

**Univerzita Karlova  
3. lékařská fakulta**



**UNIVERZITA KARLOVA  
3. lékařská fakulta**

**Disertační práce**

**Praha 2024**

**MUDr. Tomáš Blažek**

**Univerzita Karlova**

**3. lékařská fakulta**

## Disertační práce

Název závěrečné práce

Klinický význam imunitních biomarkerů v terciární prevenci u pacientů s nemetastazujícím skvamózním karcinomem hlavy a krku

*Podnázev závěrečné práce*

*Vysoká exprese PD-L1 na imunitních buňkách v kombinaci se zvýšenou densitou tumor infiltrujících lymfocytů predikuje příznivé přežití u pacientů s lokálně pokročilým karcinomem hlavy a krku: časné výsledky prospektivní studie*

Title

Clinical relevance of immune biomarkers in tertiary prevention in patients with non-metastatic head and neck squamous cell carcinoma

*Subtitle*

*High PD-L1 expression on immune cells along with increased density of tumor-infiltrating lymphocytes predicts a favorable survival outcome for patients with loco-regionally advanced head and neck cancer: early results from a prospective study*

Školitel: prof. MUDr. Renata Soumarová, Ph.D., MBA

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze své práce v databázi systému meziuniverzitního projektu *Theses.cz* za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze 03.07.2024

Jméno: MUDr. Tomáš Blažek

Podpis:

**Identifikační záznam:**

BLAŽEK, Tomáš. *Klinický význam imunitních biomarkerů v terciární prevenci u pacientů s nemetastazujícím skvamózním karcinomem hlavy a krku. [Clinical relevance of immune biomarkers in tertiary prevention in patients with non-metastatic head and neck squamous cell carcinoma]*. Praha, 2024. 115 stran, přílohy 4. Disertační práce. Univerzita Karlova, 3. lékařská fakulta, Ústav hygieny, epidemiologie a preventivního lékařství 3. LF UK 2023. Vedoucí závěrečné práce: prof. MUDr. Renata Soumarová, Ph.D., MBA

**Klíčová slova:** terciární prevence, imunitní biomarkery, prognostické faktory, PD-L1 exprese, tumor infiltrující lymfocyty, skvamózní karcinom hlavy a krku, *[tertiary prevention, immune biomarkers, prognostic factors, PD-L1 expression, tumor-infiltrating lymphocytes, head and neck squamous cell carcinoma]*



## **Poděkování:**

Tímto bych chtěl poděkovat své školitelce prof. MUDr. Renatě Soumarové, Ph.D., MBA, za odborné vedení a pomoc v průběhu celého studia. Velké díky dále patří panu doc. Marku Petrášovi, Ph.D., za provedení statistických analýz a pomoc při přípravě manuskriptů. Díky jeho laskavému přístupu a metodickému vedení v roli školitele konzultanta byly úspěšně publikovány dva vědecké články, metaanalýza a výsledky vlastního výzkumu (prospektivní studie). Současně bych rád poděkoval paní PhDr. Martině Franklové za spolupráci během přípravy metaanalýzy a panu doktoru René Prahlovi za odbornou jazykovou korekturu anglických textů ve vědeckých člancích. V neposlední řadě patří mé díky přednostovi Onkologické kliniky FNO doc. MUDr. et Ing. Jakubu Cvekovi, Ph.D., MBA, a kolektivu lékařů za součinnost a organizační podporu v průběhu klinického výzkumu. Rovněž bych rád poděkoval týmu lékařů Otorinolaryngologické a Stomatologické kliniky, podobně také Ústavu patologie a molekulární genetiky Fakultní nemocnice Ostrava, kteří se podíleli na průběhu klinického výzkumu. Na závěr chci poděkovat Heleně Hrubé, studentce oboru České filologie Filozofické fakulty UP, za odbornou jazykovou korekturu této disertační práce. Klinický výzkum a prospektivní kohortová studie byly podpořeny grantem institucionální podpory Fakultní nemocnice Ostrava – RVO-FNOs/2021.

## Obsah

1	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....	1
2	ÚVOD .....	4
2.1	OBECNÉ CHARAKTERISTIKY NÁDORŮ HLAVY A KRKU .....	5
2.1.1	Epidemiologie nádorů hlavy a krku .....	5
2.1.2	Etiologie .....	6
2.1.3	Histologie .....	8
2.2	DIAGNOSTIKA NÁDORŮ HLAVY A KRKU .....	9
2.2.1	Diagnostické postupy a vyšetření .....	9
2.2.2	Zobrazovací vyšetření .....	9
2.2.3	Metody nukleární medicíny .....	10
2.2.4	Stanovení stádia onemocnění .....	10
2.3	PRINCIPY RADIKÁLNÍ LÉČBY SKVAMÓZNÍCH KARCINOMŮ HLAVY A KRKU (HNSCC) .....	11
2.3.1	Posouzení stavu, doporučení multidisciplinárního týmu .....	11
2.3.2	Léčba časných, lokalizovaných stádií (stádia I–II) .....	11
2.3.3	Léčba lokoregionálně pokročilých stádií (III–IVB) .....	12
2.4	DISPENZARIZACE PACIENTŮ PO RADIKÁLNÍ LÉČBĚ .....	13
2.5	PREVENCE NÁDORŮ HLAVY A KRKU .....	14
2.6	PROGNÓZA PACIENTŮ S HNSCC .....	16
2.6.1	Prognostické faktory ve vztahu k charakteristikám pacienta .....	16
2.6.2	Prognostické faktory související s parametry nádorového onemocnění .....	18
2.6.3	Nové prognostické faktory .....	20
2.7	ROLE IMUNITNÍHO SYSTÉMU V PATOGENEZI HNSCC .....	21
2.7.1	Imunitní dohled v procesu nádorového růstu .....	21
2.7.2	Nádorové mikroprostředí (TME) .....	23
2.7.3	Imunitní komponenta TME .....	26
2.7.4	Shrnutí poznatků o TME a imunitních interakcích .....	31
3	CÍL STUDIE .....	33
3.1	Literární přehled a metaanalýza .....	35
3.2	Prospektivní kohortová studie .....	38
3.2.1	Primární a sekundární cíle studie .....	38

3.2.2	Materiály a metody .....	38
3.2.3	Výsledky .....	44
3.2.4	Diskuse.....	56
4	ZÁVĚRY .....	59
5	ABSTRAKT.....	62
6	ABSTRACT.....	64
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	66
8	PUBLIKACE VZTAHUJÍCÍ SE K TÉMATU.....	74
9	Přílohy.....	75
9.1	Příloha 1: Metaanalýza – full text manuskriptu .....	75
9.2	Příloha 2: Studie s dávkově eskalovaným režimem radioterapie – full text manuskriptu.....	85
9.3	Příloha 3: Doplnkové tabulky.....	94
9.4	Příloha 4: Časné výsledky prospektivní studie – full text manuskriptu .....	105

## 1 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACE-27	skóre hodnocení komorbidit (z angl. Adult Comorbidity Evaluation 27 score)
APC	antigen prezentující buňka
BED <sub>10</sub>	biologická efektivní dávka
CAFs	nádorem asociované fibroblasty (z angl. Cancer Associated Fibroblasts)
CB-CT	zobrazovací rentgenologické vyšetření pro zaměření ozařované oblasti (z angl. Cone-Beam Computed Tomography)
CCI	index hodnocení komorbidit (z angl. Charlson Comorbidity Index)
CD	diferenční skupina (z angl. Cluster of Differentiation)
CD3+	T-lymfocyty
CD4+	pomocné T-lymfocyty
CD8+	cytotoxické T-lymfocyty
cDDP	cisplatina (cytostatikum)
CI	interval spolehlivosti (z angl. Confidential Interval)
CPS	kombinované pozitivní skóre (z angl. Combined Positivity Score)
CT	výpočetní tomografie
CTLA-4	checkpoint (z angl. Cytotoxic T-lymphocyte Associated Protein 4)
CXCL	označení malých peptidových molekul tzv. chemokinů
DAB	metoda imunohistochemické analýzy
DAKO	označení barvicích roztoků pro imunohistochemii
DC	dendritická buňka
DFS	přežití bez známek recidivy onemocnění (z angl. Disease-Free Survival)
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DMFS	přežití bez vzdálených metastáz (z angl. Distant Metastatic-Free Survival)
DOI	hloubka invaze (z angl. Depth Of Invasion)
DSS	nádorově specifické přežití (z angl. Disease-Specific Survival)
EBV	Epstein-Barrové virus
ECOG	výkonnostní stav pacienta (z angl. Eastern Cooperative Oncology Group)

EGFR	receptor epidermálního růstového faktoru
Fas/FasL	protein/ligand z rodiny TNF – tumor nekrotizující faktor
FDG-PET	18-fluordeoxyglukózová pozitronová emisní tomografie
FOXP3	regulační T-lymfocyty
G-CSF	faktor stimulující růst kolonie granulocytů
HNSCC	skvamózní karcinom hlavy a krku
HLA	komplex HLA (z angl. Human Leucocyte Antigen)
HPV	lidský papilomavirus
HR	poměr rizik (z angl. Hazard Ratio), cHR – hrubý, aHR – adjustovaný
CHT	chemoterapie
IC	imunitní buňky (z angl. Immune Cells)
IFN $\gamma$	interferon gamma
IGRT	obrazem naváděná radioterapie (z angl. Image-Guided Radiation Therapy)
IHC	imunohistochemie
IL	interleukin
IMRT	ozáření modulovanou intenzitou svazku (z angl. Intensity-Modulated Radiation Therapy)
KV	kilovoltážní portálový snímek
LRFS	přežití bez lokoregionálního relapsu (z angl. Local Relapse-Free Survival)
MDSCs	supresorové buňky myeloidní řady (z angl. Myeloid-Derived Suppressor Cells)
MHC	hlavní histokompatibilní komplex (z angl. Major Histocompatibility Complex)
MR	magnetická rezonance
NBI	endoskopická metoda v ORL (z angl. Narrow Band Imaging)
NK	NK buňky – lymfocyty s cytotoxickou aktivitou (z angl. Natural Killers)
NLR	poměr neutrofilů k lymfocytům (z angl. neutrophil-to-lymphocyte ratio)
NZIS	Národní zdravotnický informační systém
OS	celkové přežití (z angl. Overall Survival)

PD-1	receptor programované smrti (z angl. Programmed death receptor 1)
PD-L1	ligand receptoru programované smrti
PET/CT	pozitronová emisní tomografie
PS	výkonnostní stav pacientů (z angl. Performance Status)
RCHT	radiochemoterapie
RT	radioterapie
SBRT	stereotaktická radioterapie (z angl. Stereotactic Body Radiation Therapy)
SCCA	nádorový marker – antigen skvamózních nádorových buněk
TAMs	makrofágy asociované s tumorem (z angl. Tumor Associated Macrophages)
TANs	neutrofilny asociované s tumorem (z angl. Tumor Associated Neutrophils)
TB	nádorové bujení (z angl. Tumor Budding)
TC	nádorové buňky (z angl. Tumor Cells)
TGF- $\beta$	cytokin (z angl. Transforming Growth Factor beta)
Th1/Th2	fenotypy pomocných, CD4 <sup>+</sup> T-lymfocytů
TIL	tumor infiltrující lymfocyty
TME	nádorové mikroprostředí (z angl. Tumor microenvironment)
TNF- $\alpha$	tumor nekrotizující faktor alfa
TNF- $\beta$	tumor nekrotizující faktor beta
TNM	klasifikace stádia nádorového onemocnění
Treg	regulační T-lymfocyty
TSH	tyreotropní hormon
T3	hormon štítné žlázy – trijodtyronin
T4	hormon štítné žlázy – tyroxin
USG	ultrasonografie
ÚZIS	Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor
VMAT	technika radioterapie (z angl. Volumetric Modulated Arc Therapy)
WPOI	invazivní růst nádoru (z angl. Worst Pattern Of Invasion)
XST	technika navádění svazku záření (z angl. Xsight Spine Tracking)

## 2 ÚVOD

Nádory hlavy a krku reprezentují významnou skupinu maligních onemocnění, jejichž incidence má celosvětově vzrůstající trend. Přestože rizikové faktory, spojené se vznikem těchto nádorů, byly identifikovány a podrobně popsány, cíle primární prevence stále nejsou uspokojivě naplněny. Velkou měrou k tomu přispívají psychosociální faktory závislosti na nikotinu a alkoholu, které jsou obtížně řešitelné a nelze je zcela eliminovat. Druhým významným faktorem je pandemie HPV infekce, která v uplynulých letech významně přispívá k vzrůstající incidenci karcinomů orofaryngu. Na tuto skupinu by se v budoucnu pravděpodobně mohla zaměřit primární prevence očkováním. Na rozdíl od primární prevence, která je alespoň částečně úspěšná, sekundární prevence u nádorů hlavy a krku selhává. Absence screeningových programů v kombinaci s mnohdy limitní kompliancí rizikových osob má za následek diagnostiku pokročilých stádií onemocnění. Tento jev se promítá do celkových výsledků léčby, které jsou u pokročilých stádií onemocnění neuspokojivé. Terciární prevence se tak stává klíčovou oblastí klinického a vědeckého zájmu. Přestože radikální léčba pokročilých karcinomů hlavy a krku zaznamenala v posledních letech trend personalizace postupů, celkové výsledky léčby nejsou uspokojivé a jsou doprovázeny vyšší mírou recidiv. V této souvislosti je žádoucí nalezení prognostických faktorů aplikovatelných v terciární prevenci, k identifikaci rizikových pacientů ohrožených selháním léčby. S využitím těchto faktorů by mohly být optimalizovány léčebné a dispenzární protokoly, což by mohlo pomoci zvrátit nepříznivé výsledky léčby. Recentně publikované studie zabývající se problematikou imuno-onkologie naznačují nové možnosti využití imunitních biomarkerů k odhadu prognózy pacientů se zhoubnými nádory.

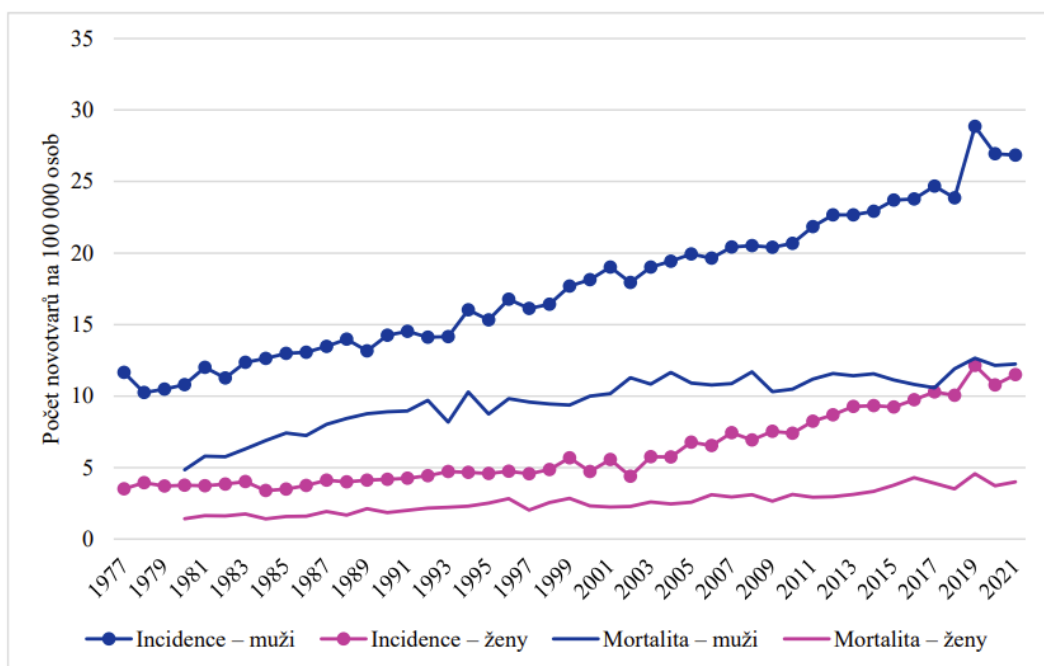
Na základě těchto zjištění jsme zahájili studii s cílem identifikovat prognostické biomarkery u pacientů se skvamózním karcinomem hlavy a krku (HNSCC) a ověřit jejich potenciál v terciární prevenci tohoto onemocnění.

## 2.1 OBECNÉ CHARAKTERISTIKY NÁDORŮ HLAVY A KRKU

### 2.1.1 Epidemiologie nádorů hlavy a krku

Zhoubné nádory hlavy a krku reprezentují v Evropě přibližně 4–5 % z celkového počtu nově diagnostikovaných nádorů. Celosvětově se tyto nádory řadí na šestou pozici s incidencí 650 000 nově diagnostikovaných případů za rok. <sup>(1)</sup> Geografický výskyt nádorů je charakteristický vzrůstajícím trendem směrem od severských oblastí ke Středomoří. Nižší výskyt je ve Finsku, Itálii, Španělsku, v Anglii a Švédsku (2–10 / 100 000 obyvatel). Naopak Francie patří mezi země s nejvyšší incidencí, která dosahuje až 50 nových případů na 100 000 obyvatel. <sup>(2)</sup> Rozdíly ve výskytu jsou také u pohlaví. Muži onemocní přibližně 3× častěji než ženy. V České republice dle údajů ÚZIS, platformy NZIS, z roku 2021 dosahovala incidence nádorů hlavy a krku 19,1 nových případů na 100 000 obyvatel, přičemž převažoval výskyt u mužů v porovnání s ženami v poměru 2,3 : 1. V rámci mezinárodního srovnání v Evropě se Česká republika řadí na 18. místo v incidenci nádorů hlavy a krku. <sup>(3)</sup> Věkové zastoupení pacientů, u kterých jsou tyto nádory nejčastěji diagnostikovány, reprezentují osoby v rozmezí 55–74 let. Dle ÚZIS bylo v letech 2017–2021 v České republice až 50 % pacientů s nově diagnostikovaným nádorem hlavy a krku ve věku 57–72 let. Vývoj incidence těchto nádorů má v časovém horizontu celosvětově vzrůstající trend. Mimo to je zaznamenán vzrůstající počet nádorů diagnostikovaných jako duplicitní nádory po primární úspěšné onkologické léčbě.





