

---

*V Praze dne 18. 5. 2020*

**Oponentský posudek na dizertační práci Mgr. Kamily Hladíkové „Význam složení a funkčních vlastností imunitního infiltrátu nádorového mikroprostředí pro klinický průběh nádorů hlavy a krku“**

Dizertační práce Mgr. Hladíkové je zaměřena na problematiku protinádorové imunitní odpovědi u nádorů hlavy a krku (HNSCC) s důrazem na nádory, jejichž etiologie je asociována s infekcí virem HPV16. Přináší důkladnou analýzu rozdílů mezi nádory hlavy a krku s ohledem na přítomnost infekce virem HPV16. Dále přináší nové poznatky v dosud do jisté míry kontroverzních oblastech, jako je např. ne zcela jasná souvislost exprese inhibičních molekul na tumor infiltrujících lymfocytech s rozvojem onemocnění a účinností imunoterapie či role B lymfocytů v protinádorové imunitě.

Základem dizertační práce je pět příložených publikací uveřejněných v prestižních časopisech, přičemž u dvou z nich je Mgr. Hladíková prvním autorem, které jsou uvedeny komentářem, ve kterém je vždy uveden i podíl Mgr. Hladíkové na dané studii.

Součástí práce je Literární úvod, ve kterém jsou na cca 30 stranách uvedena relevantní literární data ke studované problematice. Největší prostor je věnován etiologii nádorů hlavy a krku, roli HPV16, nádorovému mikroprostředí, kontrolním bodům imunitních reakcí, jejich prognostickému významu a využití jejich inhibitorů v imunoterapii. Vzhledem k dále řešené problematice mohl být větší prostor věnován tumor infiltrujícím leukocytům s důrazem na současné znalosti o roli B lymfocytů v imunitní reakci proti různým typům nádorů. Na konci práce je Shrnující závěr stručně rekapitulující a diskutující nejdůležitější získané výsledky. Práce obsahuje 115 literárních citací.

Jednotlivé hlavní cíle práce byly jasně definovány a odpovídají pěti jednotlivým publikacím. Data prezentovaná v jednotlivých publikacích na sebe logicky navazují a doplňují se. Výsledná disertační práce je tak velmi konsistentní.

V práci *Partlová et al., 2015* jsou jasně zdokumentovány rozdíly v nádorovém mikroprostředí mezi HPV16 pozitivními a negativními nádory. Byl charakterizován imunitní infiltrát nádorové tkáně pacientů s důrazem na funkční analýzu složek adaptivní imunitní odpovědi. Výsledky byly dále analyzovány ve vztahu k etiologii onemocnění, klinickému průběhu onemocnění a také z hlediska nalezení vhodných prognostických znaků pro navržení efektivních imunoterapeutických přístupů.

---

Kromě potvrzení, že HPV16 asociované nádory jsou charakterizovány vyšší úrovní imunitního infiltrátu, je velmi důležité pozorování, že tyto nádory mají vyšší hladinu exprese PD1, což však není spojeno s negativní prognózou. Prezentované výsledky ukazují, že u HPV-asociovaných HNSCC by měla být účinná imunoterapie a mají tak potenciální klinický význam. Práce je cenná také z toho důvodu, že byla zaměřená na analýzu TIL, zatímco dřívější práce se spíše zabývaly analýzou markerů z periferní krve, co nemusí korelovat se situací v nádoru.

Navazující práce *Hladíková et al., 2018*, se soustředí na funkční analýzu HPV-specifických TIL ze vzorků HPV16-asociovaných nádorů orofaryngu. Tyto studie ukazují, že poruchy funkce specifických CD8<sup>+</sup> lymfocytů jsou spojeny spíše s expresí Tim-3 než PD-1, z čehož autoři usuzují, že Tim-3 je více než PD-1 znak vyčerpaných lymfocytů. Zároveň navrhují imunoterapeutická schémata, která by byla založena kombinované terapii zahrnující blokaci nejen PD-1, ale i dalších inhibičních molekul, ve spojení s aktivační imunoterapií např. terapeutickými vakcínami. Výsledky byly následně potvrzeny i v další prezentované práci na ovariálním karcinomu (*Fučíková et al., 2019*), kde bylo zjištěno, že vyšší exprese PD-1/PD-1L je spojena s Th1 imunitní odpovědí.

