

Oponentský posudek dizertační práce

Imunifentypizace pacientů s HPV-asociovanými a neasociovanými karcinomy hlavy a krku

MUDr. Eva Lukešová

Klinika Otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku , 1. LF UK a FN v Motole

Rozsah práce a dokumentace:

Dizertační práce je koncipována jako shrnutí autorčiných poznatků a výzkumu o problematice imunitního profilu u pacientů s HPV-asociovanými a neasociovanými karcinomy hlavy a krku, konkrétně zejména na změny v zastoupení jednotlivých lymfocytárních subpopulací (CD4+, CD8+, CD4+CD25+ Treg, CD4+ CD25+ FoxP3 Treg, CD 19 B buněk a CD3-CD56+ CD16+ NK buněk) u pacientů s HPV-asociovanými či neasociovanými karcinomy hlavy a krku a na vliv virologických a imunologických parametrů na prognózu pacientů s karcinomem hlavy a krku.

Práce je rozdělena do 8 kapitol: 1. Přehled o současném stavu problematiky (35 str.), 2. Stanovení cílů a hypotéz (1 str.), 3. Metodika (10 str.), 4. Výsledky (24 str.), 5. Diskuze (7 str.), 6. Závěry (1 str.), 7. Literatura (10 str.) obsahující 219 citací a kapitola 8. Přílohy (2 str.) obsahující souhrn publikací přijatých v impaktovaných i neimpaktovaných časopisech, jejichž je MUDr. Lukešová autorkou či spoluautorkou.

Cílem práce je:

1. Stanovit prognostický význam HPV
2. Ověřit, je-li možné pro průkaz HPV etiologie karcinomů hlavy a krku nahradit detekci HPV 16 E6 mRNA detekcí kombinace markerů HPV 16 DNA a p16
3. Určit, je-li imunofenotyp u pacientů s karcinomem hlavy a krku v porovnání s imunitním systémem zdravých jedinců modifikovaný
4. Porovnat případné změny v imunitním systému u pacientů s HPV-asociovanými a neasociovanými karcinomy hlavy a krku
5. Zjistit, ovlivňuje-li imunitní stav pacientů s karcinomem hlavy a krku jejich prognózu
6. Určit, zda virologický či imunologický faktor je prognosticky významnější, zda tyto faktory působí v součinnosti, či nezávisle na sobě.

Jde o cíle ambiciózní, které jsou v současnosti řešeny řadou týmů ve světové literatuře, jak autorka podrobně uvádí v kapitole 1. Předpokládaným výstupem je cenný příspěvek do celosvětové diskuze o této problematice.

K jednotlivým částem předložené práce uvádím:

V přehledu o současném stavu problematiky (strany 3-38) shrnuje poznatky o karcinomech hlavy a krku. Následně velmi podrobně popisuje virologickou stránku problematiky daného tématu. Nejprve se věnuje obecné charakteristice HPV, na kterou navazuje klinická část popisující účast virů v etiologii karcinomů hlavy a krku. Poté velmi přehledně a systematicky popisuje poznatky imunologické, které popisuje od základních charakteristik a rozdělení specifické a nespecifické imunity, pokračuje v popisu jednotlivých imunokompetentních buněk a dále popisuje změny v zastoupení imunitních buněk a jejich vliv na prognózu u pacientů s nádorovým onemocněním obecně, u pacientů s karcinomem hlavy a krku a u pacientek s karcinomem hrdla děložního. Karcinom hrdla děložního zde reprezentuje vhodný vzor pro interakci mezi imunitním systémem a virem indukovaným nádorem, neboť tyto nádory jsou téměř ve 100% vyvolány infekcí HPV. Ukazuje velmi dobrou orientaci v dané problematice, cituje prakticky veškerou významnější literaturu, která byla na dané téma publikována (celkem 209 citací). Předložený text je vynikajícím přehledem daného tématu a navíc je doplněn o vhodně vybrané ilustrace, napomáhající k pochopení principů imunologických mechanismů.

Praktická část je rozdělená na Materiál a metodiku (strany 41-51) detailně rozepisující jednotlivé postupy včetně statistické analýzy, Výsledky (strany 52-76) obsahující tabulky a grafy dokumentující přehledně výsledky práce a Diskuzi (strany 77-84).

Jedná se o práci prospektivní, ve které je vyšetřen soubor 110 pacientů s primárním karcinomem orofaryngu, dutiny ústní, hypofaryngu a laryngu, kteří ve 106 případech podstoupili primárně chirurgickou léčbu, čtyři pacienti byli primárně léčeni onkologicky. Pacienti byli zařazeni do studie v letech 2004-2012. Zahrnuto bylo 52 kontrolních jedinců, kteří odpovídali věkem a pohlavím 50 pacientům ze souboru pacientů.