**Obrázek 1: Vývoj incidence a mortality nádorů hlavy a krku v ČR\* pro diagnózy C00–C14, C30–31 dle pohlaví, přepočten na 100 000 osob; \* Zdroj dat – ÚZIS, NZIS**

### 2.1.2 Etiologie

V etiologii nádorů hlavy a krku se uplatňují především chemické, fyzikální a biologické faktory. Chronická expozice těmto faktorům je obvykle asociována s rozvojem nádorového onemocnění. Ze skupiny chemických faktorů jsou klinicky významné především látky obsažené v tabákových listech, alkohol a alkaloidy z tzv. betelového sousta. Kouř vznikající hořením tabákových listů obsahuje více než 4 000 chemických substancí, z nichž 43 jsou prokázány karcinogeny a další představují kokarcinogeny, mutageny a promotory chronického zánětu. Během žvýkání tabákových listů ve formě tzv. snus nebo dipping tobacco dochází k expozici 28 silným karcinogenům, které zvyšují riziko vzniku nádorů dutiny ústní. <sup>(4)</sup> V Indonésii je pro své stimulační účinky podobné amfetaminům hojně používáno tzv. betelové sousto.

Skládá se ze svitku betelového listu s plodem arekové palmy, listu tabáku a hřebíčku, nebo muškátového oříšku. Pravidelné žvýkání betelového sousta působí chronické zánětlivé změny sliznice dutiny ústní, které v kombinaci s uvolňovanými karcinogeny z listů vedou ke vzniku nádorů v této lokalitě. <sup>(5, 6)</sup> Alkohol působí jako kokarcinogen, který v přítomnosti hlavních karcinogenů zvyšuje jejich účinky na zdravé tkáně. <sup>(7)</sup> Mimo tyto účinky působí alkohol imunosupresivně na funkce imunitního systému jedince, a snižuje tak obranyschopnost vůči účinkům karcinogenů. Konzumace alkoholu a destilátů zvyšuje riziko rozvoje nádoru 2–6×, zatímco samotné kouření přibližně 20–25×. V případě kombinace kouření i pravidelné konzumace alkoholu je výsledné riziko 40násobně vyšší. Ze skupiny chemických látek lze dále jmenovat arsen, azbest, aromatické uhlovodíky, saze, dehet či výpary z chemických barviv. Opakovaná či dlouhodobá expozice těmto substancím rovněž zvyšuje riziko maligního zvratu. Z fyzikálních faktorů je rizikové především mechanické dráždění zubní protézou a expozice ionizujícímu záření. Na definitivním výsledku procesu kancerogeneze se však ve většině případů podílí kombinace výše zmiňovaných faktorů, přičemž z velké míry k němu přispívá životní styl pacientů. Zejména častá konzumace alkoholu a kouření v kombinaci s malhygienou dutiny ústní, chronickými záněty sliznic, malnutricí, hypovitaminózou a imunosupresí zařazují pacienty do velmi vysokého rizika ve vztahu k rozvoji nádoru.

Samostatnou skupinu rizikových faktorů představují infekce onkogenními viry, konkrétně lidským papilomavirem (HPV) a virem Epstein-Barrové. Byla prokázána asociace mezi infekcí HPV sérotypy 6, 11 a 16 a rozvojem skvamózního karcinomu orofaryngu. <sup>(8),(9)</sup> Celosvětově je zaznamenán globální trend vzrůstající incidence HPV asociovaných orofaryngeálních karcinomů v průběhu posledních několika dekad. <sup>(10)</sup> Analýza výsledků studií případů a kontrol naznačuje, že převážná většina (90 %) HPV infekcí orofaryngu je získána pohlavním stykem, resp. byla nalezena silná asociace mezi praktikováním orálního sexu (např. počtem partnerů) a prevalencí HPV orální infekce. V klinických studiích hodnotících partnerské páry byla rovněž prokázána asociace mezi identickým typem HPV orální infekce a infekce v oblasti genitálu partnera. Mimo to všechny typy orálního sexu (oro-orální, oro-genitální i oro-anální) jsou spojeny s vyšším rizikem získání orální HPV infekce. <sup>(11)</sup>

V rámci celosvětového výskytu se tak HPV asociované karcinomy významně podílí na vzrůstající incidenci nádorů hlavy a krku.

Druhým zmiňovaným agens je virus Epstein-Barrové (EBV), u kterého byla prokázána asociace mezi infekcí a vyšším rizikem rozvoje nasofaryngeálního karcinomu. <sup>(12)</sup> Charakteristický je endemický výskyt tohoto karcinomu v některých středomořských a asijských zemích, kde lze v rámci screeningu onemocnění testovat titr protilátek proti EBV u rizikové skupiny jedinců.

### **2.1.3 Histologie**

Skupina nádorů hlavy a krku sdružuje několik histologických variant v závislosti na typu tkáně, ze které nádor vychází. V klasifikaci se proto rozlišují nádory epiteliální, mesenchymální, neuroektodermální. Dominantní zastoupení zauímají epiteliální nádory. V této skupině je nejčastější histologickou variantou skvamózní karcinom (head and neck squamous cell carcinoma; HNSCC), diagnostikovaný až v 90% případů. <sup>(13)</sup> Následují epiteliální nádory nasofaryngu a jejich varianty – keratinizující, bez keratinizace, nízce diferencované, anaplastické či s lymfocytární infiltrací tzv. lymfoepiteliomy. Samostatnou skupinu reprezentují nádory velkých a malých slinných žláz s variantami adenokarcinomu, adenoidně cystického karcinomu a mukoepidermoidního karcinomu s četností přibližně 5 %. Vzácné histologické varianty ze skupiny mesenchymálních a neuroektodermálních nádorů zastupují v 1–3 % nádory olfaktorického nervu (estezoneuroblastom), neuroendokrinní karcinomy a sarkomy. Mezi ostatní histologické varianty jsou řazeny sinonasální karcinomy, verukosní karcinomy, dediferencované karcinomy, melanomy a germinální tumory. Oblast hlavy a krku je rovněž místem manifestace sekundárních novotvarů a jejich metastáz. K častým histologickým variantám patří metastázy adenokarcinomy jícnu, žaludku, plic a prsu nebo primární kožní nádory – maligní melanomy či hematologické malignity – maligní lymfomy.

## 2.2 DIAGNOSTIKA NÁDORŮ HLAVY A KRKU

### 2.2.1 Diagnostické postupy a vyšetření

V diagnostice nádorů v oblasti hlavy a krku se uplatňují neinvazivní postupy fyzikálního vyšetření a zobrazovacích metod s invazivními a endoskopickými metodami. Z fyzikálního vyšetření je nezastupitelné otorhinolaryngologické vyšetření, během kterého jsou pomocí aspekce, palpce a endoskopie zhodnoceny a vyšetřeny jednotlivé anatomické lokality hlavy a krku. Suspektní maligní léze jsou indikovány k dalšímu invazivnímu došetření, resp. histologické verifikaci. Ta je obvykle prováděna excizní, či klešťovou biopsií.

### 2.2.2 Zobrazovací vyšetření

Při potvrzení malignity je v rámci dalšího diagnosticko-terapeutického algoritmu nutné přesné stanovení rozsahu onemocnění, tzv. stádia. Za tímto účelem jsou indikována zobrazovací vyšetření, přičemž je preferováno využití kombinace několika zobrazovacích metod. Standardní metodou v diagnostice nádorů hlavy a krku je výpočetní tomografie (CT), konkrétně kontrastní CT vyšetření. Toto vyšetření umožňuje posouzení rozsahu nádorové infiltrace, včetně invaze do přilehlých zdravých tkání, orgánů či skeletu. Pomocí CT je rovněž hodnoceno metastatické postižení regionálních lymfatických uzlin v jednotlivých etážích krku. Mezi radiologické známky metastatického postižení uzlin patří změna elipsoidního tvaru v oválný, sycení kontrastní látkou, nehomogenní – hypodenzní střed lymfatické uzliny, velikost větší než 1 cm v krátké ose a paket tří a více uzlin. <sup>(14, 15)</sup> U pacientů s nádory orofaryngu a dutiny ústní může být diagnostická přesnost CT vyšetření limitována přítomností artefaktů a stínů amalgamových zubních výplní. Zejména při posuzování rozsahu nádorové infiltrace v oblasti přechodu měkkého a tvrdého patra či hrany jazyka. V těchto případech je optimální kombinace CT a magnetické rezonance (MR). Vyšetření MR umožňuje z části filtrovat artefakty amalgamu a v porovnání s CT vyšetřením dosahuje vyšší rozlišovací schopnosti při hodnocení nádorové infiltrace v měkkých tkáních. <sup>(16)</sup> U pokročilých nádorů jsou zobrazovací vyšetření cílena také na oblast hrudníku a dutiny břišní k vyloučení distantních metastáz plic, skelet a jater. Obvykle je kombinováno kontrastní CT vyšetření plic a sonografické vyšetření břicha.

### **2.2.3 Metody nukleární medicíny**

V diagnostice nádorů hlavy a krku lze využít také metody nukleární medicíny. Konkrétně 18-fluordeoxyglukózová pozitronová emisní tomografie (FDG-PET/CT) má vyšší senzitivitu v primární diagnostice a detekci distantních a uzlinových metastáz v porovnání se standardními zobrazovacími metodami (CT, sonografie). Toto vyšetření je také indikováno u pacientů po radikální nechirurgické léčbě (radioterapii) ke zhodnocení regresivních změn v nádoru a vyloučení perzistence viabilního nádorového rezidua. Mimo tyto indikace byla rovněž prokázána účinnost FDG-PET/CT v detekci relapsů onemocnění po předchozí radikální léčbě. <sup>(17)</sup>

### **2.2.4 Stanovení stádia onemocnění**

Výsledkem komplexního diagnostického postupu je přesné stanovení stádia onkologického onemocnění, na základě kterého je indikována optimální strategie léčby. Pro účely standardizace hodnocení stádií onkologických onemocnění je v klinické praxi využívána TNM klasifikace. Jednotlivé zkratky v názvu klasifikace reprezentují rozsah a velikost nádoru (T), přítomnost metastáz v lymfatických uzlinách (N) či distantních metastáz (M). Rozlišuje se klinická klasifikace, stanovená na základě biopsie tumoru a zobrazovacích vyšetření, a patologická klasifikace, stanovená na základě definitivní histologii po radikálním onkochirurgickém výkonu. Kombinací jednotlivých parametrů T, N a M jsou definována čtyři stádia (I–IVa-c) onemocnění. Stádia I/II reprezentují lokalizované nádory bez přítomnosti metastáz. Pro stádia III/IV jsou charakteristické lokálně pokročilé nádory s metastatickým postižením lymfatických uzlin, případně s přítomností distantních metastáz u stádia IVc. Aktuálně je používána 8. revidovaná verze TNM klasifikace z roku 2017. <sup>(18)</sup>

## **2.3 PRINCIPY RADIKÁLNÍ LÉČBY SKVAMÓZNÍCH KARCINOMŮ HLAVY A KRKU (HNSCC)**

### **2.3.1 Posouzení stavu, doporučení multidisciplinárního týmu**

Pro stanovení optimální strategie léčby a volby léčebné modality je nutné komplexní posouzení všech faktorů, které mohou ovlivnit průběh léčby i její konečný výsledek. Kromě základních charakteristik nádoru, tzn. histologického typu, lokality a stádia nádorového onemocnění, je důležité zhodnocení výkonnostního stavu pacienta a jeho přidružených onemocnění. Klinicky významným faktorem je stav nutriční pacienta a porucha příjmu potravy, které mohou být způsobeny maligním onemocněním a životním stylem. Především životní styl, nízký sociální status, závislost na alkoholu a malnutrice jsou mnohdy společnými faktory pacientů s nádory hlavy a krku, které negativně ovlivňují celkové léčebné výsledky. V neposlední řadě je důležitá compliance pacienta k léčbě, jeho postoj a preference, sociální a logistické faktory. Všechny výše uvedené faktory jsou hodnoceny týmem lékařů, specialistů na tzv. multidisciplinárním týmu a jsou korelovány s nálezy ze zobrazovacích vyšetření, fyzikálních vyšetření a endoskopickým nálezem. Výstupem z multidisciplinárního týmu, jehož členy jsou otolaryngologové, stomatologové, radiční onkologové a radiodiagnostici, je doporučení o definitivní strategii léčby a volbě optimální léčebné modality. V kurativní léčbě lze indikovat chirurgickou resekci tumoru, nebo radikální radioterapii, resp. radiochemoterapii. Volba daného postupu závisí na již uvedených faktorech, na jejich zhodnocení a doporučení multidisciplinárního týmu.

### **2.3.2 Léčba časných, lokalizovaných stádií (stádia I–II)**

Časná stádia onemocnění jsou definována nádory menších rozměrů, dobře ohraničených, nepřesahujících příslušnou anatomickou oblast hlavy a krku. Jedná se o nádory, které nezakládají metastázy do regionálních lymfatických uzlin a svým invazivním růstem nezasahují do hlouběji uložených anatomických struktur, svalových komplexů, skeletu či přilehlých orgánů (slinných žláz, štítné žlázy). V radikální léčbě těchto stádií lze volit mezi invazivní chirurgickou resekci, nebo neinvazivními technikami radioterapie, přičemž obě léčebné modality dosahují srovnatelných výsledků. U menších nádorů dobře přístupných k vyšetření a resekci, je obvykle preferována chirurgická léčba. <sup>(19)</sup>

Naopak u nádorů lokalizovaných v anatomických lokalitách, kde by funkční a kosmetický výsledek chirurgické léčby negativně ovlivnil kvalitu života pacientů, je preferována neinvazivní léčba technikami radioterapie. Zejména u časných stádií nádorů laryngu (hlasivek) nebo HPV asociovaných nádorů orofaryngu (kořene jazyka, měkkého patra), je chirurgická léčba zatížena vyšším rizikem alterace či ztráty hlasu nebo rozvojem polykacích potíží (dysfagií). Radikální radioterapie v těchto indikacích dosahuje v porovnání s chirurgickou léčbou srovnatelných výsledků s nižší toxicitou a zachováním funkce orgánu. <sup>(20)</sup> V neposlední řadě mají velký vliv na volbu konkrétního léčebného postupu preference pacienta, jeho compliance, výkonnostní stav a přidružená onemocnění.

### **2.3.3 Léčba lokoregionálně pokročilých stádií (III-IVB)**

Lokoregionálně pokročilé nádory jsou charakteristické svým invazivním růstem, lokální pokročilostí a metastatickým potenciálem, resp. postižením regionálních lymfatických uzlin. V porovnání s časnými stádii onemocnění je celkový objem nádorové masy znatelně větší, což má vliv na biologické chování, růstovou rychlost a agresivitu nádorů. Současně s narůstajícím objemem nádorové masy dochází vlivem patologické angiogeneze k nedostatečnému cévnímu zásobení směrem od periferie do centrální části tumoru. Následkem hypoperfuze a nedostatečné oxygenace tkáně, dochází k změně metabolických procesů a rozvoji acidózy v nádorovém mikroprostředí. Na tyto změny se nádorová buněčná populace postupně adaptuje selekcí klonu buněk s vyšší růstovou aktivitou, agresivitou, metastatickým potenciálem i rezistencí k léčbě. <sup>(21)</sup> V radikální léčbě jsou proto preferovány multimodální přístupy, které cílí na eliminaci všech nádorových buněk, zejména rezistentních klonů, zvyšujících riziko relapsu onemocnění a selhání léčby.

#### **2.3.3.1 Multimodální léčebné postupy**

Preferovaným léčebným postupem je obvykle kombinace chirurgické resekce s následnou pooperační radioterapií lůžka tumoru a regionálních uzlinových etází na krku. Ke zvýšení účinnosti radioterapie je současně (konkomitantně) aplikována chemoterapie – cisplatina. Výsledky klinických studií potvrdily efekt této kombinace na zlepšení lokální kontroly, oddálení doby do progresu i do vzniku distantních metastáz. <sup>(22)</sup>

V metaanalýze publikované Pignonem a kolektivem autorů byl prokázán efekt konkomitantní radiochemoterapie, reprezentovaný 6,5% zlepšením pětiletého celkového přežití pacientů. <sup>(23)</sup> Vyšší účinnost kombinované léčby je však doprovázena vyšší mírou nežádoucích účinků. Především nefrotoxické účinky cisplatiny jsou klinicky významné z pohledu rizika rozvoje akutní renální insuficience. Zahájení pooperační léčby je optimální po kompletním zhojení ran a resekčních ploch z důvodů minimalizace rizika komplikací (zánětu, dehiscence ran atd.) Současně by však měla být léčba zahájena nejpozději do 7 týdnů od operace. V retrospektivní analýze souboru 41 291 pacientů léčených pooperační radioterapií, resp. radiochemoterapií, byl prokázán vliv časového faktoru na progresivní zhoršení celkového přežití pacientů, léčených v odstupu > 7 týdnů od operace. <sup>(24)</sup> Pacienti, kteří nejsou vhodnými kandidáty k primární chirurgické léčbě, jsou indikováni k definitivní radiochemoterapii (RCHT) nebo radioterapii (RT). Obvykle se jedná o skupinu pacientů s pokročilými nádory, které přesahují hranice několika anatomických oblastí krku, a nádory, které zasahují do přilehlých zdravých tkání a orgánů (např. a. carotis interna, krční jícen, prevertebrální fascie, chiasma opticum). Dále jsou to pacienti s nízkým výkonnostním stavem, četnými komorbiditami, špatným stavem nutrice a pacienti, kteří preferují neinvazní léčebné postupy. Účinnost radiochemoterapie v léčbě pokročilých stádií HNSCC potvrzují dlouhodobé výsledky publikovaných klinických studií. <sup>(25, 26)</sup> U pacientů s kontraindikací podání konkomitantní chemoterapie jsou preferovány alterované frakcionační režimy. Hyperfrakcionovaná, eventuálně akcelerovaná radioterapie s dávkovou eskalací umožňuje dosažení srovnatelných výsledků, resp. lokoregionální kontroly nádoru v porovnání s konkomitantní radiochemoterapií. <sup>(27)</sup>

## 2.4 DISPENZARIZACE PACIENTŮ PO RADIKÁLNÍ LÉČBĚ

Dispenzarizace pacientů po absolvování radikální léčby je nedílnou součástí komplexního algoritmu péče o onkologického pacienta. Pravděpodobnost relapsu onemocnění v případě pokročilých nádorů dosahuje 25–50 % během následujících 5 let po léčbě. <sup>(28)</sup> Sekundární nádorové onemocnění se vyskytuje ve 3–5 % případů ročně, zejména u pacientů, kteří pokračují v kouření a konzumaci alkoholu. <sup>(29)</sup>



Hlavním cílem je proto časná diagnostika relapsu, eventuálně duplicitního onemocnění a zahájení léčby. Součástí dispenzárních protokolů je také hodnocení nežádoucích účinků léčby, které negativně ovlivňují kvalitu života pacientů.

