

V Praze dne 28. 8. 2024

**Oponentský posudek na dizertační práci Mgr. Barbory Pokrývkové „Fenotyp a funkce buněk infiltrujících spinocelulární karcinomy hlavy a krku různé etiologie“.**

Tématem disertační práce jsou analýzy nádorového mikroprostředí u nádorů hlavy a krku s důrazem na srovnání rozdílů mezi nádory virové etiologie asociované s infekcí papilomaviry a nádory nevirového původu. Práce se dá rozdělit na metodickou část, kdy byly zavedeny a optimalizovány moderní metody analýz nádorového mikroprostředí, konkrétně multispektrální imunohistochemie a hmotnostní cytometrie, a druhou část, kdy byly zavedené metodiky využity pro analýzy nádorového mikroprostředí vzorků nádorů pacientů. Základem česky psané dizertační práce jsou čtyři příložené publikace, u dvou z nich je Mgr. B. Pokrývková prvním autorem. Tyto práce jsou doplněny velmi pečlivě vypracovanou úvodní částí, která obsahuje literární úvod, cíle, stručný přehled materiálu a metod, výsledky s odkazy na publikace s doplněním o nepublikované výsledky, diskusi a souhrn.

Podrobný Literární přehled potvrzuje, že autorka se velmi dobře orientuje v tématu práce. Nejprve je poskytnut přehled o nádorech hlavy a krku, hlavně z epidemiologického hlediska a s důrazem na přehled současných znalostí o rozdílech mezi nádory virové a nevirové etiologie. Další část je věnována biologii a epidemiologii lidských papilomavirů a na onemocnění asociované s infekcí lidským papilomavirem a na mechanismy virem indukované kancerogeneze. V poslední části teoretického úvodu je poskytnut přehled o problematice nádorového mikroprostředí, včetně přehledu současných metod používaných při jeho studiu. Přehled literatury je velmi dobře zpracován a mohl by sloužit jako základ pro přehledný článek o tématu. Nicméně velmi krátce jsou diskutovány neimunní buňky v nádorovém mikroprostředí, a také nejsou vůbec zmíněny role cytokinů a chemokinů v nádorovém mikroprostředí.

Cíle jsou jasně definovány a odpovídají výsledkům a jednotlivým publikacím. Mám pouze formální poznámku k formulaci „cílem je vyšetření“, měl by být uveden konkrétní cíl (optimalizace, identifikace, určení atd.). Metody jsou podrobně popsány v jednotlivých publikacích, proto je jejich výčet s doplněním metod, které nejsou součástí příložených publikací, zcela adekvátní.

Ve výsledkové části je vždy odkaz na publikace, krátký souhrn výsledků a zmíněn příspěvek autorky v jednotlivých studiích. Výsledky jsou potom dále shrnuty a diskutovány v Diskusi. Uvedeny jsou i dvě publikace, které nejsou součástí Dizertační práce. Dále jsou ještě uvedeny nepublikované, spíše předběžné výsledky týkající se funkčních analýz Treg buněk izolovaných z nádorové tkáně, kdy byla zavedena metodika, ale nejsou ještě k dispozici reprodukovatelná data.

Experimentální část práce, dokumentovaná v příložených publikacích a kriticky hodnocená a diskutovaná v širších souvislostech v Diskusi, je nejprve metodická, dokumentující, jak se Mgr. B. Pokrývková podílela na zavedení a optimalizaci nových pokročilých metod pro analýzy zastoupení a

fenotypu vybraných buněk imunitního systému v mikroprostředí nádoru, hmotnostní cytometrie (Poláková et al., 2019) v suspensi nádorových buněk. Zde jsou cenná zjištění týkající se optimalizace metod ohledně zpracování vzorků a výběru reagensů a postupů pro získání validních a reprodukovatelných vzorků, např. problematika značení jednotlivých vzorků „čárovými kódy“ založených na isotopech Palladia.

V další práci byla zavedena metoda multispektrální imunohistochemie ve FFPE vzorcích (Pokrývková et al., 2021) a využita pro analýzu mikroprostředí nádorů hlavy a krku. Ve spojení s analýzami exprese vybraných genů exprimovaných makrofágy byly charakterizovány tumor asociované makrofágy a identifikována exprese Arginázy 1 jako možného prognostického znaku u nádorů virové a neviróvé etiologie. To má potencionální klinický význam. Je však třeba mít na paměti, že Argináza 1 není exprimována pouze M2 makrofágy, ale i dalšími buňkami, např. myeloidními supresorickými buňkami, které v této práci nebyly zvažovány. Práce je významná tím, že přináší prioritní data o myeloidní buňkách, které tvoří významnou část tumor infiltrujících leukocytů, ale vzhledem k jejich plasticitě je stále obtížně stanovit jejich role prognostický význam během progresu onemocnění.

