskytu tumorov v ústnej dutiny, diferenciacii tumoru a objemu tumoru (pT).

V kapitole „Materiál a metódy“ popisuje spôsob získavania histopatologických vzoriek od pacientov so spinocelulárnym karcinómom. Presná štruktúra zloženia pacientov, typ nádoru, diferenciacia, veľkosť nádoru, vytvárajú predpoklady k objektivizácii výsledkov. Celý postup prípravy histologických preparátov je podrobne rozpracovaný a vyhodnotenie imunoreaktivity navrhol pomocou H-skóre.

Pre spracovanie použil software SPSS v. 15 (SPSS inc., Chicago, USA) a hladiny signifikancie 0,05 vyhodnotil pomocou Fischerovho presného testu.

V kapitole „Výsledky“ spracoval vlastné porovnanie štúdie na s. 64 – 85 v tabuľkách č. 9 - 17 a obrázkoch a grafoch č. 28 – 53. Výsledky sú spracované na hladine percentuálne a na hladine signifikancie 0,05.

V skupine A (anatomická lokalizácia) autor dosiahol signifikantne vyšší podiel vzoriek s pozitivitou CD44 u lokality iné (100%) a spodiny ústnej dutiny (84,6%), v lokalite jazyk (0%).

V skupine B (diferenciacia tumoru) nepreukázal signifikantnú rozdielnosť v gradingu v markeroch CD44 a E-kadherín.

V celej kapitole sú výsledky precízne spracované a doložené grafickými metódami.

V skupine C (pT štádium tumoru) autor preukázal Fischerovým testom signifikantnú závislosť medzi pT objemom a pozitivitou markeru na úrovni $P=0,022$.

V kapitole „Diskusia a závery“ autor porovnáva získané výsledky s viac ako tridsiatimi autormi prác uvedených v dizertačnej práci. V mnohých prípadoch sú autorove výsledky v korelácii, ale i nesúhlasia, s výsledkami Sakakiho et al., Cruza et al pri hodnotení markeru E-kadherínu.

V šiestej kapitole „Literatúra“ v abecednom poradí s číselným označením autor uviedol 260 použitých literárnych prameňov. Literárne údaje spĺňajú normy. Citácie korelujú so zoznamom použitej literatúry a sú v texte uvádzané podľa autora a roku vydania. V ďalšej časti posudku sa zameriavam na proponované obsahové hodnotenia.

Zhodnotenie významu dizertácie pre príslušný odbor

Z rozboru dizertačnej práce vyplýva, že získané výsledky sú v odbore cenné a použiteľné pre ďalšie sledovania vedeckého, odborného charakteru. V súbore väčších čísiel by tieto výsledky boli relevantnejšie. V oromaxilofaciálnej onkológii majú veľký význam v stratégii a taktike liečby orofaciálnych karcinómov. Z celkového pohľadu na onkologického

pacienta majú aj prognostický význam. Z odborného hľadiska spresňuje diagnostické metódy v procese rehabilitácie chorého.

Dizertačná práca je prínosom v teoreticko-vednej oblasti vo výchovno-vzdelávacom procese v biologických a onkologických disciplínach. Výsledky práce sú použiteľné aj vo veterinárnej medicíne.

Vyjadrenie k postupu riešenia problému, použitým metódam a splneniu stanoveného cieľa

Postup riešenia vedeckého bádania MUDr. Michal Krump zvolil na vysokej odbornej úrovni. Skĺbil predklinické a klinické disciplíny, ktoré síce úzko súvisia, nie však profundujú obe do tak podstatného v orofaciálnej onkológii. V orofaciálnej onkológii chýbajú validnejšie markery. Rozvojom a exaktným skúmaním je možné sa k takýmto prepracovať. Metódy práce boli stanovené exaktne a ciele naplnil tak, ako ich v kapitole definoval.

Stanovisko k výsledkom dizertačnej práce a k pôvodnému konkrétnemu prínosu dizertačnej práce

Výsledky dizertačnej práce sú v orálnej onkológii prvotinou. S malým počtom (34) vyšetrených nádorov však ukazujú smer, ktorým by sa mohli uberať histopatologické vyšetrenia pre precíznejší grading orofaciálnych karcinómov. Z klinického hľadiska by som veľmi uvítal tento nástupný trend.

Vyjadrenie k usporiadaniu, prehľadnosti, formálnej úprave a jazykovej úrovni, vyjadrenie k publikáciám

Dizertačná práca je síce prehľadná, ale bolo by vhodnejšie, keby kapitola č. 1 „Teoretický úvod“ bola rozdelená na časť epidemiologickú, etiologickú, klinické lézia a molekulohistopatologickú. V práci chýba kapitola „Záver“, ktorá by viac spresnila význam dizertačnej práce z pohľadu doktoranda.

Jazyková úprava ale aj formálna stránka práce je na vysokej úrovni.

Publikácie autora sú na vysokej úrovni, zvlášť práca uvedená ako č. 1 IF 0,702. Výsledky práce sú publikovateľné i v iných karentovaných časopisoch s biologickou resp. onkologickou problematikou a v časopisoch prezentujúcich ochorenia kranio-maxilofaciálnej oblasti.

Na doktoranda mám otázky:

- 1. V čom vidí príčinu rozdielnych výsledkov E-kadherínu u karcinómu jazyka a spodiny ústnej dutiny?**
- 2. Ako si vysvetľuje signifikantný rozdiel pozitivity CD44 100% u lokality iné oproti lokalite jazyka?**

Záver

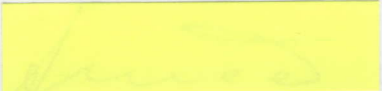
MUDr. Michal Krump, lekár zubnej ambulancie Sun Dental, s.r.o. a študent kombinovanej formy doktorského študijného programu na LF UP v Olomouci spracoval dizertačnú prácu na tému „ Význam kmeňových buniek v patogenéze spinocelulárneho karcinómu ústnej dutiny“ s vyšetrením a experimentálne na Ústave klinickej a molekulárnej patológie LF UP a v Laboratóriu molekulárnej patológie LF UP na veľmi dobrej úrovni. Práca je prezentovaná faktograficky s precíznym štatistickým vyhodnotením. Výsledky práce sú v klinickej orálnej patológii v Českej republike a Slovenskej republike prvotinou a majú význam pre orofaciálnu biológiu, onkológiu, maxilofaciálnu chirurgiu a ďalšie odbory.

Práca má široký základ poznatkov v citovanej literatúre (260 použitých literárnych prác).

V práci sú drobné formálne nedostatky a obsahovo názorová kapitovateľnosť by ju viac precizovalo. Ukazuje smerovanie v základnom ale aj klinickom výskume s aplikačným významom v klinickej orofaciálnej onkológii.

Vychádzajú z komplexného hodnotenia odporúčam, aby dizertačná práca bola pripustená k obhajobe.

Na základe úspešnej obhajoby odporúčam udeliť MUDr. Michalovi Krumpovi akademický titul doktor v skratke Ph.D. v zmysle § 47 Zákona o vysokých školách č. 111/98 Sb.


Dr. h. c. prof. MUDr. Andrej Jenča, CSc.