V tomto kontextu nabývají nejvyššího klinického významu pozdní změny, resp. dlouhodobá toxicita léčby. Hypotyreóza indukovaná léčbou, je diagnostikovaná až u 40% pacientů, <sup>(30)</sup> dysfagie a xerostomie těžkého stupně u cca 10 % pacientů a osteonekrosa dolní čelisti u cca 5 % pacientů. <sup>(31)</sup> Během dispenzárních kontrol jsou proto kombinovány metody laboratorní diagnostiky, zobrazovacích vyšetření a fyzikálního vyšetření, včetně endoskopie, za účelem dosažení maximální přesnosti a výtěžnosti. Doporučená minimální délka sledování je 5 let. <sup>(32)</sup> Frekvence kontrol a indikací vyšetření je během prvních dvou let vyšší, vzhledem k vyšší pravděpodobnosti relapsů onemocnění. Dle mezinárodních doporučení by měly dispenzární kontroly probíhat během prvních dvou let v intervalech 2–4 měsíců. Následně každých 6 měsíců do celkové délky sledování 5 let. <sup>(33)</sup> Pacient by měl být sledován v centru specializované péče, optimálně multidisciplinárním týmem, jehož členové jsou kromě onkologů a otorinolaryngologů také foniatři, nutriční specialisté a stomatologové. Důležitou součástí dispenzární péče je edukace pacienta o symptomech, které mohou upozorňovat na riziko recidivy onemocnění (bolesti, dysfagie, dysfonie). Včasná diagnostika relapsu onemocnění může ovlivnit úspěšnost léčby. V neposlední řadě je nezbytná edukace pacientů o všech rizicích, souvisejících s pokračováním v kouření a pití alkoholu. Zejména o zvyšování rizika recidivy onemocnění nebo vzniku sekundárního nádoru. V kontextu této problematiky je přínosná mezioborová spolupráce s psychology, kterou lze pacientům nabídnout.

## **2.5 PREVENCE NÁDORŮ HLAVY A KRKU**

Prevence nádorů hlavy a krku je podobně jako u jiných maligních onemocnění rozdělena na primární, sekundární a terciární. Primární prevence má za cíl předcházet rozvoji nádorového onemocnění. V kontextu známých rizikových faktorů spojených se vznikem nádorů (kouření, abúzus alkoholu, špatná ústní hygiena, chronické záněty, mechanické dráždění, stravování a konzumace horkých pokrmů atd.) se proto zaměřuje na snížení expozice těmto faktorům. K tomuto účelu využívá edukaci pacientů a veřejnosti, kurzy odvykání kouření nebo léčbu závislosti na alkoholu. <sup>(34)</sup>

Navzdory postupům primární prevence incidence novotvarů nadále stoupá. Specifickou skupinou jsou HPV asociované karcinomy orofaryngu, u kterých je diskutováno použití 2-, 4- a 9-valentních HPV vakcín. Zatímco účinnost obou vakcín byla potvrzena v primární prevenci HPV asociovaného karcinomu děložního čípku, jejich použití u HPV pozitivních karcinomů orofaryngu není v současnosti podpořeno dostačnou evidencí důkazů. Nicméně, některé klinické studie naznačují potenciál jejich využití i u této skupiny nádorů. <sup>(35, 36)</sup>

Principem sekundární prevence je diagnostika časných stádií onemocnění s perspektivou snížení rizika úmrtí pacientů. U této skupiny nádorů však sekundární prevence selhává. Několik klinických studií v posledních letech opakovaně neprokázalo účinnost screeningových programů ani v případě HPV asociovaných karcinomů. <sup>(35)</sup> Pouze jedna randomizovaná klinická studie prokázala vliv vizuálního vyšetření na časnou detekci karcinomů dutiny ústní a snížení rizika úmrtí u téměř 100 000 pacientů v Indii s vysokým rizikem, tj. silných kuřáků a konzumentů alkoholu. <sup>(37)</sup>

Terciární prevence se zaměřuje na již nemocné pacienty. Jejím cílem je prevence recidivy onemocnění po radikální léčbě. Současně také zahrnuje diagnostiku a léčbu recidiv nebo sekundárních malignit. Právě včasná diagnostika recidivy nebo duplicity významně ovlivňuje možnosti další léčby i prognózu pacientů. Pro riziko sekundární malignity je typický exponenciální nárůst incidence s délkou sledování, tj. 10% po 10 letech a 25% po 15 letech od primární léčby. <sup>(38)</sup> Standardní dispenzární protokol po radikální léčbě využívá výhradně kombinaci zobrazovacích vyšetření s klinickým nebo endoskopickým vyšetřením. Laboratorní diagnostické metody jsou v terciární prevenci neúčinné. Přestože existuje nádorově specifický onkomarker SCCA pro HNSCC, jeho senzitivita je velmi nízká a z těchto důvodů se nedoporučuje jeho rutinní použití v dispenzárních protokolech. <sup>(32)</sup> Některé studie s HPV asociovanými orofaryngeálními karcinomy naznačují možnosti využití biomarkerů (nádorové DNA) stanovených ze slin pro odhad rizika recidivy onemocnění. <sup>(39, 40)</sup> V současnosti je v klinických studiích zkoumána účinnost tkáňových biomarkerů asociovaných s nádorem v predikci prognózy onemocnění a možnosti jejich použití v terciární prevenci. <sup>(41)</sup>

## 2.6 PROGNOZA PACIENTŮ S HNSCC

Výsledky radikální léčby se u pacientů se skvamózními karcinomy hlavy a krku (HNSCC) liší v závislosti na přítomnosti kombinace několika faktorů, které mohou působit negativním či pozitivní efektem. V klinické praxi jsou proto nazývány prognostickými faktory. Z výsledků observačních kohortových studií u pacientů s HNSCC bylo definováno několik prognostických faktorů, které se významně podílejí na celkových léčebných výsledcích. Efekt těchto faktorů byl vyjádřen v multivariantních analýzách silou asociace mezi přítomností faktoru a parametry přežití (celkového, nádorově specifického).<sup>(42, 43)</sup> Vzhledem k charakteristikám jednotlivých prognostických faktorů je lze rozdělit na faktory související s charakteristikami pacienta a faktory asociované s parametry nádorového onemocnění.

### 2.6.1 Prognostické faktory ve vztahu k charakteristikám pacienta

Celkový stav pacienta se značnou mírou podílí na léčebných výsledcích. V klinických studiích byly za významné prognostické faktory prokázány věk, pohlaví, výkonnostní stav a přidružená onemocnění.

#### 2.6.1.1 Věk a pohlaví

Vyšší věk pacientů je asociován s horší prognózou, přičemž v retrospektivní německé studii s 8 288 pacienty s HNSCC byl tento negativní prognostický efekt prokázán u pacientů starších 60 let.<sup>(42)</sup> Naopak u žen byla zjištěna lepší prognóza než u mužů, i přes nižší incidenci novotvarů (HNSCC).

#### 2.6.1.2 Výkonnostní stav

Výkonnostní stav pacientů ovlivňuje rozhodnutí o volbě léčebného postupu, zejména z hlediska tolerance nežádoucích účinků léčby a předpokladu úspěšné rekonvalescence pacienta. V klinické praxi je hodnocen nejčastěji pomocí klasifikace ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group), která kategorizuje pacienty škálou 6 stupňů (0–5) v závislosti na poklesu jejich výkonnostního stavu (Tabulka 1).<sup>(44)</sup> Ve vztahu k prognóze pacientů s HNSCC byl ve studiích prokázán negativní efekt nižšího výkonnostního stavu ECOG > 1 na celkovém i nádorově specifickém přežití.<sup>(45)</sup>

Stupeň	ECOG výkonnostní stav pacienta
0	Plně aktivní, schopný vykonávat všechny činnosti před onemocněním bez omezení
1	Omezený ve fyzicky namáhavé činnosti, ale pohyblivý a schopný vykonávat lehké nebo sedavé práce, např. lehké domácí práce, kancelářské práce
2	Ambulantní a schopný veškeré sebeobsluhy, ale neschopný vykonávat jakoukoli pracovní činnost; mobilní více než 50 % denní aktivity
3	Schopnost pouze omezené sebeobsluhy, upoutání na lůžko nebo židli více než 50 % denní aktivity
4	Neschopnost sebeobsluhy; úplné upoutání na lůžko nebo křeslo
5	Úmrtí

Tabulka 1: Klasifikace výkonnostního stavu dle ECOG. (Azam et al 2019)

S obecnými charakteristikami pacienta úzce souvisí i přidružená onemocnění (komorbidita). Řada těchto onemocnění významnou měrou ovlivňuje výkonnostní stav pacientů. Současně také zvyšují riziko nežádoucích účinků a komplikací během radikální léčby. Jelikož komorbidita reprezentují početnou, heterogenní skupinu onemocnění, byly vyvinuty klasifikační systémy, pomocí kterých lze hodnotit vliv komorbidit na léčebné výsledky a parametry přežití pacientů. Jedním z těchto systémů je ACE-27 (Adult Comorbidity Evaluation 27 score). V současnosti je však častěji využíván index CCI (Charlson Comorbidity Index). Validita obou klasifikačních systémů byla potvrzena v klinických studiích. Výsledky studií zdůraznily negativní prognostický potenciál přidružených onemocnění u pacientů s HNSCC. Byla nalezena asociace mezi vyššími hodnotami ACE-27 a CCI skóre a horším celkovým i nádorově specifickým přežitím. <sup>(46, 47)</sup>

### 2.6.1.3 Abúzus návykových látek a socioekonomický status

V souvislosti se skupinou prognostických faktorů souvisejících s charakteristikami pacienta jsou zařazovány rizikové faktory, které ve značné míře ovlivňují pacientův zdravotní i výkonnostní stav. Jedná se o abúzus alkoholu a nikotinu a socioekonomický status. Velká část pacientů s HNSCC pochází z nižších socioekonomických vrstev. Tito pacienti mnohdy nevěnují dostatečnou péči a pozornost svému zdravotnímu stavu. Navíc jsou u nich časté projevy závislosti na alkoholu a nikotinu.

V konečném důsledku tak tyto faktory přímo i nepřímo ovlivňují výkonnostní stav a komorbiditu pacientů, čímž negativně přispívají k celkovým léčebným výsledkům. V neposlední řadě soustavné pokračování v kouření a konzumaci alkoholu po radikální léčbě zvyšuje riziko rozvoje sekundárních nádorů.

### **2.6.2 Prognostické faktory související s parametry nádorového onemocnění**

Charakteristiky nádoru (lokalizace, objem nádoru, a histomorfologický typ) reprezentují klíčové parametry, které jsou zohledňovány v procesu optimalizace strategie léčby a volby konkrétní modality (chirurgie, radioterapie). Rozdílné výsledky radikální léčby pacientů byly v uplynulých letech podnětem pro iniciaci řady klinických studií zaměřených na hledání prognostických faktorů. Výsledky těchto studií potvrdily významný prognostický potenciál tří parametrů: lokalizace nádoru, stádia onemocnění a histomorfologických parametrů nádoru.

#### **2.6.2.1 Lokalizace nádoru**

Pro lokalizaci nádoru je charakteristický trend zhoršující se prognózy v kranio-kaudálním směru v rámci jednotlivých anatomických régií hlavy a krku. K prognosticky příznivým se řadí nádory orofaryngu. Naopak nádory spodiny dutiny ústní a hypofaryngu se vyznačují agresivním růstem a špatnou prognózou. <sup>(42)</sup>

#### **2.6.2.2 Stádium onemocnění**

Odhad prognózy pouze na základě lokalizace nádoru není přesný, jelikož nebere v úvahu vliv dalších faktorů. Stádium onemocnění bylo v klinických studiích potvrzeno jako silný prognostický faktor. Objem nádorové masy a přítomnost, resp. absence metastáz (uzlinových, viscerálních, skeletálních) významně ovlivňuje přežití pacientů. Stádia III–IVb jsou charakterizována lokálně pokročilými nádory s metastatickým postižením lymfatických uzlin. Lokální pokročilost nádoru a zejména metastatické postižení lymfatických uzlin jsou asociovány s horšími léčebnými výsledky a špatnou prognózou pacientů. V klinických studiích bylo celkové přežití pacientů se stádii III/IV až dvojnásobně kratší v porovnání se stádii I/II. <sup>(42, 43)</sup> Znamená to tedy, že například lokalizovaná stádia nádorů dutiny ústní (st. I–II) mají lepší prognózu než orofaryngeální karcinomy stádia III/IV, přestože je lokalita nádorů orofaryngu asociována s lepší prognózou.

### 2.6.2.3 Histomorfologické charakteristiky nádoru

Histomorfologické charakteristiky nádoru významnou měrou ovlivňují prognózu onemocnění a přežití pacientů. Nízký stupeň diferenciace nádoru byl v retrospektivní studii s 1 266 pacienty s HNSCC, publikované v roce 2001, asociován s rozvojem uzlinových i orgánových metastáz a kratším přežitím pacientů. <sup>(48)</sup> Podobně byl pozorován negativní efekt perineurální invaze nádoru. Některé studie naznačují, že tento parametr souvisí s rozvojem uzlinových metastáz. Obecně je však perineurální invaze hodnocena jako negativní prognostický faktor, asociovaný s horšími léčebnými výsledky. <sup>(49)</sup> V neposlední řadě přítomnost extrakapsulárního šíření nádoru v lymfatických uzlinách prokazatelně zhoršuje přežití pacientů s HNSCC. <sup>(50)</sup>

Zvláštní postavení zaujímá skupina nádorů asociovaných s infekcí lidským papilomavirem, označované jako HPV pozitivní nebo také p16 pozitivní nádory. Pro tuto skupinu nádorů je charakteristický tropismus v rámci jednotlivých lokalit hlavy a krku, ve kterých dominuje oblast orofaryngu. Méně často jsou tyto nádory diagnostikovány v hypofaryngu a ojediněle v dutině ústní či laryngu. Přítomnost exprese proteinu p16, detekovaná imunohistochemicky, je jedním z určujících morfologických rysů. Ve vztahu k prognóze byl v klinických studiích status HPV positivity prokázán jako nezávislý, prognostický faktor celkového přežití. Velká retrospektivní studie, publikovaná v roce 2021, analyzovala výsledky souboru 9 943 pacientů s HNSCC, z nichž 6 829 pacientů bylo diagnostikováno s HPV pozitivními karcinomy orofaryngu a hypofaryngu. Míra pětiletého celkového přežití u pacientů s HPV pozitivními karcinomy dosahovala 75 % v porovnání s 48 % u pacientů s HPV negativními karcinomy. Výsledky této studie potvrdily prognostický potenciál HPV statutu i jeho použitelnost v klinické praxi. <sup>(51)</sup>

Několik dalších klinických studií se soustředilo na prognostický potenciál nádorového bujení (tumor budding; TB) a hloubky invaze (depth of invasion; DOI). Oba parametry byly hodnoceny v histologických vzorcích tkání časných nádorů dutiny ústní. V případě TB nebyl prokázán jednoznačný vliv na parametry přežití pacientů, nicméně přítomnost TB byla asociována s agresivitou tumoru a invazivním růstem. <sup>(52)</sup> Podobně ani v případě DOI nebyl prokázán jednoznačný prognostický potenciál parametru ve vztahu k celkovému či nádorově specifickému přežití.

Byla však nalezena asociace mezi DOI a invazí nádoru do lymfatických cév což korelovalo se zkrácením doby přežití bez příznaků onemocnění. <sup>(53)</sup> Výsledky recentně publikovaných vědeckých prací zabývajících se morfologickými charakteristikami HNSCC prokázal negativní prognostický potenciál parametru WPOI (worst pattern of invasion). Tento parametr popisuje morfologický charakter růstu a invazi nádoru pomocí pětistupňové škály (I–V). Nekohezivní růst nádoru (typ III a IV) byl asociován s vyšším rizikem lokoregionálních relapsů a kratším přežitím bez recidivy onemocnění po primární chirurgické resekci nádoru následované adjuvantní onkologickou léčbou. <sup>(54)</sup>

#### **2.6.2.4 Mutace v nádorové tkáni**

Kromě hodnocení prognostického potenciálu standardních histomorfologických parametrů HNSCC byly prováděny také studie s molekulárně genetickou analýzou mutací v nádorové tkáni. Výsledky analýz prokázaly u části pacientů přítomnost mutace receptoru pro epidermální růstový faktor (EGFR). Současně tyto studie naznačily, že mutace může vést k horším léčebným výsledkům. V následné metaanalýze 68 studií s celkovým počtem 6 781 pacientů byl potvrzen negativní prognostický efekt EGFR mutace, reprezentovaný 50% zvýšením rizika úmrtí na malignitu. <sup>(55)</sup>

#### **2.6.3 Nové prognostické faktory**

Kromě výše uvedeného přehledu prognostických faktorů, které lze považovat za zlatý standard pro klinickou praxi, je předmětem současného výzkumu hledání nových faktorů. Zvláštní pozornost je věnována faktorům, které souvisí s funkčními charakteristikami nádorové tkáně. V tomto ohledu se jeví jako vysoce perspektivní imunitní biomarkery. Funkční zapojení imunitních buněk a signálních molekul v nádorovém mikroprostředí a jejich interakce s nádorovými elementy mohou poskytnout další cenné informace o prognóze onemocnění. Recentní výsledky výzkumu v oblasti imunoonkologie poukazují na prognostický potenciál imunitních elementů a signálních molekul v nádorovém mikroprostředí u pacientů s HNSCC.

## 2.7 ROLE IMUNITNÍHO SYSTÉMU V PATOGENEZI HNSCC

### 2.7.1 Imunitní dohled v procesu nádorového růstu

Současné vědecké poznatky v oblasti imunoonkologie zdůrazňují postavení a roli imunitního systému v procesu nádorového růstu. Podle teorie imunitního nádorového dohledu je fyziologickou funkcí imunitního systému včas rozpoznat a eliminovat maligně transformované buňky. Klíčovou roli přitom plní buněčná složka imunitní odpovědi reprezentovaná T-lymfocyty, NK buňkami a antigen prezentujícími buňkami v kombinaci s chemickými substancemi (interleukiny, cytokiny) a inhibičními signálními molekulami. Teorie imunitního dohledu je někdy také nazývána teorií 3E, podle jednotlivých fází imunitní odpovědi ve vztahu k nádorové transformaci a růstu. Jedná se o fáze eliminace, ekvilibria a úniku (escape).<sup>(56, 57)</sup> Jednotlivé fáze na sebe navzájem navazují v závislosti na progresi nádorového růstu. V průběhu každé fáze dochází k dynamickým interakcím mezi buňkami imunitního systému nemocného a nádorovými elementy.