Dále byla v retrospektivní studii získána data potvrzující vyšší infiltraci CD3<sup>+</sup> buněk v HPV<sup>+</sup> nádorech a identifikována populace PD1<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> buněk jako nezávislý prognostický znak. Bylo prokázáno, že vyšší infiltrace PD-1<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> buněk je spojena s vyšším přežitím (Pokrývková et al. 2022). Pro další analýzy jsou zajímavá data týkající se rozdílů ve CD8<sup>+</sup> lymfocytů s nízkou a vysokou expresí PD-1 a potvrzení, že PD1<sup>+</sup> buňky nemusí nevykazovat vyčerpaný fenotyp. Za velmi přínosné považují zjištění, že vyšší infiltrace PD-1<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> buněk je spojena s vyšším přežitím a další diskusi o funkčních rozdílech CD8 lymfocytů s nízkou a vysokou expresí PD-1.

V poslední práci byly analyzovány metodou qPCR hladiny mRNA ASPH a dalších genů asociovaných s hypoxií a následně také bylo metodou multispektrální imunohistochemie stanoveno zastoupení buněk exprimující dané znaky (Smahelova et al. 2024). Zde je velmi zajímavé zjištění, že aktivace genů spojených s hypoxií je ovlivněna HPV infekcí.

V souhrnu lze říci, že jednotlivé studie rámci této dizertační práce, provedené na dostatečně velkých kohortách pacientů, potvrdily rozdíly mezi nádory asociovanými s infekcí HPV a nádory jiné etiologie. Byla získána nová data identifikující a charakterizující některé prognostické znaky, jejichž exprese a význam se mohou lišit podle etiologie jednotlivých nádorů. Ukazuje se, že zánětlivá reakce na infekci HPV je částečně zodpovědná za lepší prognózu rozvoje onemocnění ve srovnání s HPV<sup>-</sup> nádory. Výsledky také ukazují, že pro stanovení a pochopení prognostických znaků je důležitá detailní kvalitativní i kvantitativní analýza (např. v případě exprese PD-1) buněčných populací. Důležité jsou i poznatky ohledně rozdílů závislých nejen na etiologii, ale pravděpodobně i lokalizaci nádorů. Získaná



data bude ještě nutno dále doplnit analýzami dalších buněčných populací tumor infiltrujících buněk a také hladin vybraných cytokinů, aby byl získán komplexní obraz nádorového mikroprostředí. Také zatím chybějí experimenty, které by vedly k mechanistickému zdůvodnění rozdílů v mikroprostředí nádorů různé etiologie.

Česky psaná práce velmi dobře členěná i napsaná, bez formálních chyb a překlepů, má odpovídající úvod i diskusi. Všechna data jsou dostatečně a jasně zdokumentována a přiložené publikace jsou komentovány a prezentovány v logických souvislostech.

Mgr. Barbora Pokrývková prokázala orientaci v oboru, schopnost samostatné vědecké práce, ke které má i odpovídající metodickou erudici. Získala výsledky, které publikovala jako první autor ve dvou publikacích a jako spoluautor ve dvou dalších. Doporučuji proto, aby práce byla přijata jako podklad pro udělení titulu PhD.

#### **Dotazy k diskusi:**

- Ve vaší práci jste prokázala rozdíly v zastoupení PD1<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup> buněk mezi nádory virové a neviróvé etiologie. Jak je to s expresí PD1L na nádorových a tumor infiltrujících buňkách u nádorů různé etiologie?
- Můžete ještě podrobněji dokumentovat, jaká je souvislost mezi zastoupením vybraných buněčných populací a genových expresí mezi stádii, případně dalšími parametry vývoje nádorů (podobně, jak je vyhodnoceno na Fig. 4 v Pokrývková et al., 2021) ?
- Máte experimentální data o infiltraci myeloidních supresorických buněk a dalších buněk vedle makrofágů do nádorů různé etiologie, plánujete další analýzy, případně jsou k dispozici literární data na toto téma?
- Je něco známo o rozdílech v hladinách cytokinů v mikroprostředí HPV<sup>+</sup> a HPV<sup>-</sup> nádorů hlavy a krku a o roli aktivace interferonových drah v důsledku antivirové odpovědi u HPV<sup>+</sup> nádorů?



RNDr. Milan Reiniš, CSc.

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