První část výsledků se věnuje virologické části. U všech pacientů byla vyšetřena HPV16 E6 mRNA izolovaná z tkáně tumoru, dle které byli pacienti rozděleni do skupiny HPV-pozitivních a HPV-negativních. Navíc byla z tkáně tumoru izolována HPV DNA a imunohistochemicky byla zjišťována přítomnost exprese proteinu p16, se zjištěním, že není možné pro průkaz etiologie HPV nahradit detekci HPV 16 E6 mRNA detekcí kombinace markerů HPV DNA + p16. HPV-pozitivita byla prognostickým indikátorem lepší prognózy. Následuje část zaměřená na imunologii. Celkem u 110 pacientů byly vyšetřeny imunitní parametry, včetně CD4+ CD25+ Treg. Limitem studie může být absence markeru FoxP3 u 60 pacientů. Tento marker byl vyšetřován až u vzorků zařazených po roce 2006, jelikož do té doby nebyla dostupná specifická monoklonální protilátka detekující FoxP3. Nicméně autorka popisuje statisticky významnou korelaci mezi CD4+ CD25+ Treg a CD4+ CD25+ FoxP3 Treg, proto je možné CD4+ CD25+ Treg považovat za skutečně aktivní Treg. Byly detekovány signifikantní změny v zastoupení jednotlivých imunitních parametrů u pacientů s nádorem v porovnání s kontrolní skupinou a u pacientů s HPV-asociovanými v porovnání s HPV-neasociovanými karcinomy. Hladina CD4+ CD25+ Treg, nižší poměr CD8+/CD4+ CD25+ Treg a kombinace markerů HPV+/Treg high byly identifikovány jako faktory ovlivňující přežívání pacientů s karcinomem hlavy a krku. Tyto imunitní parametry byly statisticky významné pro DSS, nikoliv pro OS. Zvýšené hladiny Treg jsou zde paradoxně indikátorem lepší prognózy, nicméně i jiné, autorkou citované práce, popisují lepší prognózu u pacientů s vyššími hladinami Treg u pacientů s orofaryngeálními karcinomy. V těchto pracích jsou Treg detekovány v nádorovém mikroprostředí. Zajímavé by jistě bylo porovnat hladiny jednotlivých lymfocytárních populací v periferní krvi a v nádorovém mikroprostředí.

Hladiny Treg a HPV ovlivňují prognózu pacientů s karcinomem hlavy a krku nezávisle, zajímavé by jistě bylo korelovat též další lymfocytární subpopulace s přítomností HPV.

Závěry práce (strana 85) dobře korespondují s vytyčenými cíli.

Literatura obsahuje vysoký počet více než 200 aktuálních citací dané problematiky

Celkové hodnocení práce:

Předkládaná dizertační práce, která zpracovává problematiku změn v zastoupení jednotlivých imunitních parametrů u pacientů s virem indukovaným karcinomem hlavy a krku, má velmi vhodně zvolené téma. A to jak po stránce vědecko-výzkumné, kdy složité a vzájemně propojené interakce imunitního systému hostitele a nádorové tkáně nejsou doposud plně odhaleny a jejich výzkum je jednou z možností směřující ke zlepšení léčebných výsledků nejen u karcinomů hlavy a krku. Tak i klinická problematika zjištění prognostického významu imunologických a virologických parametrů je nesmírně živé téma. Imunoterapie je jednou z možných cest, kterou by se v blízké budoucnosti mohla ubírat nová terapeutická schémata, která by doplňovala současnou léčbu chirurgickou a radioterapií. Cílená imunoterapie by mohla více specifikovat léčbu pacientů s karcinomem hlavy a krku a vést k deeskalaci dosud zavedených terapeutických postupů.

Pozitivním faktem je, že práce autorky o změnách v zastoupení imunitních parametrů v periferní krvi u pacientů s HPV-asociovanými karcinomy hlavy a krku přináší prioritní výsledky.

Práce je přehledně uspořádána, je čtivá. Zvolené metodické postupy jsou jasně definovány a odpovídají vytyčeným cílům. (Možná by bylo vhodnější uvést cíle práce v úvodu práce a ne až na straně 39). Cíle práce jsou jednoznačně splněny.

Publikační podklad práce tvoří tři originální články z let 2013 a 2014 v zahraničních časopisech s IF (6,19, 2,88, 6,28). MUDr. Lukešová je dále spoluautorkou dalších pěti publikací v časopisech s IF z let 2012–2014, které přímo nesouvisí s tématem dizertační práce (kumulativní IF 12, 63). Toto lze hodnotit jako velmi aktivní a kvalitní zahraniční publikační činnost v období od roku 2012.

Otázka na autorku disertační práce:

Jak si myslíte, že v blízké budoucnosti ovlivní HPV status, případně imunologické parametry klinické rozhodování o volbě léčebné metody?

Kterou z detekčních metod stanovení HPV pozitivivity považujete za nejvhodnější pro klinické použití?

Závěr:

Celkově považuji práci za velmi zdařilou s výsledky s bezprostředním dopadem na klinickou praxi. Vhodná je publikace ve světové literatuře.

Autorka v předložené práci zjevně prokázala schopnost samostatné vědecké práce a dle mého názoru má všechny předpoklady titul Ph.D. získat. Práce splňuje podmínky studia

v doktorském studijním programu Univerzity Karlovy v Praze, a proto ji **doporučuji k obhajobě a doporučuji**, aby MUDr. Evě Lukešové byl, na základě úspěšné obhajoby, udělen **akademický titul Ph.D.** dle § 47 Zákona o vysokých školách č. 111/98 Sb.

V Brně 24. 10. 2014

Prof. MUDr. Ivo Šlapák, CSc.
Klinika dětské o
Masarykova Uni