#### 2.7.1.1 Fáze eliminace

**První fáze** imunitního dohledu je nazývána eliminací nebo také „immunosurveillance“. V průběhu této fáze dochází k aktivaci složek vrozené a adaptivní buněčné imunity. NK buňky (natural killers) a makrofágy (fagocyty) reprezentují vrozenou složku, aktivované T-lymfocyty reprezentují adaptivní složku. Celá fáze eliminace je rozdělena do čtyř dílčích fází.

V počátku první fáze dochází k stimulaci a iniciaci imunitní odpovědi vlivem poškození zdravých tkání časným nádorovým růstem, což je doprovázeno produkcí aktivních látek – interleukinů (IL-2, IL-12), interferonu gamma (IFN $\gamma$ ), tkáňovými makrofágy. Tyto substance působí aktivačně na cytotoxické T-lymfocyty (CD8+) a NK buňky a současně způsobují lokální zánět v místě nádoru se zvýšeným vychytáváním těchto aktivovaných buněk. Prozánětlivé prostředí stimuluje aktivované T-lymfocyty a NK buňky k další vyšší produkci cytokinů, zejména IFN $\gamma$ .

V dalším kroku dochází k zahájení eliminace nádorových buněk aktivovanými T-lymfocyty a NK buňkami prostřednictvím iniciace programované smrti (apoptózy) a porušením membrán tumorózních buněk pomocí lytických enzymů, tzv. perforinů.



Současně však také dochází k přímému působení cytotoxického účinku IFN $\gamma$  na nádorové buňky a zvyšování hladin chemokinů (CXCL10, CXCL9 a CXCL11). Tyto molekuly hrají klíčovou roli při indukci chemotaxe (pohybu imunitních buněk směrem k podnětu) a inhibici neoangiogeneze (novotvorby krevních cév) v místě nádoru. Makrofágy transformované v dendritické buňky, eliminují usmrčené nádorové buňky a migrují do regionálních lymfatických uzlin, přičemž na svém povrchu prezentují antigeny nádoru. Tímto způsobem umožňují zvyšovat cytotoxickou protinádorovou odpověď aktivací dalších, nových T-lymfocytů v regionálních lymfatických uzlinách. Výsledkem je exponenciální nárůst vychytávání aktivovaných T-lymfocytů a NK buněk do místa nádoru.

Nakumulované T-lymfocyty a NK buňky navzájem komunikují skrze IFN $\gamma$  a IL-12, což vede k jejich reciproční cytotoxické aktivaci. V nádorovém mikroprostředí tak vznikají silně proapoptotické podmínky. V periferních lymfatických uzlinách stimulují dendritické buňky zrání a produkci nových CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů.

Na konci první fáze eliminace se nádorové prostředí stává domovem kolonií T-lymfocytů působících cytotoxicky na přeživší reziduální nádorové buňky. Většina buněk je eliminována, avšak malá populace může přežít a přesunout se do fáze ekvilibria.

### **2.7.1.2 Fáze ekvilibrium**

Část nádorové populace se ve fázi eliminace vymyká imunitní kontrole a pokračuje v nádorovém růstu. Děje se tak kvůli postupnému rozvoji imunorezistence, která je odpovědí na kontinuální stimulovanou aktivitu T-lymfocytů a zvýšené hladiny IFN $\gamma$ . Postupem času dochází při kontinuální antigenní stimulaci nádorem k vyčerpání imunitního systému (immune exhaustion). Výsledným efektem je selekce klonu buněk s vyšší genomovou mutační náloží a agresivními růstovými rysy, které na konci fáze ekvilibria vstupují do poslední fáze, tzv. fáze úniku.

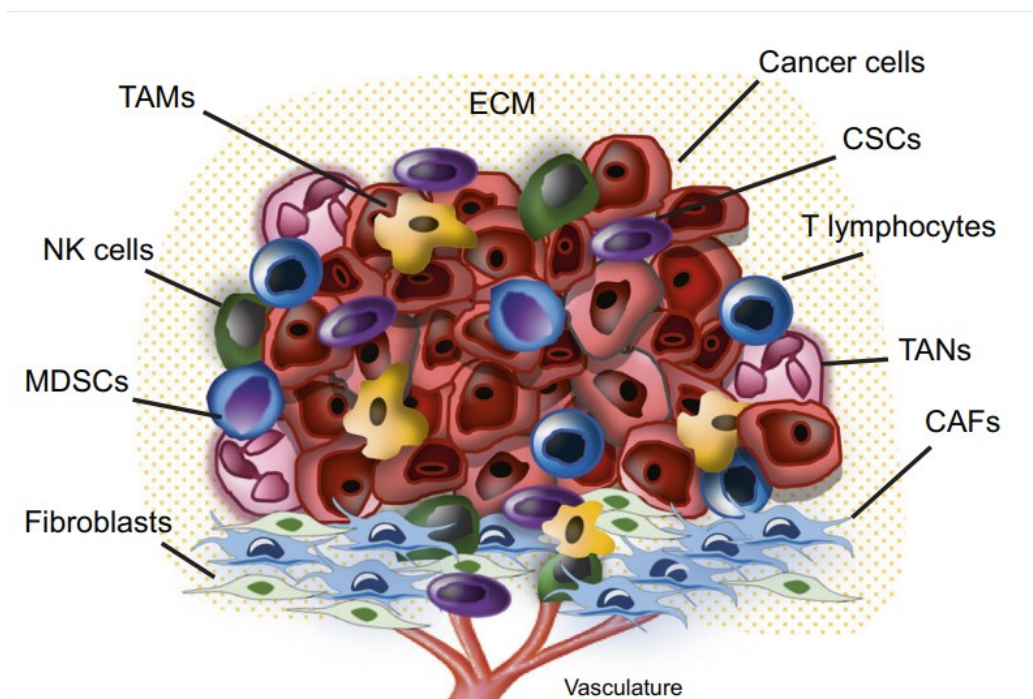
Ekvilibrium je nejdelší ze tří fází imunitního dohledu a může trvat několik let. Je to právě délka období, která umožňuje nádorovým elementům adaptovat se na imunitní mechanismy, vytvořit si rezistenci a uniknout imunitnímu dohledu.

### 2.7.1.3 Fáze escape – únik imunitnímu dohledu

V této fázi nádorové buňky pokračují ve svém expanzivním růstu. Dochází k dalšímu zvyšování genomové mutační nálože, která koreluje s růstovou aktivitou a prohlubováním imunorezistence. Rovnováha imunitního dohledu, která byla udržována ve fázi ekvilibria, je porušena ve prospěch nádorového růstu. Mechanismus úniku imunitnímu dohledu je komplexní proces několika dílčích dějů. <sup>(58)</sup> Patří k nim downregulace a ztráta exprese povrchových antigenů MHC (Major Histocompatibility Complex) I. třídy (HLA-A, HLA-B, HLA-C), jejichž přítomnost je nezbytná pro zprostředkování efektivní T-lymfocytární imunitní odpovědi. Tento mechanismus byl prokázán až u 90 % nádorů. <sup>(59)</sup> V kontrastu s downregulací klasických antigenů MHC I dochází na povrchu nádorových buněk k upregulaci nových neklasických antigenů MHC I (HLA-E, HLA-F, HLA-G), které zabráňují průběhu imunitních reakcí zprostředkovaných T-lymfocyty a také NK buňkami. <sup>(60)</sup> Všechny dílčí procesy vedou k formování nádorového mikroprostředí, ve kterém dominují imunosupresivní podmínky, umožňující nádorový růst a progresi. <sup>(61)</sup>

### 2.7.2 Nádorové mikroprostředí (TME)

Studium imunitních mechanismů v rámci patofyziologie nádorového růstu umožnilo definovat koncept nádorového mikroprostředí (TME). <sup>(61)</sup> V uplynulých letech byl tento koncept předmětem preklinického i klinického výzkumu u řady maligních nádorů, včetně skvamózního karcinomu hlavy a krku. Výsledky výzkumu umožnily nahlížet na nádorové onemocnění kromě standardních histomorfologických parametrů také funkčně, v kontextu imunitních interakcí. Současný koncept TME je definován nádorovým parenchymem, podpůrným stroma s neimunitními buňkami a imunitní komponentou (Obrázek 2).



**Obrázek 2: Grafické znázornění základních charakteristik nádorového mikroprostředí (TME);** ECM – extracelulární matrix; TAMs – makrofágy asociované s tumorem; NK cells – NK buňky; MDSCs – supresorové buňky myeloidní řady; Fibroblasts – fibroblasty; CAFs – s nádorem asociované fibroblasty; TANs – s nádorem asociované neutrofilny; T-lymphocytes – T – lymfocyty; CSCs – kmenová nádorové buňky; Cancer cells – nádorové buňky; Vasculature – cévní architektura nádorového mikroprostředí. (Elmusrati et al 2021)

### 2.7.2.1 Nádorový parenchym

Parenchym nádoru reprezentuje vlastní buněčná nádorová populace. Je charakterizována masou buněčných elementů zastoupených v různých fázích buněčného cyklu. Mitotická aktivita buněk je závislá na kombinaci stimulačních a inhibičních faktorů v nádorovém mikroprostředí. Důležité jsou také lokální podmínky v mikroprostředí, tzn. adekvátní saturace kyslíkem a prokrvení. Specifickou podskupinu buněčných elementů tvoří nádorové kmenové buňky. Vyznačují se vyšší rezistencí k léčbě a především pluripotencí. Obvykle reprezentují 10–20 % buněčné populace. <sup>(62)</sup> Funkční změny a aktivita nádorových buněk byla popsána podrobněji v rámci fáze ekvilibria a úniku imunitnímu dohledu. Mimo výše popisované změny exprese povrchových antigenů skupiny MHC disponují nádorové elementy i dalšími funkcemi. Regulují hladiny cytokinů, které se účastní aktivace cytotoxické imunitní odpovědi a přispívají tak k rozvoji imunoprese v TME.

Produkují vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF), který je mediátorem nádorové neoangiogeneze a současně také působí supresivními účinky na maturaci dendritických buněk. V neposlední řadě nádorové buňky exprimují na svém povrchu inhibiční signální molekuly (checkpointy), které plní klíčovou roli v inaktivaci cytotoxické, T-lymfocyty zprostředkované imunitní odpovědi. <sup>(63)</sup>

### **2.7.2.2 Stroma nádoru**

Nádorové stroma formuje základní nosnou strukturu pro nádorový parenchym. Morfologicky je tvořeno pojivovou tkání, cévní architekturou a nenádorovými buněčnými elementy. Základní funkcí je podpora a výživa nádorového parenchymu, kvůli které je umožněn růst nádoru a invaze do okolí. Významnou úlohu přitom plní buněčné elementy stroma, tj. fibroblasty produkující extracelulární matrix a vaskulární endoteliální buňky regulující neoangiogenezi. Architektura nově tvořené pojivové tkáně v kombinaci s neoangiogenezí vytváří optimální podmínky pro růst nových nádorových elementů. Mimo základní nosnou funkci se nádorové stroma také podílí na regulaci homeostázy v TME prostřednictvím své buněčné složky. Je to především aktivita fibroblastů a jejich schopnost produkovat růstové faktory a cytokiny, která přispívá k funkční mechanismům v TME.

Zvláště významné jsou pak fibroblasty asociované s nádorem (Cancer Associated Fibroblasts – CAFs) produkující interleukiny a chemokiny s imunosupresivními účinky. CAFs tak zvyšují mobilizaci makrofágů a neutrofilů a ovlivňují jejich transformaci v elementy s inhibiční aktivitou snižující protinádorovou, cytotoxickou imunitní odpověď. <sup>(64)</sup> Vaskulární endoteliální buňky mohou exprimovat na svém povrchu inhibiční signální molekuly (PD-L1), schopné inaktivovat cytotoxickou imunitní odpověď zprostředkovanou T-lymfocyty (CD8+). Současně však nádorové stroma umožňuje prostup imunitních elementů z periferního krevního řečiště do TME, čímž přispívá k formování imunitní komponenty TME.

### 2.7.3 Imunitní komponenta TME

Imunitní komponenta v TME plní klíčovou úlohu v procesu kontroly nádorového růstu. Obecně ji lze charakterizovat buněčnými elementy imunitního systému a nebuněčnou složkou, tzn. cytokiny a inhibičními signálními molekulami. Obě komponenty jsou navzájem propojené a jsou odpovědné za komplexní interakce s nádorovým parenchymem a stroma nádoru. Výsledným efektem těchto interakcí je regulace nádorového růstu.

#### 2.7.3.1 Buněčná složka imunitní komponenty

Buněčná složka imunitní komponenty je definována populací leukocytů s rozdílnými imunitními funkcemi a morfologickými charakteristikami. Komplexní interakce mezi buňkami jsou odpovědné za finální protinádorový efekt v TME. Pro jednotlivé elementy je typická exprese povrchových antigenů, tzv. cluster of differentiation (CD), podle kterých lze rozlišit jednotlivé buněčné fenotypy. Mezi klíčové imunitní buňky v TME patří T-lymfocyty (CD8 a CD4 pozitivní, regulační), NK buňky, antigen prezentující buňky a supresorové buňky myeloidní řady (MDSC).

**T-lymfocyty (CD8+)** reprezentují jedny z nejdůležitějších imunitních buněk v procesu protinádorové imunitní odpovědi. Jsou schopné rozpoznat cizí antigeny (nádorové) v komplexu s vlastními molekulami MHC I. třídy a aktivovat cytotoxickou imunitní odpověď, která vede k eliminaci nádorové buňky. K aktivaci je obvykle nutná interakce s antigen prezentujícími buňkami pomocí vazby receptoru CD28 na T-lymfocytech s ligandy CD80 a CD86 na antigen prezentujících buňkách. Tento mechanismus představuje tzv. adaptivní složku buněčné imunitní odpovědi.

K eliminaci buněk využívají aktivované CD8+ T-lymfocyty enzymatické komplexy – perforiny, granzymy a granulysiny, které poruší biomembránu buňky a iniciují její programovanou smrt (apoptózu) aktivací nitrobuněčných enzymů (kaspáz). Alternativní variantou iniciace apoptózy je vazba ligandu FasL exprimovaného na povrchu T-lymfocytu s receptory Fas na nádorové buňce. Oba mechanismy jsou vysoce účinné a uplatňují se ve fázi eliminace a ekvilibria procesu imunitního dohledu nádorového růstu (viz teorie 3E). Avšak protrahovaná hyperstimulace nádorovými antigeny v kombinaci s narůstající imunopresí v TME během fáze ekvilibria vede k postupnému vyčerpání, tzn. T-cell exhaustion.

Obvykle mu předchází fáze částečného vyčerpání (pre-exhaustion), trvající 30–40 dnů. Po uplynutí této doby se CD8<sup>+</sup> T-lymfocyty diferencují do terminálního stádia vyčerpání, doprovázeného aktivací apoptózy. <sup>(65)</sup> Výsledkem těchto dějů je přechod fáze ekvilibria do fáze úniku neboli selhání imunitního dohledu. Kromě těchto protinádorových účinků, plní CD8<sup>+</sup> T-lymfocyty i další funkce. Identickými mechanismy chrání organismu před intracelulárními patogeny, tzn. viry, parazity a bakteriemi, které ke své reprodukci využívají hostitelskou buňku. Za fyziologických podmínek také pomáhají formovat periferní imunotoleranci vůči zdravým tkáním při vývoji imunitního systému novorozenců.

**T-lymfocyty (CD4<sup>+</sup>)** jsou také nazývány pomocnými neboli „helpers“ T-lymfocyty. Jejich hlavní funkcí je posílení a stimulace cílené imunitní odpovědi na antigen. K tomu dochází při interakci CD4<sup>+</sup> T-lymfocytů s antigen prezentujícími buňkami. Aktivita CD4<sup>+</sup> T-lymfocytů v TME napomáhá rozpoznání nádorových antigenů, čímž dochází nepřímo ke zvyšování cytotoxické protinádorové imunitní odpovědi zprostředkované CD8<sup>+</sup> T-lymfocyty. Populace CD4<sup>+</sup> T-lymfocytů se vlivem stimulace interleukinů může dále diferencovat ve dva podtypy (Th1 a Th2), které se odlišují svou funkční aktivitou a zapojením v imunitních mechanismech. Fenotyp Th1 se diferencuje z původního CD4<sup>+</sup> T-lymfocytu vlivem účinků interleukinu IL-12. Aktivně posilují CD8<sup>+</sup> cytotoxickou imunitní protinádorovou odpověď prostřednictvím zvýšené produkce IL-2, IFN $\gamma$  a stimulací antigen prezentujících buněk. Naopak fenotyp Th2 se diferencuje vlivem účinku IL-4. Působí jako inhibitor aktivity antigen prezentujících buněk a potlačují diferenciaci subpopulace Th1 fenotypu. Modulují intenzitu i průběh cytotoxické imunitní odpovědi, aby nedošlo k její excesivní aktivaci, která by mohla způsobit tkáňové poškození.

**FOXP3 T-lymfocyty (Treg)** se diferencují z CD4<sup>+</sup> T-lymfocytů působením interleukinu IL-2. Hlavním identifikačním znakem je exprese kombinace povrchových antigenů CD4 a CD25. Pro své funkční charakteristiky jsou označovány také jako regulační lymfocyty (Treg). Treg lymfocyty kontrolují intenzitu a průběh imunitních reakcí a zabraňují rozvoji autoimunitní odpovědi. V TME působí tato populace lymfocytů imunosupresivně na aktivované CD8<sup>+</sup> T-lymfocyty produkcí cytokinů IL-10, IL-35 a TGF- $\beta$ .

Dlouhodobá expozice těmto cytokinům může vést až k vyčerpání, resp. T-cell exhaustion. Aktivované Treg navíc mohou na svém povrchu exprimovat inhibiční signální molekuly, a prohlubovat tak imunosupresivní podmínky v TME.