Práce *Hladíková et al., 2019* přináší trochu netradiční pohled na protinádorovou imunitu, a to důrazem na roli B buněk, což je dosud poměrně kontroverzní téma. Na nádorech orofaryngu bylo ukázáno, že vyšší přítomnost B a T buněk a jejich vzájemný kontakt je asociován s pozitivní prognózou. Na základě experimentálních dat tak byly navrženy možné mechanismy, že B buňky mohou sloužit jako zdroj CXCL9, který atrahuje T buňky nebo jako lokální APC dále stimulující T buňky. Tato data jsou velmi zajímavá a měla sloužit jako základ pro další výzkum B buněk v prezentaci antigenu a modulaci protinádorové imunitní odpovědi za různých podmínek i na jiných nádorových modelech.

Výše diskutované čtyři práce byly vhodně doplněny prací *Kloudová et al., 2016*, která se zabývá trochu odlišnou částí nádorové imunologie, a to nalezení vhodné buněčné linie ovariálního karcinomu jako zdroje antigenů pro přípravu buněčných vakcín na bázi dendritických buněk.

Z formálního hlediska není pečlivě vypracované česky psané práci co vytknout, je dobře členěná i napsaná, má odpovídající úvod a přiložené publikace jsou dostatečně komentovány a prezentovány v logických souvislostech. Práce je bez formálních chyb a překlepů.

Závěrem lze říci, že Mgr. Kamila Hladíková ve své práci významně přispěla k objasnění rozdílů mezi nádorovým mikroprostředím a infiltracích TIL u HPV pozitivních a HPV negativních nádorů hlavy a krku, k charakterizaci prognostických znaků s ohledem na predikci účinnosti imunoterapie a v neposlední řadě k hlubšímu poznání role B lymfocytů v protinádorové imunitě. Prokázala tak

---

schopnost samostatné vědecké práce, získala prioritní výsledky, které publikovala jako první autor ve dvou publikacích a jako spoluautor v několika dalších. Doporučuji proto, aby práce byla přijata jako podklad pro udělení titulu PhD.

**Dotazy k diskusi:**

1. Ve své práci jste prezentovala podrobnou analýzu rozdílů v TIL u HPV16 pozitivních a negativních nádorů. Analyzovali jste také rozdíly v expresi imunoaktivních molekul (MHC glykoproteinů, kostimulačních molekul) přímo na nádorových buňkách? Jaká jsou literární data o těchto rozdílech a jak korelují s analýzami TIL?
2. U HPV-pozitivních nádorů je inaktivace proteinu p53 dána hlavně jeho degradací po vazbě na virový protein E6. Je známo, že interferony dokáží aktivovat expresi p53. Je možné, že by obnovení exprese a funkce p53 mohlo být jedním z mechanismů účinku Th1 protinádorové imunitní odpovědi u HPV16 pozitivních, ale nikoliv negativních nádorů?
3. Z grafu na Obr. 2D na straně 72 (*Hladíková et al., 2019*) se zdá, že vyšší infiltrace CD20<sup>+</sup> B buněk v mikroprostředí nádoru je pozitivním markerem přežití i v případě, že infiltrace CD8<sup>+</sup> buňkami byla nízká. Můžete tento fakt komentovat?

RNDr. Milan Reiniš, CSc.

Oddělení imunologických a nádorových modelů  
Ústav molekulární genetiky AV ČR, v.v.i.  
Václavská 1083, 142 20 Praha 4

---