**NK buňky (Natural Killers)** reprezentují přirozenou složku buněčné imunity v TME. Podobně jako CD8<sup>+</sup> T-lymfocyty mají schopnost eliminovat nádorové buňky pomocí cytotoxické enzymatické aktivity perforinů a granzymů. Díky tomu představují druhou nejvýznamnější populaci buněk v TME. V porovnání s CD8<sup>+</sup> T-lymfocyty však ke své aktivaci, rozpoznání a eliminaci nádorových elementů nevyžadují přítomnost exprese povrchových antigenů MHC. Přesto, že NK buňky převážně osidlují stromální komponentu TME, nejsou běžně patrné v přímé blízkosti nádorových buněk. V posledních letech přibývají důkazy, že se NK buňky také nepřímo podílejí na aktivaci adaptivní imunity prostřednictvím sekrece cytokinů (IFN $\gamma$ , IL-2, IL-12). Zejména zvýšené hladiny IFN $\gamma$  stimulují infiltraci Th1 buněk do TME, a pozitivně tak ovlivňují cytotoxickou aktivitu CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů. <sup>(66)</sup>

**Antigen prezentující buňky (APC)** jsou specifickou skupinou buněk v TME, které propojují přirozené a adaptivní složky buněčné imunity. Vznikají transformací z monocytů z periferní žilní krve po vstupu do tkání. Rozpoznávají cizorodé antigeny (včetně nádorových) a apoptotická tělíska umírajících buněk, fagocytují je a následně je prezentují na svém povrchu společně s molekulami MHC I a II. Expese antigenů v komplexu s MHC molekulami umožňuje jejich rozpoznání naivními efektorovými CD8<sup>+</sup> T-lymfocyty a aktivaci cytotoxické imunitní odpovědi. Navíc APC buňky produkují cytokiny (IL-2, IL-6), které moduluje průběh cytotoxické imunitní odpovědi regulací aktivity Th1/2 CD4<sup>+</sup> T-lymfocytů a Treg lymfocytů. Celkově tedy APC buňky významně ovlivňují intenzitu a průběh imunních reakcí v TME.

APC buňky, které po navázání antigenu migrují z TME do regionálních lymfatických uzlin, kde stimulují maturaci CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů, jsou nazývány dendritickými buňkami. Naopak APC setrvávající v TME a stimulující cytotoxickou odpověď jsou označovány jako tkáňové makrofágy. <sup>(66)</sup>

Specifickou variantou tkáňových makrofágů jsou makrofágy asociované s nádorem (Tumor Associated Macrophages; TAMs). Tento buněčný typ se vyznačuje imunosupresivní aktivitou, která inhibuje cytotoxickou imunitní odpověď a stimuluje nádorový růst, angiogenezi a metastazování. V iniciálních fázích nádorového růstu se předpokládá malý podíl TAMs. Avšak ve fázi úniku imunitního dohledu a vysoké imunosuprese v TME se předpokládá převaha makrofágů podtypu TAMs, které významně ovlivňují agresivitu nádoru, angioinvazi a metastatický potenciál. <sup>(67)</sup>

**Supresorové buňky myeloidní řady (MDSCs)** jsou heterogenní skupinou nezralých buněk myeloidní řady, převážně monocytární. Do TME jsou zvýšeně vychytávány vlivem účinků cytokinů (IL-1, IL-6, IL-10) a růstových faktorů (G-CSF a VEGF). V TME plní řadu funkcí, avšak mezi nejdůležitější z pohledu kontroly nádorového růstu patří podpora angiogeneze a stimulace Treg a Th2 lymfocytů. Navíc MDSCs produkují aminokyseliny cystein a arginin, které ovlivňují aktivitu APC a znemožňují tak aktivaci CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů. Arginin je dále v TME metabolizován na reaktivní formy kyslíku a dusíku, které dále působí imunosupresivně na T-lymfocyty. V neposlední řadě exprimují MDSC na svém povrchu inhibiční signální molekuly (PD-L1), které významně inhibují aktivitu T-lymfocytů. <sup>(68)</sup>

**Neutrofilly asociované s nádorem (TANs)** jsou patrné u mnoha solidních nádorů, včetně HNSCC. V TME vykazují ambivalentní aktivitu a jsou schopny stimulovat růst nádorů, ale také potencovat aktivitu CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů. V klinických studiích byl u těchto buněk prokázán negativní prognostický potenciál při hodnocení jejich poměru ve vztahu k lymfocytům pomocí tzv. NLR (neutrophil-to-lymphocyte ratio). Zvýšený poměr NLR doprovázel nepříznivé výsledky léčby a přežití pacientů s HNSCC. <sup>(69)</sup>

### 2.7.3.2 Nebuněčná složka imunitní komponenty

Je definována skupinou molekul, které zprostředkují komunikaci mezi buněčnými elementy v TME. Současně tzv. chemotaxí ovlivňují zastoupení počtu jednotlivých podtypů imunitních buněk i jejich influx z cévního řečiště do TME. Důležité jsou však zejména z pohledu jejich funkčního zapojení v TME, v rámci kterého regulují průběh a intenzitu komplexních imunitních interakcí. Velmi obecně je lze rozdělit do dvou skupin, tzn. cytokiny a inhibiční signální molekuly s kontrolními body.



**Cytokiny** reprezentují velkou skupinu nízkomolekulárních peptidů, jejichž hlavní funkcí je regulace migrace buněk a modulace imunitních dějů na buněčné úrovni. V procesu kontroly nádorového růstu a imunitního dohledu mají největší význam tzv. interleukiny neboli IL-1, IL-2, IL-6, IL-10 a IL-12, cytokiny ze skupiny interferonů (IFN $\gamma$ ), tumor nekrotizujících faktorů (TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ ) a transformačních faktorů (TGF $\beta$ ), které modulují aktivitu leukocytů a stimulují expresi molekul MHC na jejich povrchu. Cytokiny jsou produkovány celou řadou buněk – monocyty, makrofágy, endoteliálními buňkami, aktivovanými lymfocyty, fibroblasty, trombocyty i buňkami hladké svaloviny. V průběhu nádorového růstu dochází k dynamickým změnám hladin jednotlivých cytokinů. V iniciálních fázích nádorového růstu cytokiny posilují cytotoxickou protinádorovou odpověď. Naopak v pokročilých fázích nádorového růstu přispívají k rozvoji imunodeprese. Detailní mechanismy účinků jednotlivých cytokinů a jejich interakce s parenchymální a stromální složkou TME jsou složité a komplexní a jejich popis přesahuje rámec této práce.

**Inhibiční signální molekuly a kontrolní body** jsou transmembránové proteiny, exprimované na povrchu imunitních buněk. Inhibiční signální molekuly vykazují vazebnou afinitu k imunitním kontrolním bodům, tzv. checkpointům. Za fyziologických podmínek tato vazebná aktivita reguluje průběh imunitních interakcí a plní důležitou roli v procesu utváření periferní tolerance a maturace imunitního systému. Naopak v procesu nádorového růstu jsou signální molekuly využívány nádorovými elementy k úniku imunitnímu dohledu. <sup>(70)</sup> Stimulace checkpointů prostřednictvím exprese signálních molekul na povrchu nádorových buněk jsou v TME regulovány komplexní imunitní interakce ve prospěch imunodeprese. Mezi nejdůležitější signální inhibiční molekuly a checkpointy patří PD-L1, PD1 a CTLA-4.

**PD-L1**, ligand receptoru programované smrti 1, označovaný také jako protein B7-H1 nebo CD274 je silným regulátorem intenzity imunitní odpovědi. Charakteristická je jeho vysoká vazebná afinita k receptoru programované smrti (PD-1), který je lokalizovaný na povrchu T-lymfocytů. Komplex PD-L1/PD-1 za fyziologických podmínek potlačuje excesivní proliferaci CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů, působících cytotoxicky na tkáň. Výsledkem je periferní tolerance, např. v těhotenství nebo v procesu zabránění rozvoje autoimunitního onemocnění.

Vazbou PD-L1 na checkpoint PD-1 dochází k přenosu inhibičního signálu, což má za následek snížení proliferace antigen specifických T-buněk v lymfatických uzlinách za současného poklesu apoptózy Treg T-lymfocytů. <sup>(71)</sup> Tento mechanismus je prospěšný pro zabránění vzniku autoimunitní reakce, ale nežádoucí pro eliminaci nádorových buněk. Z výsledků preklinického výzkumu a studia TME byla prokázána exprese PD-L1 na povrchu nádorových buněk a některých imunitních buněk. V kontextu imunitních interakcí v TME se předpokládá, že právě zvýšená exprese PD-L1 nádorovými buňkami je jedním z mechanismů, umožňujících nádoru uniknout imunitnímu dohledu. <sup>(66)</sup> Nově byla prokázána přítomnost biovezikul, tzv. exosomů, produkovaných nádorovými buňkami. Tyto vezikuly mohou obsahovat cytokiny či inhibiční signální molekuly (PD-L1), které pomáhají podporovat a zvyšovat imunosupresivní potenciál nádorového mikroprostředí. <sup>(72)</sup>

**CTLA-4** je membránový protein ze skupiny checkpointů, označovaný také jako CD152. Tento receptor je v klidové fázi, při absenci imunitních stimulů, přítomen ve velké koncentraci ve formě endolytických váčků v Treg T-lymfocytech. Při stimulaci cytotoxické imunitní odpovědi dochází ke zvýšení expresi tohoto receptoru na povrchu aktivovaných FoxP3, CD4+, CD8+ T-lymfocytů. Ligandy s vazebnou afinitou k tomuto receptoru se nacházejí na povrchu antigen prezentujících buněk (CD80, CD86). Přesný mechanismus, kterým CTLA-4 ovlivňuje funkci T-lymfocytů v TME zůstává poněkud sporný, nicméně jednou z funkcí tohoto receptoru je kompetitivní inhibice vazby ligandu (CD80, CD86) na antigen prezentujících buňkách s receptorem CD28, lokalizovaným na CD8+ T-lymfocytech. Právě vazba CD28 s CD80 je potřebná ke stimulaci a aktivaci cytotoxických lymfocytů. V případě její kompetitivní inhibice s CTLA-4 tak nedochází ke kostimulačnímu efektu a výsledkem je inhibice a anergie T-lymfocytární odpovědi. <sup>(73)</sup>

#### **2.7.4 Shrnutí poznatků o TME a imunitních interakcích**

Přítomnost imunitních buněk v TME a jejich proporcionální zastoupení je považováno za obraz odpovědi imunitního systému na nádorový růst. Z výše popisovaných morfologicko-funkčních charakteristik nádorového mikroprostředí je zřejmé, že klíčovou rolí v kontrole nádorového růstu představuje adaptivní složka imunitní odpovědi, reprezentovaná cytotoxickými CD8+ T-lymfocyty.

K jejich aktivaci a stimulaci je důležitá činnost antigen prezentujících buněk, které zprostředkují interakce s nádorovými antigeny a CD8<sup>+</sup> T-lymfocyty za účasti povrchových molekul (CD28,CD80,CD86). Na zesílení a tlumení této imunitní odpovědi mají vliv komplexní interakce mezi buněčnou a nebuněčnou složkou TME.

K významným supresorům cytotoxické odpovědi patří CD4<sup>+</sup> a FOXP3 T-lymfocyty, MDSCs a TAMs. Klíčové mechanismy, využívané nádorovými elementy a imunitními buňkami k regulaci intenzity imunitní odpovědi v TME, zahrnují interakce s cytokiny, signálními molekulami (PD-L1) a kontrolními body (PD-1, CTLA-4). Přirozená složka imunity, reprezentovaná cytotoxickou aktivitu NK buněk, rovněž přispívá k protinádorové odpovědi, nicméně její role je předmětem preklinického i klinického výzkumu.

### 3 CÍL STUDIE

Studijní cíle formulovaly otázky, zda lze predikovat prognózu přežití u HNSCC pacientů s pomocí diagnostiky morfoloogicko-funkčních charakteristik nádorového mikroprostředí a zda lze tyto poznatky využít v terciární prevenci nádorového onemocnění.

Koncept nádorového mikroprostředí (TME), definovaný přítomností nádorových buněk (TC) v nádorovém stromatu společně s imunitní buněčnou komponentou (IC), se v posledních letech stal předmětem výzkumu v řadě klinických studií. Především komplexní interakce mezi TC a IC, které dynamicky regulují rovnováhu mezi kontrolou a progresí nádoru, nabízejí nové perspektivy výzkumu, včetně hledání prognostických imunitních biomarkerů. <sup>(61, 74)</sup> Zvláštní pozornost je věnována imunitním buňkám a inhibičním signálním molekulám, exprimovaným na povrchu TC i IC, které regulují průběh imunitních interakcí v TME. <sup>(75, 76)</sup> Výsledky publikovaných studií naznačily potenciální prognostický význam imunitních biomarkerů u různých typů nádorů, včetně nádorů v oblasti hlavy a krku. Zejména histologická varianta skvamózního karcinomu (HNSCC) se vyznačuje vysokým imunogenním potenciálem. <sup>(77)</sup>

Jedny z prvních imunitních biomarkerů v TME pacientů s HNSCC, u kterých byl studován prognostický potenciál, byly tumor infiltrující lymfocyty (TIL). <sup>(78)</sup> Několik studií prokázalo asociaci mezi zvýšenou infiltrací TIL a příznivými výsledky radikální léčby. <sup>(79, 80)</sup> V rámci jednotlivých podtypů TIL byl demonstrován dominantní prognostický potenciál u varianty CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů. <sup>(41)</sup> Tato zjištění byla dále zkoumána a potvrzena v několika metaanalýzách. <sup>(81, 82)</sup>

Kromě TIL představují důležitou skupinu biomarkerů v TME signální inhibiční molekuly, které modulují průběh a intenzitu imunitních procesů. Jedná se o ligandy a receptory (checkpointy), exprimované na povrchu TC a IC, které se vyznačují imunosupresivní aktivitou. Nejvíce studovanou molekulou je ligand receptoru programované smrti 1 (PD-L1), který má vysokou vazebnou afinitu k receptoru programované smrti 1 (PD-1) exprimovanému na povrchu T-lymfocytů. Výsledek interakce PD-L1/PD-1 vede k inaktivaci buněk a imunosupresi. <sup>(83)</sup>

Ačkoli byl mechanismus interakce PD-L1/PD-1 detailně popsán, prognostický potenciál exprese PD-L1 u HNSCC zůstává nejasný.

Několik studií hodnotilo asociaci mezi expresí PD-L1 a přežitím pacientů s HNSCC podstupujících kurativní léčbu. Výsledky buď neprokázaly žádný vliv biomarkeru, nebo byly asociovány s horším přežitím. <sup>(84, 85, 86)</sup> Kromě toho dvě publikované metaanalýzy neprokázaly žádný prognostický potenciál PD-L1 exprese. <sup>(87, 88)</sup> V jedné metaanalýze byla dokonce exprese PD-L1 asociována se špatnou prognózou u asijské populace pacientů. <sup>(89)</sup> Studie, v nichž byla exprese PD-L1 hodnocena pomocí kombinovaného pozitivního skóre (CPS), navíc nepřinesly přesvědčivé výsledky a nepodpořily možnost použití CPS k odhadu prognózy přežití pacientů s HNSCC. <sup>(90, 91, 92)</sup> Přesto výsledky tří studií naznačily potenciální prognostický efekt PD-L1 exprese, pokud byl tento biomarker hodnocen na imunitních buňkách. <sup>(93, 94, 95)</sup>

Tyto poznatky, společně s výsledky publikovaných studií, se staly podkladem pro vedení vlastní prospektivní kohortové studie „ONKOL-01-Head and neck“, zaměřené na hodnocení prognostického potenciálu imunitních biomarkerů u HNSCC pacientů. Kromě toho byl proveden aktualizovaný literární přehled, doplněný metaanalýzou extrahovaných dat, která se soustředila na hodnocení prognostického potenciálu PD-L1 exprese u HNSCC pacientů podstupujících radikální léčbu, zahrnující chirurgii i radioterapii nebo radiochemoterapii.

### 3.1 Literární přehled a metaanalýza

Zatímco výsledky publikovaných kohortových studií a metaanalýz poměrně jednoznačně potvrdily prognostický potenciál tumor infiltrujících lymfocytů, v případě PD-L1 exprese neposkytovaly konzistentní výsledky.

V databázích *MEDLINE*, *Embase*, *PQSciTech* a *HCAPlus* byly systematicky vyhledávány kohortové studie hodnotící prognostický efekt PD-L1 exprese u pacientů s HNSCC v kurativním stadiu onemocnění. Rešerše se soustředila na studie publikované výhradně v angličtině v období od 1. 1. 2010 do 6. 1. 2023.

Kritéria pro zařazení studií zahrnovala: kohortové studie s pacienty s kurativním stádiem onemocnění (tj. lokalizované nebo lokoregionálně pokročilé nádory), studie hodnotící asociaci mezi expresí PD-L1 a celkovým přežitím (OS), vyjádřeným adjustovaným poměrem rizik (aHR) s 95% intervaly spolehlivosti (CI), biomarker stanovený imunohistochemickou analýzou, radikální léčebné postupy zahrnující chirurgii i radioterapii nebo radiochemoterapii, studie s HPV negativními orofaryngeálními karcinomy.

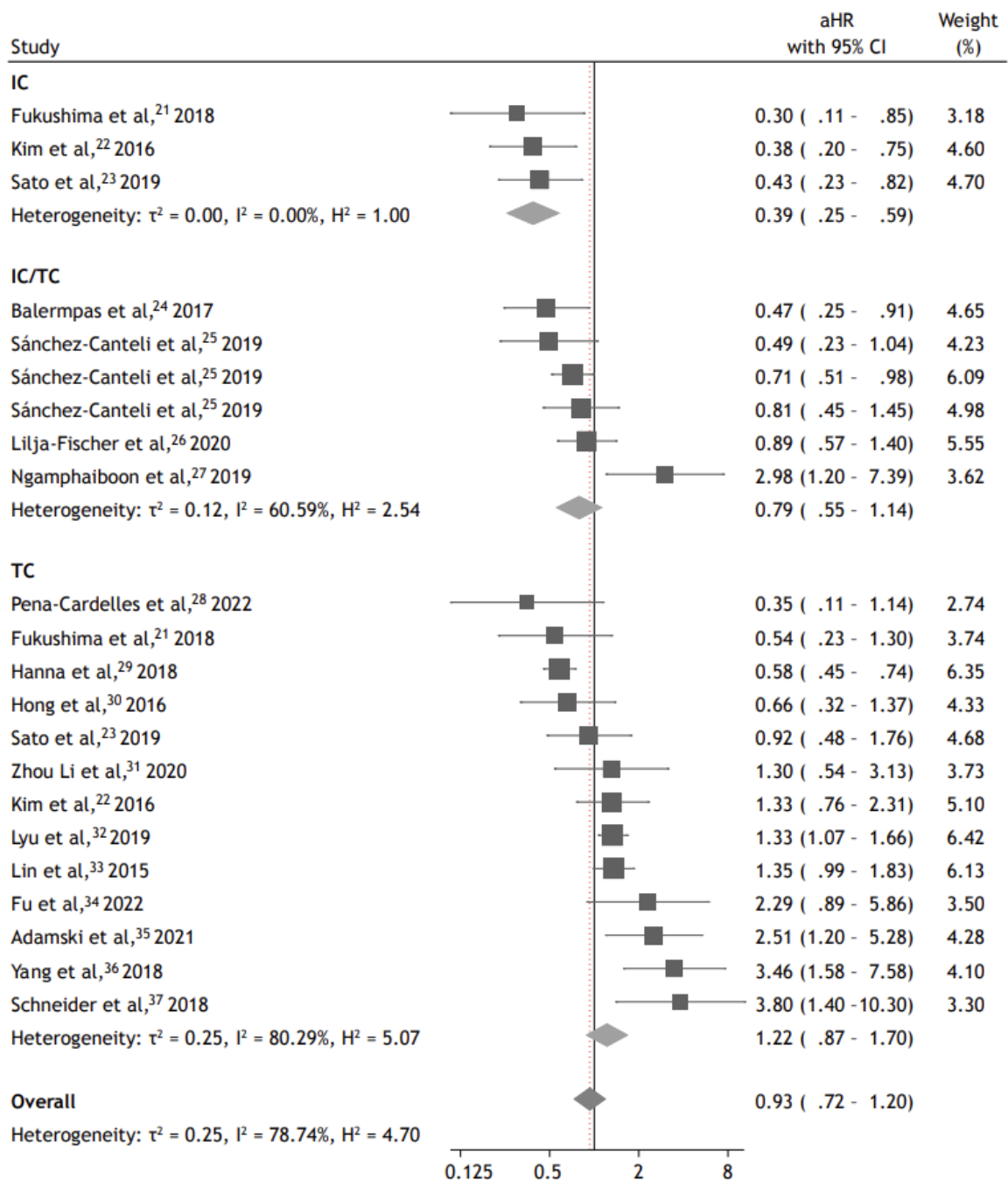
Naopak byly vyloučeny studie s nádory nosohltanu, paranazálních dutin, karcinomy štítné žlázy nebo nádory slinných žláz a nádory jiné histologické varianty než HNSCC. Kromě toho byly vyloučeny studie s metastatickými stádii onemocnění, duplicitními a recidivujícími nádory zahrnující předchozí léčbu zářením. Studie s HPV asociovaným orofaryngeálními karcinomy pro svou odlišnou biologickou povahu a prognózu nebyly v metaanalýze hodnoceny. Diagram výběru vhodných studií pro literární přehled a metaanalýzu, včetně tabulky s charakteristikami vybraných studií, je uveden v Příloze 1.

Z celkového počtu 3 825 nalezených publikací splnilo kritéria pro zařazení 17 kohortových studií. V rámci těchto studií byla analyzována data o přežití u 3 190 pacientů s HNSCC ve stádiích I–IV léčených kurativním záměrem. Primární cílem bylo najít vztah mezi expresí PD-L1 a celkovým přežitím (OS). Pozornost byla věnována typu exprese PD-L1, tj. zda byl ligand exprimován na nádorových (TC) či imunitních buňkách (IC), případně na obou typech buněk. Sekundární cíle studie se soustředily na určení případné asociace biomarkeru a nádorově specifického přežití.

Výsledky analýzy neprokázaly statisticky významnou asociaci mezi přežitím pacientů a expresí PD-L1 na nádorových buňkách nebo při kombinované expresi na nádorových i imunitních buňkách. Naopak vysoká exprese PD-L1 na imunitních buňkách byla u pacientů asociována s 61% snížením rizika úmrtí, jak dokladoval  $aHR = 0,39$  (95% CI: 0,25 až 0,59). Obrázek 3 zobrazuje stromový graf s prokázanou asociací PD-L1 exprese na IC. V této metaregresní analýze bylo prokázáno zlepšení celkového přežití u skupiny pacientů s vysokou expresí PD-L1 na imunitních buňkách v porovnání s pacienty s vysokou expresí na nádorových buňkách. Pro sekundární cíle studie, hodnotící nádorově specifické přežití, byla podobně jako v případě OS nalezena statisticky významná asociace mezi expresí PD-L1 na imunitních buňkách a snížením rizika nádorového úmrtí ( $aHR, 0,52$ ; 95% CI, 0,38 až 0,72). Navíc pro obě asociace nebyl zjištěn vliv lokality nádoru nebo typu primární léčebné modality (tj. operace vs. radioterapie nebo radiochemoterapie).

Výsledky metaanalýzy poskytly nový pohled na hodnocení a interpretaci PD-L1 exprese v nádorové tkáni u pacientů s HNSCC podstupujících radikální léčbu. Zdůraznily prognostický potenciál tohoto biomarkeru v případě jeho zvýšené exprese na imunitních buňkách. Zároveň však upozornily na nutnost uvážlivého hodnocení výsledků vzhledem k omezenému počtu provedených a publikovaných studií a poukázaly na potřebu dalších studií k ověření jejich platnosti.

Metaanalýza byla publikována v *JAMA Network Open – Oncology*.<sup>(96)</sup> Full text manuskriptu viz Příloha 1.



Random-effects DerSimonian-Laird model

**Obrázek 3: Stromový graf znázorňující asociaci mezi PD-L1 expresí a celkovým přežitím u pacientů s HNSCC;** Výsledky jsou prezentovány z modelu náhodných efektů, včetně  $\tau^2$  (rozptyl heterogenity),  $I^2$  (index inkonzistence),  $H^2$  (statistika  $H$ ) a hodnoty  $P$ . aHR označuje adjustovaný poměr rizik; velikost rámečku, váha aHR (velikost účinku); přerušovaná čára, celkové sdružené aHR; kosočtverce, sdružené aHR; IC, imunitní buňky; postranní body, 95% CI; TC, nádorové buňky.



## 3.2 Prospektivní kohortová studie

Výsledky publikovaných studií a metaanalýzy<sup>(81, 82, 96)</sup> společně s aktuálními poznatky z oblasti imunookologie zabývající se problematikou nádorového mikroprostředí byly podkladem pro vlastní výzkum. Praktická část výzkumu se zaměřila na hodnocení prognostického potenciálu nových imunitních biomarkerů a možnosti jejich využití v terciární prevenci u pacientů s HNSCC léčených definitivní radioterapií nebo radiochemoterapií. Za tímto účelem byla iniciována prospektivní kohortová studie, registrována v databázi *ClinicalTrials.gov* pod registračním číslem NCT05941676 a názvem „ONKOL-01-Head and Neck Study“.

### 3.2.1 Primární a sekundární cíle studie

Primárním endpointem studie bylo celkové přežití (OS), měřené od data zahájení radioterapie do data úmrtí z jakékoli příčiny nebo do poslední dispenzární návštěvy. Sekundární endpointy zahrnovaly nádorově specifické přežití (DSS), přežití bez lokoregionálního relapsu (LRFS), přežití bez známek recidivy onemocnění (DFS) a přežití bez vzdálených metastáz (DMFS). Nádorově specifické přežití (DSS) bylo cenzurováno od zahájení radioterapie do data úmrtí v souvislosti s nádorovým onemocněním nebo do data poslední dispenzární návštěvy. Pacienti, kteří zemřeli z příčin nesouvisejících s HNSCC, byli cenzorováni v době úmrtí. Přežití bez lokoregionálního relapsu (LRFS) bylo definováno radiologickým nebo patologickým průkazem recidivy/progrese nádoru od zahájení radioterapie v ozařované lokalitě, tzn. v místě primárního nádoru nebo regionální uzlinové oblasti. Parametry DFS a DMFS byly použity k zaznamenání jakékoli formy recidivy nebo zjištění vzdálených metastáz nádoru, měřeno od zahájení radioterapie do data zjištění recidivy. Pacienti bez recidivy nádoru byli cenzurováni v době poslední dispenzární návštěvy.

### 3.2.2 Materiály a metody

Studie „ONKOL-01-Head and neck“ je vedena jako monocentrická prospektivní kohortová studie na Onkologické klinice Fakultní nemocnice Ostrava od června 2020. Ve studii byl hodnocen efekt imunitních biomarkerů ve vztahu k míře přežití pacientů s HNSCC podstupujících radikální léčbu radioterapií nebo radiochemoterapií. Kromě hodnocení efektu jednotlivých biomarkerů se studie zaměřila na interakce mezi biomarkery, které dosud nebyly zkoumány.

V této studii jsme se pokusili najít mezní prognostické hodnoty imunitních biomarkerů na základě individuálních nálezů u pacientů tak, aby je bylo možné využít v běžné klinické praxi pro jakéhokoli HNSCC pacienta.

### 3.2.2.1 Pacienti

Kritéria pro zařazení pacientů do studie zahrnovala: dospělé ve věku 18 až 90 let s histologicky verifikovaným HNSCC v lokalitách – dutina ústní, nosní, orofarynx, larynx a hypofarynx; klinické stádium nemoci I-IVb, tzn. nonmetastatická stádia nemoci; dostupnost vzorků nádorové tkáně z biopsie v parafinových blocích. Ze studie byli vyloučeni všichni pacienti s jiným histologickým typem než HNSCC (tzn. nasofaryngeální karcinomy, karcinomy slinných žláz a štítné žlázy, slizniční melanomy, kožní karcinomy, lymfomy a nádory neznámého primárního origa). Rovněž do studie nebyli zařazováni pacienti se vzdálenými metastázami, synchronními malignitami, duplicitními nebo recidivujícími nádory nebo pacienti po předchozí léčbě zářením či chemoterapií.

Před zařazením byl od každého pacienta získán informovaný souhlas. Studie se řídila etickými zásadami uvedenými v Helsinské deklaraci a byla schválena etickou komisí Fakultní nemocnice Ostrava.

Vstupní diagnostický protokol zahrnoval komplexní otorinolaryngologické vyšetření s histologickou verifikací nádoru. Následně byla indikována zobrazovací vyšetření k určení přesného stadia onemocnění. Všichni pacienti absolvovali kontrastní CT vyšetření krku a hrudníku. Fakultativně byla indikována vyšetření MR a PET/CT s FDG k upřesnění nejasných nálezů. Definitivní stádium onemocnění bylo stanoveno pomocí TNM klasifikace – American Joint Committee on Cancer TNM, verze 8. <sup>(18)</sup>

Kromě základních klinicko-patologických charakteristik, tj. věku, pohlaví, indexu tělesné hmotnosti (BMI), výkonnostního stavu, lokalizace nádoru, stádia, gradingu a HPV positivity, byly zaznamenány informace o užívání návykových látek a infekčních komplikacích během léčby. Pozitivní, resp. rizikový abúzus alkoholu byl ve studii klasifikován pomocí WHO kritérií, tzn. Konzumace  $\geq 4$  drinků/den u žen a  $\geq 5$  drinků/den u mužů. Obsah alkoholu v jednom standardním drinku musel obsahovat alespoň 14 g čistého ethanolu. <sup>(97)</sup>

Na základě anamnézy kouření byli pacienti zařazeni do dvou skupin, tzn. nekuřáků a aktivních kuřáků, příležitostných nebo bývalých kuřáků. Informace o užívání obou návykových látek byly získány od pacientů před zahájením léčby, v rámci vstupního vyšetření, strukturovaným pohovorem. Jeho součástí byl také sběr anamnestických údajů o předchozím očkování proti infekci covid-19. Bakteriální infekční komplikace během léčby byly definovány kombinací zvýšení CRP > 10 mg/l a nutnosti podání antibiotik. Výkonnostní stav pacientů byl hodnocen pomocí klasifikace ECOG <sup>(44)</sup> v kombinaci s CCI (Charlson Comorbidity Index), zohledňujícím efekt přidružených onemocnění. <sup>(47)</sup>

### 3.2.2.2 Stanovení imunitních biomarkerů v nádorové tkáni

Vzorky nádorové tkáně před léčbou, fixované formalínem do parafinových bloků, byly podstoupeny imunohistochemické analýze (IHC) na přítomnosti imunitních biomarkerů. z reprezentativních parafinových bloků byly na elektrostatická sklíčka extrahovány řezy o tloušťce 4 μm. Následovalo imunohistochemické barvení pomocí kustomizovaného protokolu na Ventana Benchmark Ultra instrument <sup>(Roche Diagnostics, Switzerland)</sup> s použitím sady ultraView Universal DAB Detection Kit <sup>(Roche Diagnostics, Switzerland)</sup> po předchozí revitalizaci v pufru CC1. Kategorizace tumor infiltrujících lymfocytů se prováděla na základě exprese povrchových molekul CD3, CD4 a CD8. PD-L1 exprese byla hodnocena na membránách nádorových a imunitních buněk. Pro detekci jednotlivých markerů byly použity specifické protilátky: PD-L1 (klon 22C3, DAKO M3653, ředění 1 : 50, inkubace 40 minut), CD3 (klon LN10, Leica NCL-LCD3-565, ředění 1 : 100, inkubace 60 minut), CD4 (klon SP35, DCS CI851C003, ředění 1 : 50, inkubace 32 minut), CD8 (klon P17-V, DB Biotech M0755, ředění 1 : 200, inkubace 60 minut). K odlišení epiteliální složky nádorového parenchymu od stromatu byl použit marker cytokeratin (CK), stanovený pomocí klonu AE1/AE3, Zytomed MSK019 (ředění 1 : 200, inkubace 24 minut).

Histopatologická analýza byla provedena pomocí optického mikroskopu Olympus BX45 <sup>(Boston Industries Inc., Boston)</sup> s optickou měřicí mřížkou, umožňující hodnocení 1 mm<sup>2</sup> při celkovém zvětšení 100× (objektiv 10×, okulár 10×).

Imunohistochemická analýza tumor infiltrujících lymfocytů (TIL) hodnotila počet pozitivních elementů na 1 mm<sup>2</sup> v nádorové tkáni (parenchymu), určený pozitivitou protilátek pro CD3, CD4 a CD8. Mediány počtu elementů byly použity jako mezní hodnoty pro rozlišení mezi nízkou a vysokou infiltrací TIL. Kromě počtu lymfocytů byla dále hodnocena denzita TIL semikvantitativním výpočtem podílu plochy obsazené CD3+ infiltrujícími lymfocyty na celé ploše parenchymu (% plochy TIL obsazené mononukleárními buňkami v nádorovém parenchymu). Tento způsob hodnocení klasifikoval denzitu TIL infiltrace jako sníženou (< 30 %), nebo zvýšenou ( $\geq 30$  %).<sup>(98, 99)</sup>

Pozitivita exprese PD-L1, vyjádřená > 1% intenzitou exprese ligandu byla hodnocena v nádorovém parenchymu samostatně na nádorových buňkách (TC) a imunitních buňkách (IC).<sup>(100)</sup> Imunitní buňky, exprimující PD-L1, představovaly T-lymfocyty, makrofágy a dendritické buňky infiltrující nádorový parenchym. Kromě individuálního hodnocení exprese na TC a IC se dále exprese PD-L1 na IC hodnotila ve vztahu k TC pomocí procentuálního rozdílu mezi oběma expresemi. Rozdíl  $\geq 10$  % byl klasifikován jako vysoká exprese PD-L1 na imunitních buňkách (PD-L1<sub>IC</sub>). Katalogová čísla a identifikace imunoreagencií jsou uvedena v Příloze 3 – Tabulka S3.

### 3.2.2.3 Léčebný protokol

Pacienti, kteří splnili kritéria pro zařazení do studie, byli indikováni ke kurativní radioterapii nebo radiochemoterapii. Standardní protokol radioterapie zahrnoval frakcionační režim 70 Gy po dobu 7 týdnů s denní dávkou 2,0 Gy/frakce, a to buď jako samostatná léčba, nebo v kombinaci s chemoterapií cisplatinou (cDDP). Konkomitantní chemoterapie (cDDP) byla aplikována dle doporučených léčebných postupů v týdenním nebo třítýdenním dávkovém schématu, přičemž podmínkou bylo dosažení kumulativní dávky cytostatika nejméně 200 mg/m<sup>2</sup> během celé léčby.<sup>(101)</sup>

U pacientů, kteří nebyli vhodnými kandidáty pro léčbu standardním protokolem radioterapie nebo radiochemoterapie, byl preferován buď hyperfrakcionovaný, nebo akcelerovaný režim radioterapie.<sup>(102, 27)</sup> Hlavními důvody pro volbu těchto režimů byly nízký výkonnostní stav, interkurence, renální insuficience nebo objem nádorové masy.

Skupina pacientů s nádory spodiny dutiny ústní byla léčena dávkově eskalovaným režimem, kombinujícím standardní protokol nebo hyperfrakcionovaný režim s cíleným navýšením dávky do oblasti primárního tumoru formou stereotaktického boostu na přístroji CyberKnife. Účinnost a bezpečnost tohoto léčebného režimu byla ověřena v klinické studii prováděné na Onkologické klinice Fakultní nemocnice Ostrava. Výsledky studie byly publikovány v roce 2021 v časopise *BMC Radiation Oncology*.<sup>(103)</sup> Full text manuskriptu viz Příloha 2.

Radiobiologická účinnost jednotlivých frakcionačních režimů byla hodnocena parametrem biologické efektivní dávky ( $BED_{10}$ )/Gy.<sup>(104)</sup>

Konvenční technika radioterapie využívala objemově modulovanou intenzitu svazku záření (VMAT) o energiích 4 a 6 MV. Pro stereotaktický boost byly použity nonizocentrické konformní svazky záření a předpis dávky na 60–80% izodózu za účelem pokrytí minimálně 95 % ozařovaného objemu nádoru. Přesnost doručení dávky záření a korekce odchylek v nastavení pacienta byla na lineárním urychlovači kontrolována denně s využitím kilovoltážních snímků, zhotovených ve dvou kolmých projekcích (KV × KV), nebo nízkodávkového CT vyšetření (CB-CT) a korekcí na kostěné struktury, resp. měkké tkáně. U stereotaktické radioterapie bylo použito on-line navádění podle kostěných struktur (režim XST – Xsight Spine Tracking a 6D skull tracking). Podrobné informace o režimech radioterapie a radiochemoterapie jsou uvedeny v Příloze 3 – Tabulka S1.

#### **3.2.2.4 Dispenzarizace**

Dispenzarizace pacientů po dokončení radikální léčby probíhala ve spolupráci Onkologické, Otolaryngologické a Stomatochirurgické kliniky Fakultní nemocnice Ostrava. Protokol sledování pacientů zahrnoval expertní otorinolaryngologické nebo stomatochirurgické vyšetření, laboratorní diagnostiku a zobrazovací vyšetření. Během prvních dvou let po dokončení léčby byli pacienti vyšetřováni v otorinolaryngologické nebo stomatochirurgické ambulanci v intervalech 1–3 měsíců. Součástí vyšetření bylo také v indikovaných případech endoskopické vyšetření, případně direktní endoskopie. Onkologem byla indikována zobrazovací vyšetření a laboratorní diagnostika.

Všichni pacienti absolvovali 12 týdnů po dokončení léčby FDG-PET/CT vyšetření za účelem hodnocení dynamiky postradiačních změn a vyloučení časné progresse nádoru. Vyšetření bylo opakováno v odstupu dalších 12 týdnů k potvrzení remise onemocnění a vyloučení/potvrzení reziduální viabilní nádorové tkáně. Při dosažení kompletní remise byla dále v rámci dispenzarizace indikována CT vyšetření v intervalech 3–6 měsíců. U nejednoznačných nálezů bylo navíc indikováno MR vyšetření krku. V případech, kdy byla patrná recidiva onemocnění či progresse nemoci, byla provedena opakovaná zobrazovací vyšetření (PET/CT, nebo CT a MR) spolu s ORL a endoskopickým vyšetřením. Lokální recidivy byly histologicky verifikovány invazivními diagnostickými postupy (biopsie, excize).

Laboratorní diagnostika zahrnovala standardní vyšetření krevního obrazu a biochemie, včetně nádorového markeru SCCA a hormonů štítné žlázy. Harmonogram dispenzárního protokolu je uveden v Příloze 3 - Tabulka S2.

### 3.2.2.5 Statistická analýza

Kategoriální, demografické proměnné a proměnné týkající se onemocnění byly prezentovány jako podíly, zatímco spojité proměnné byly převedeny do binární formy na základě mediánových hodnot v rámci studované populace. Kategoriální proměnné byly vyhodnoceny pomocí Fisherova exaktního testu, nebo  $\chi^2$  testu. Pro univariální a multivariální analýzu byla použita Coxova regrese proporcionálních rizik s adjustací pro pohlaví, věk, abúzus alkoholu, kouření, HPV pozitivitu, stádium onemocnění, konkomitantní chemoterapii, status očkování proti covidu-19 a bakteriální infekci. Výsledky byly vyjádřeny pomocí hrubého (cHR), nebo adjustovaného poměru rizik (aHR). Síla testu byla odhadnuta na základě binárních kovariát v Coxově modelu proporcionálních rizik s přihlédnutím k poměru rizik, velikosti vzorku, celkové pravděpodobnosti selhání a základní hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ . Všechny testy byly dvouvýběrové a hladina významnosti byla stanovena na 0,05. Statistické testy a analýzy byly provedeny pomocí softwaru Prism 9 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) a STATA verze 17 (StataCorp, College Station, TX, USA).

### 3.2.3 Výsledky

V období od 1. června 2020 do 9. srpna 2022 bylo do prospektivní studie „ONKOL-01-Head and neck“ zařazeno celkem 55 pacientů s lokoregionálně pokročilými HNSCC, kteří splnili kritéria pro zařazení a byli indikováni k radikální (definitivní) radioterapii nebo radiochemoterapii. Věkový medián pacientů ve studii byl 63 let (IQR: 58–71), s vyšším podílem zastoupení mužů – 41 (74,5 %). Převažující anatomická lokalita nádorů byla dutina ústní – 21 (38,2 %) a orofarynx – 21 (38,2 %), dále hypofarynx 7 (12,7 %) a hrtan 6 (10,9 %). Z 21 orofaryngeálních karcinomů bylo 15 (71,4 %) HPV pozitivních. Nejvíce zastoupené bylo klinické stadium IV s 37 (67,2 %) pacienty, následované stádiem III u 17 (31,0 %) pacientů, včetně jednoho pacienta v klinickém stádiu I. Souhrn charakteristik kohorty pacientů je uveden v Tabulce 2 a 3.

Charakteristika		Počet pacientů (%)	P
Pohlaví	Ženy	14 (25.5)	<0.0001
	Muži	41 (74.5)	
Věk	< M	27 (49)	n.s.
	≥ M	28 (51)	
CCI	< M	27 (49)	n.s.
	≥ M	28 (51)	
BMI	< M	27 (49)	n.s.
	≥ M	28 (51)	
Abúzus alkoholu	Ne	25 (45.5)	n.s.
	Ano	30 (54.5)	
Kouření	Ne	11 (20)	<0.0001
	Ano*	44 (80)	
Bakteriální infekce	Ne	12 (21.8)	<0.0001
	Ano	43 (78.2)	
COVID-19 vakcinace	Ne	23 (41.8)	n.s.
	Ano	32 (58.2)	
Lokalita nádoru	Orofarynx	21 (38.2)	0.0001
	Dutina ústní	21 (38.2)	
	Hypofarynx	7 (12.7)	
	Larynx	6 (10.9)	
Stádium nemoci	≤ 3**	18 (32.7)	0.0003
	4	37 (67.3)	
Stupeň diferenciacie nádoru	1	21 (38.2)	0.0117
	2	24 (43.6)	
	3	10 (18.2)	
HPV pozitivita	Ne	40 (72.7)	<0.0001
	Ano	15 (27.3)	
Konkomitantní CHT	Ne	25 (45.5)	n.s.
	Ano	30 (54.5)	
BED <sub>10</sub>	< M	38 (69)	<0.0001
	≥ M	17 (31)	

**Tabulka 2: Klinicko-patologické charakteristiky kohorty pacientů**

\*) Pravidelný kuřák nebo exkuřák; \*\*) Pouze 1 pacient ve stádiu I; M = medián (věk = 63 let; CCI = 5; BMI = 23.6 kg/m<sup>2</sup>; BED<sub>10</sub> = 80Gy); CCI = Charlson Comorbidity Index; BMI = Body Mass Index; COVID-19 = Coronavirus; HPV = lidský papilomavirus; CHT = chemoterapie; BED<sub>10</sub> = biologická efektivní dávka; p = p-hodnota; n.s. = nesignifikantní



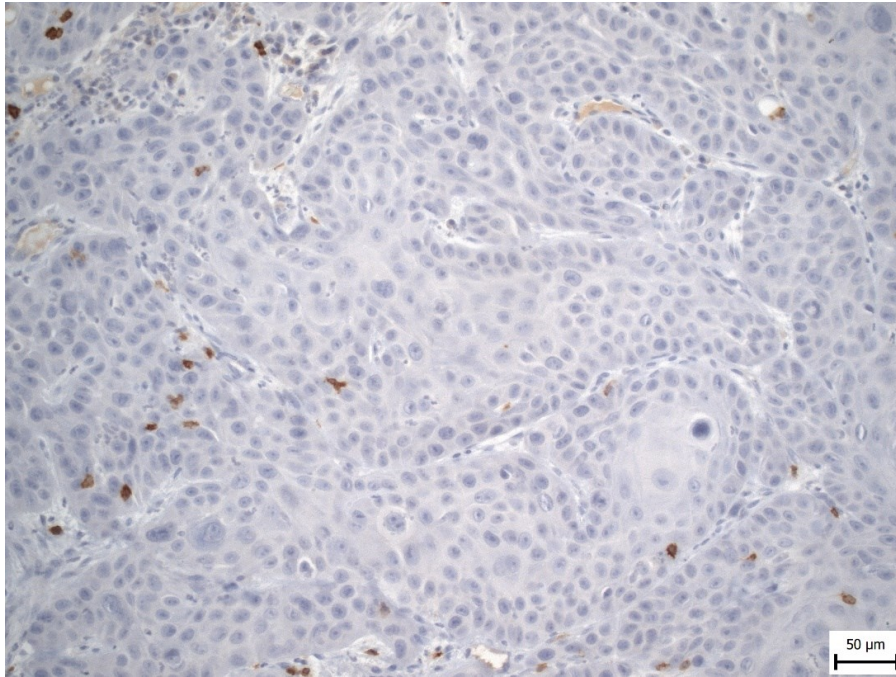
Charakteristika		Počet pacientů (%)
<b>Specifikace lokalizace nádoru</b>		
<b>Anatomická lokalita</b>	Tonsila	12 (21.8)
	Měkké patro	2 (3.6)
	Kořen jazyka	5 (9.1)
	Jazyk (dutina ústní – ventrální 2/3)	5 (9.1)
	Spodina dutiny ústní	11 (20)
	Procesus alveolaris	7 (12.7)
	Hypofarynx	7 (12.7)
	Glottis	3 (5.5)
	Supraglottis	3 (5.5)

Tabulka 3: Charakteristiky lokalizace nádoru v rámci anatomických oblastí hlavy a krku

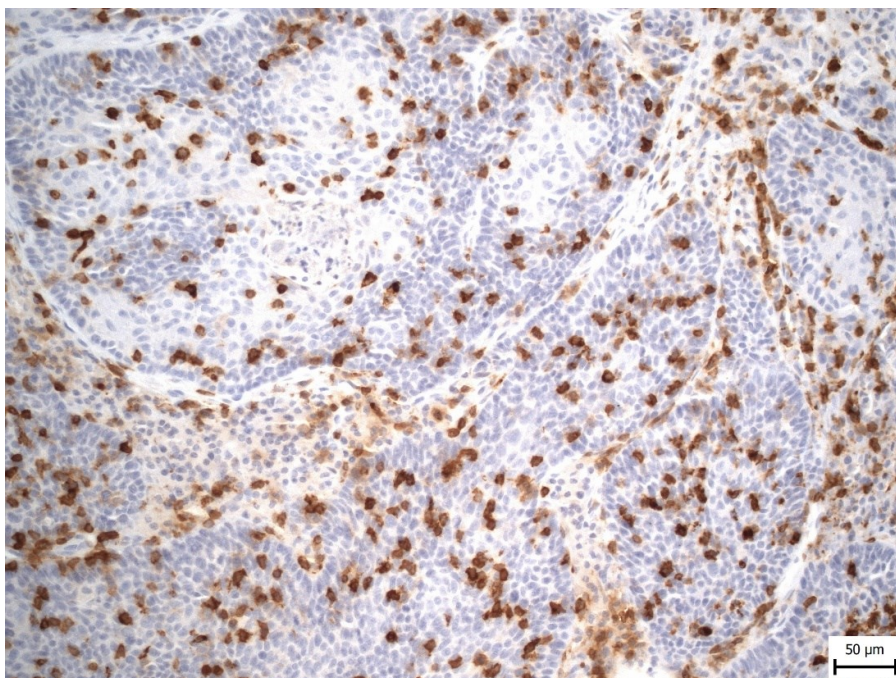
Medián doby sledování celkového přežití (OS) a nádorově specifického přežití (DSS) byl 19,7 měsíce (IQR: 10,1–25,1 měsíce). Během této doby bylo zaznamenáno 21 (38,2 %) úmrtí pacientů, což představovalo 61,8% OS a 72,2% DSS. Pro ostatní specifická přežití (DFS, LRFS a DMFS) byly doby sledování kratší a pohybovaly se v rozmezí 11,8–15,2 měsíců. Z celkového počtu 55 pacientů byla diagnostikována lokální recidiva u 3 (5,5 %) pacientů a lokoregionální recidiva u 13 (23,6 %) pacientů. U 10 (18,2 %) pacientů došlo k progresi nemoci ve formě distantních metastáz. Celkem 15 (27,3%) pacientů zemřelo na následky nádorového onemocnění.

### 3.2.3.1 Analýza imunitních biomarkerů

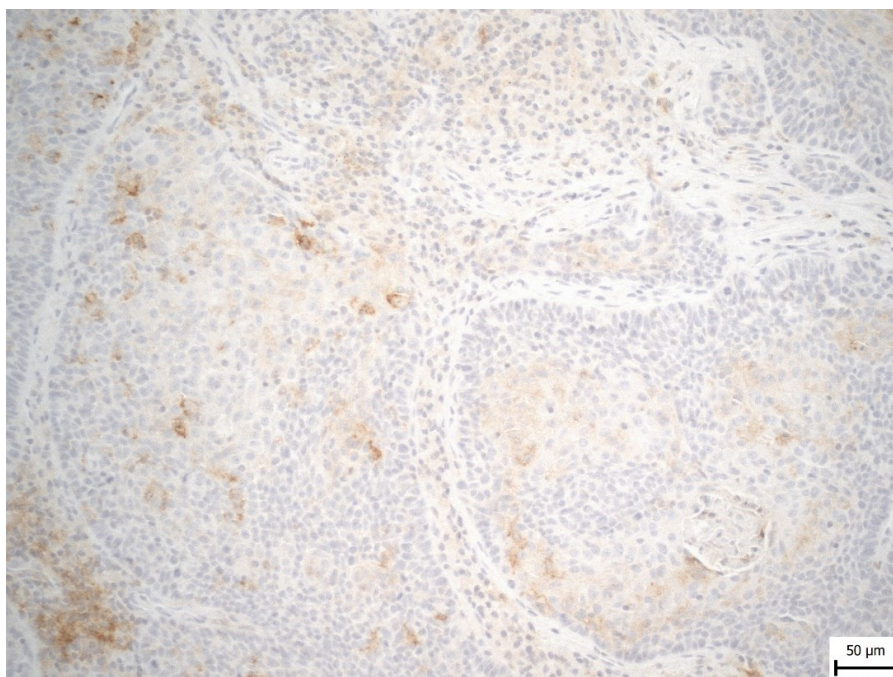
Imunohistochemická analýza vzorků nádorové tkáně před léčbou na přítomnost imunitních biomarkerů (PD-L1 a TIL) byla provedena u 53 pacientů. U zbývajících pacientů nebylo možné analýzu provést z důvodu poškození a degradace vzorků tkáně. Medián počtu TIL byl 28, 32 a 28/mm<sup>2</sup> pro fenotypy CD8+, CD4+ a FOXP3. Z celkového počtu 53 vzorků nádorových tkání pacientů, hodnocených na expresi PD-L1, mělo 22 (41,5 %) pacientů expresi na TC (nádorových buňkách) a 52 (98 %) expresi na IC (imunitních buňkách). U 27 (52 %) pacientů byla exprese PD-L1 na imunitních buňkách nad mediánem 15 %. Densita TIL infiltrace  $\geq 30$  %, klasifikovaná jako zvýšená, byla nalezena u 28 (53,8 %) pacientů. (Obrázek 3 a 4) Kromě toho 20 (37,7 %) pacientů vykazovalo vysokou expresi PD-L1<sub>IC</sub>, definovanou rozdílem  $\geq 10$  % mezi PD-L1 na IC a TC. (Obrázek 5)



**Obrázek 3: Reprezentativní řez tkání HNSCC s imunohistochemickým barvením, který zobrazuje sníženou denzitu CD3+ TIL, originální zvětšení  $\times 200$ ; Zkratky: HNSCC, skvamózní karcinom hlavy a krku; TIL, tumor infiltrující lymfocyty; CD3+, marker T-lymfocytů.**



**Obrázek 4: Reprezentativní řez tkání HNSCC s imunohistochemickým barvením, který zobrazuje zvýšenou denzitu CD3+ TIL, originální zvětšení  $\times 200$ ; Zkratky: HNSCC, skvamózní karcinom hlavy a krku; TIL, tumor infiltrující lymfocyty; CD3+, marker T-lymfocytů.**



**Obrázek 5: Reprezentativní řez tkáně HNSCC s imunohistochemickým barvením, který zobrazuje vysokou expresi PD-L1<sub>IC</sub>, originální zvětšení × 200; Zkratky: HNSCC, skvamózní karcinom hlavy a krku; PD-L1, ligand receptoru programované smrti 1; IC, imunitní buňky**

### 3.2.3.2 Univariantsní a multivariantsní analýza

Výsledky univariantsní analýzy neprokázaly žádnou významnou asociaci mezi OS nebo DSS a demografickými nebo standardními klinicko-patologickými charakteristikami. (Příloha 3 – Tabulka S4). Přežití pacientů navíc nebylo asociováno s podáním konkomitantní chemoterapie ani s různými frakcionačními režimy, resp. biologickými efektivními dávkami radioterapie. Ačkoli univariantsní analýza odhalila statisticky významné asociace mezi OS a expresí PD-L1 na IC, zvýšenou denzitou TIL nebo vysokou infiltrací CD8<sup>+</sup> TIL, tyto asociace nebyly dále potvrzeny v multivariantsní analýze, kromě asociace mezi OS a vysokou infiltrací CD8<sup>+</sup> TIL. (Tabulka 4 a Příloha 3 – Tabulka S5). Naopak pacienti s expresí PD-L1 na TC měli kratší DSS a přežití bez známek recidivy (DFS), jak demonstrovaly příslušné hrubé a adjustované poměry rizik (cHR i aHR). Výsledky univariantsní i multivariantsní Coxovy regrese potvrdily vyšší míru přežití (kromě DMFS) u pacientů s vysokou expresí PD-L1<sub>IC</sub>.



Prognostický faktor		Celkem pacientů	OS			DSS			DFS		
			Počet pacientů	aHR (95% CI)	p	Počet pacientů	aHR (95% CI)	p	Počet pacientů	aHR (95% CI)	p
PD-L1 na TC	Negativní	31	12	ref		7	ref		9	ref	
	Pozitivní	22	9	1.49 (0.54–4.13)	n.s.	8	3.92 (1.04–14.75)	<b>0.043</b>	13	3.88 (1.42–10.59)	<b>0.008</b>
PD-L1 na IC	<M	26	14	ref		9	ref		13	ref	
	≥M	27	7	0.44 (0.13–1.46)	n.s.	6	0.83 (0.19–3.66)	n.s.	9	0.90 (0.27–2.96)	n.s.
PD-L1 <sub>IC</sub>	Nízká	33	17	ref		12	ref		18	ref	
	Vysoká	20	4	0.17 (0.04–0.74)	<b>0.018</b>	3	0.17 (0.03–0.92)	<b>0.039</b>	4	0.22 (0.05–0.92)	<b>0.038</b>
CD4+ TIL	<M	25	14	ref		11	ref		14	ref	
	≥M	27	7	0.62 (0.19–1.95)	n.s.	4	0.44 (0.10–1.86)	n.s.	8	0.71 (0.22–2.30)	n.s.
CD8+ TIL	<M	25	15	ref		11	ref		14	ref	
	≥M	27	6	0.32 (0.11–0.95)	<b>0.041</b>	4	0.31 (0.08–1.18)	n.s.	8	0.63 (0.22–1.82)	n.s.
TIL denzita	Snížená	24	14	ref		10	ref		13	ref	
	Zvýšená	28	7	0.38 (0.13–1.14)	n.s.	5	0.36 (0.09–1.40)	n.s.	9	0.51 (0.18–1.49)	n.s.

Tabulka 4: Asociace mezi jednotlivými prognostickými faktory a parametry přežití, multivariantní analýza

aHR = adjustovaný poměr rizik (adjustace pro kovariáty pohlaví, věk, abúzus alkoholu, status kouření, HPV pozitivita, stádium onemocnění, konkomitantní chemoterapie, status očkování proti covidu-19 a bakteriální infekce); CI = interval spolehlivosti; ref = reference; OS = celkové přežití; DSS = nádorově specifické přežití; DFS = přežití bez známek onemocnění; p = p-hodnota; M = medián (15 % pro PD-L1 na IC; 32/mm<sup>2</sup> pro CD4+ TIL; 28/mm<sup>2</sup> pro CD8+ TIL); TC = nádorové buňky; IC = imunitní buňky; TIL = tumor infiltrující lymfocyty; denzita TIL = snížená < 30 %, zvýšená > 30 %; PD-L1 = ligand receptoru programované smrti 1; PD-L1<sub>IC</sub> = procentuální rozdíl mezi expresí PD-L1 na imunitních a nádorových buněk - nízká < 10 %, vysoká > 10 %; n. s. = nesignifikantní; signifikantní výsledky jsou zvýrazněny tučně.

### 3.2.3.3 Interakce imunitních biomarkerů

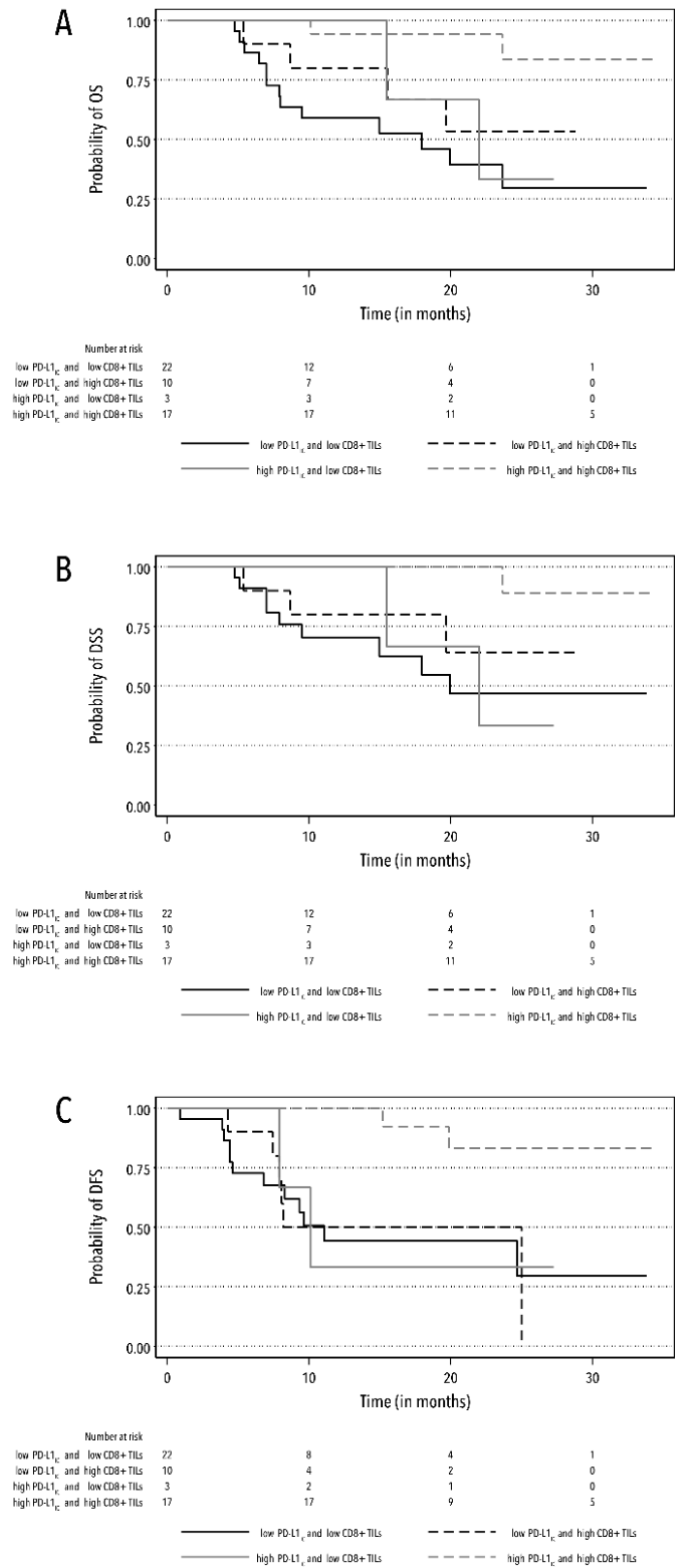
Pacienti s vysokou expresí PD-L1<sub>IC</sub> a vysokou infiltrací CD8<sup>+</sup> TIL (určenou hodnotami nad mediánem) nebo zvýšenou denzitou TIL vykazovali prodloužení délky života, stanovené celkovou nebo nádorově specifickou mírou přežití (Tabulka 5). Adjustované poměry rizik (aHR) pro vysokou expresi PD-L1<sub>IC</sub> v kombinaci s vysokou CD8<sup>+</sup> TIL infiltrací byly 0,08 (95% CI: 0,01 až 0,52) pro OS a 0,05 (95% CI: 0,00 až 0,61) pro DSS. Také adjustované poměry rizik (aHR) pro vysokou expresi PD-L1<sub>IC</sub> a zvýšenou denzitu TIL dosáhly hodnot 0,07 (95% CI: 0,01 až 0,46) pro OS a 0,05 (95% CI: 0,00 až 0,61) pro DSS, při síle testu > 90 % (Příloha 3 – Tabulka S6). Tato zjištění byla dále podpořena Kaplan-Meierovými křivkami pro míry přežití – OS, DSS a DFS (Obrázek 6 a 7). Podrobné výsledky univariantních a multivariantních analýz pro jednotlivá přežití jsou uvedeny v Příloze 3 – Tabulce S7.

			OS			DSS			DFS		
Prognostický faktor (1)	Prognostický faktor (2)	Celkem pacientů	Počet pacientů	aHR (95% CI)	p	Počet pacientů	aHR (95% CI)	p	Počet pacientů	aHR (95% CI)	p
PD-L1 <sub>IC</sub>	CD8+ TIL										
Nízká	<M	22	13	ref		9	ref		12	ref	
Nízká	≥M	10	4	0.57 (0.15–2.13)	n.s.	3	0.61 (0.13–2.81)	n.s.	6	1.39 (0.42–4.65)	n.s.
Vysoká	<M	3	2	0.37 (0.05–2.62)	n.s.	2	0.40 (0.05–3.42)	n.s.	2	0.98 (0.12–8.36)	n.s.
Vysoká	≥M	17	2	0.08 (0.01–0.52)	<b>0.008</b>	1	0.05 (0.00–0.62)	<b>0.020</b>	2	0.15 (0.02–1.00)	<b>0.050</b>
PD-L1 <sub>IC</sub>	TIL denzita										
Nízká	Snížená	19	12	ref		8	ref		10	ref	
Nízká	Zvýšená	13	5	0.52 (0.16–1.66)	n.s.	4	0.71 (0.17–2.91)	n.s.	8	0.97 (0.33–2.83)	n.s.
Vysoká	Snížená	5	2	0.31 (0.04–2.18)	n.s.	2	0.70 (0.06–7.60)	n.s.	3	1.58 (0.25–10.18)	n.s.
Vysoká	Zvýšená	15	2	0.07 (0.01–0.46)	<b>0.006</b>	1	0.05 (0.00–0.61)	<b>0.020</b>	1	0.04 (0.00–0.51)	<b>0.013</b>

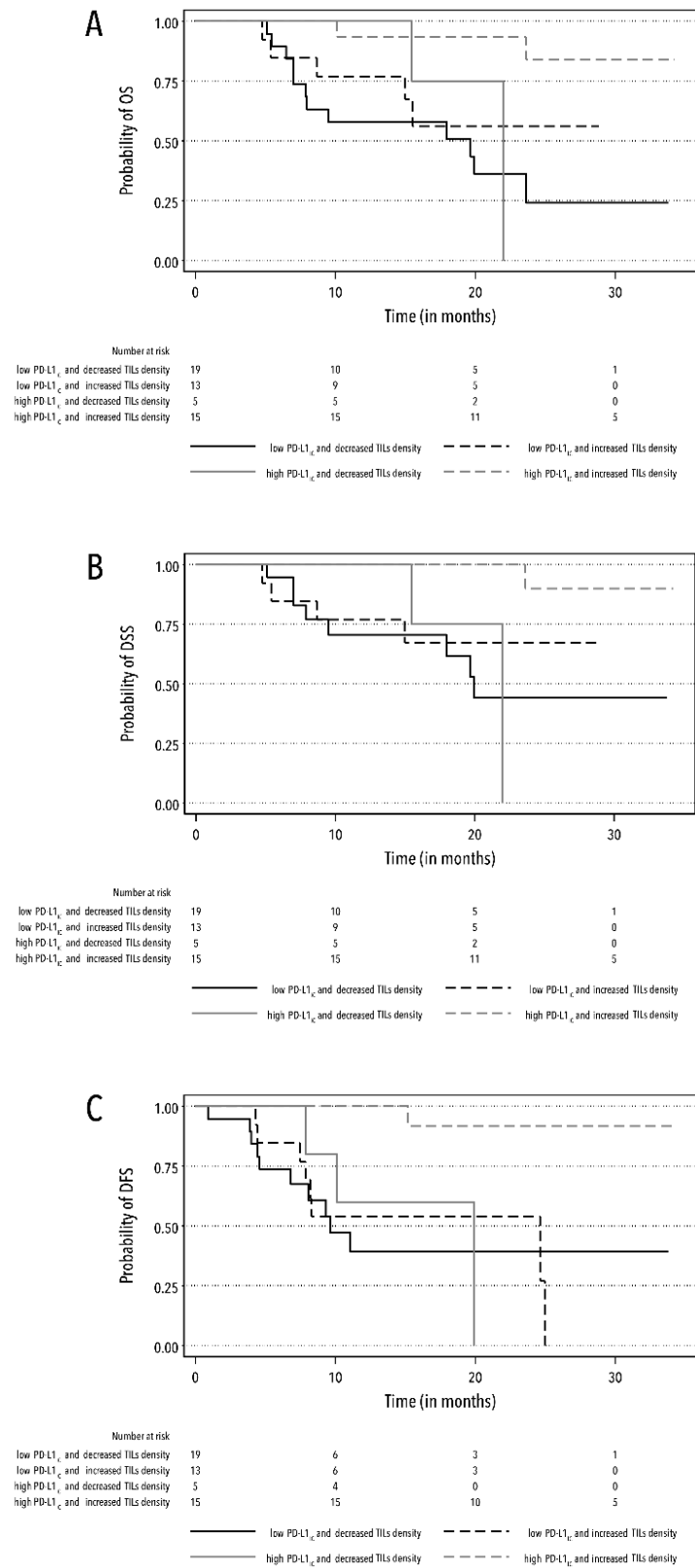
Tabulka 5: Asociace mezi interakcí prognostických faktorů a parametry přežití, multivariantní analýza

aHR = adjustovaný poměr rizik (adjustace pro kovariáty pohlaví, věk, abúzus alkoholu, status kouření, HPV pozitivita, stádium onemocnění, konkomitantní chemoterapie, status očkování proti covidu-19 a bakteriální infekce); CI = interval spolehlivosti; ref = reference; OS = celkové přežití; DSS = nádorově specifické přežití; DFS = přežití bez známek onemocnění; p = p-hodnota; M = medián (28/mm<sup>2</sup> pro CD8+ TIL); TC = nádorové buňky; IC = imunitní buňky; TIL = tumor infiltrující lymfocyty; denzita TIL = snižená < 30 %, zvýšená > 30 %; PD-L1 = ligand receptoru programované smrti 1; PD-L1<sub>IC</sub> = procentuální rozdíl mezi expresí PD-L1 na imunitních a nádorových buněk – nízká < 10 %, vysoká > 10 %; n. s. = nesignifikantní; signifikantní výsledky jsou zvýrazněny tučně.





**Obrázek 5: Kaplan-Meierovy křivky pro míru OS (A), DSS (B) a (C) DFS v závislosti na kombinaci vysoké a nízké PD-L1<sub>c</sub> exprese a vysoké a nízké infiltrace CD8+ TIL**



**Obrázek 6: Kaplan-Meierovy křivky pro míru OS (A), DSS (B) a (C) DFS v závislosti na kombinaci vysoké a nízké PD-L1<sub>c</sub> exprese a snížené a zvýšené density TIL**

### 3.2.4 Diskuse

Studie ONKOL-01-Head and neck byla vedena jako prospektivní studie s cílem posouzení prognostického potenciálu imunitních biomarkerů (PD-L1 a TIL) u pacientů s pokročilými stádii HNSCC podstupujících definitivní léčbu radioterapií nebo radiochemoterapií. Kromě hodnocení efektu jednotlivých biomarkerů se studie zaměřila především na interakce obou biomarkerů a jejich prognostický význam a dopad na terciární prevenci. Tím přináší nový pohled na problematiku prognostických biomarkerů ve srovnání s předchozími publikovanými retrospektivními studiemi zabývajícími se podobnou problematikou.

Výsledky studie zodpověděly otázky formulované studijními cíli, a prokázaly prognostický efekt obou biomarkerů ve vztahu k primárnímu i sekundárním cílům studie, resp. parametrům přežití OS, DSS a DFS. Při samostatném hodnocení efektu biomarkerů byla vysoká infiltrace CD8+ TIL asociována s lepším celkovým i nádorově specifickým přežitím pacientů. Rovněž byla pozorována delší doba bez známek recidivy onemocnění. Výsledky tak nepřímou odraží cytotoxickou aktivitu CD8+ TIL a jejich schopnost rozpoznávat a eliminovat nádorové elementy, což činí tuto buněčnou populaci klíčovou v protinádorové imunitní odpovědi. Naše zjištění jsou rovněž v souladu s výsledky dříve publikovaných studií a metaanalýz. <sup>(41, 81, 82)</sup> Podobný prognostický vliv na parametry přežití pozorovaný u vysoké infiltrace CD8+ TIL byl prokázán i v případě zvýšené denzity TIL.

Tento postup hodnocení TIL je navíc robustní a zdá se, že jím lze přesněji odhadovat prognostický potenciál biomarkeru. Definované mezní hodnoty pro zvýšenou a sníženou denzitu TIL lépe charakterizují zastoupení buněčné imunitní komponenty v TME ve srovnání s absolutním počtem CD8+ lymfocytů/mm<sup>2</sup> a mezní hodnotou definovanou mediánem. Navíc denzita TIL zohledňuje kromě CD8+ lymfocytů i další buněčné fenotypy (CD4+ a FOXP3), čímž poskytuje ucelený obraz o podmínkách v nádorovém mikroprostředí, včetně vzájemných interakcí mezi elementy, které přispívají k celkovým výsledkům.

Tyto interakce a podmínky v TME byly podrobně studovány v preklinickém výzkumu, jehož výsledky poskytly popis komplexní modulace cytotoxické protinádorové imunitní odpovědi, reprezentované CD8<sup>+</sup> T-lymfocyty, včetně imunosupresivní aktivity CD4<sup>+</sup> a FOXP3 lymfocytů. <sup>(66)</sup> V kontextu těchto zjištění tak denzita TIL vyjadřuje mnohem přesněji celkovou protinádorovou imunitní aktivitu než konkrétní imunitní biomarker (tj. hladina CD8<sup>+</sup> lymfocytů).

V případě biomarkeru PD-L1 nebyl ve studii pozorován příznivý efekt na parametry přežití, pokud byla hodnocena jeho exprese samostatně na nádorových (TC) nebo imunitních (IC) buňkách. Naopak exprese PD-L1 na TC byla asociována s horší prognózou, tzn. kratším DSS a DFS, podobně jako v jiných studiích. <sup>(87, 89)</sup> Tyto výsledky tak potvrzují teoretické předpoklady o patofyziologickém mechanismu působení exprese PD-L1, kterou nádorové buňky využívají k úniku před imunitním dohledem. <sup>(105)</sup> Jelikož byla exprese PD-L1 na TC a IC stanovena ve stejném řezu nádorovou tkání, použili jsme pro další hodnocení prognostického efektu kritérium vysoké exprese PD-L1<sub>IC</sub>, definované rozdílem jeho expresí IC a TC  $\geq 10\%$ . Pacienti, u nichž byla prokázána vysoká exprese PD-L1<sub>IC</sub>, dosáhli vyšší míry přežití, včetně OS, DSS, DFS a LRFS, v porovnání s pacienty s nízkou PD-L1<sub>IC</sub> expresí. Výsledky tak navazují na předchozí publikované studie <sup>(93, 94, 95)</sup> zabývající se touto problematikou a potvrzují prognostický potenciál exprese PD-L1 na imunitních buňkách, resp. vysoké exprese PD-L1<sub>IC</sub>. Tento způsob hodnocení současně eliminuje rozdíly v mezních hodnotách, definujících pozitivitu exprese ligandu, což vede k zobecnění a poskytuje možnosti jeho univerzálního použití u HNSCC pacientů.

Výsledky analýzy interakcí obou výše uvedených biomarkerů odhalily silný prognostický účinek této kombinace. Přežití pacientů s vysokou expresí PD-L1<sub>IC</sub> spolu s mediánem vysoké infiltrace CD8<sup>+</sup> TIL nebo zvýšenou denzitou TIL bylo významně delší než u pacientů, kteří nesplňovali obě kritéria. Efekt kombinace byl patrný u všech zkoumaných ukazatelů přežití s výjimkou parametru DMFS, tedy přežití bez vzdálených metastáz. Tato specifická míra přežití byla pravděpodobně nedostatečně podpořena nízkým počtem pacientů s metastatickou progresí onemocnění po léčbě během následné dispenzarizace.

Interakce biomarkerů naznačují, že vyšší exprese PD-L1 na IC oproti TC spolu se zvýšenou denzitou TIL hraje klíčovou roli v modulaci imunitních interakcí v TME, což vede ke zvýšení protinádorové odpovědi zprostředkované T-lymfocyty. Jedná se o komplexní mechanismy, pravděpodobně zahrnující aktivitu antigen prezentujících buněk, které prostřednictvím exprese PD-L1 stimulují cytotoxickou odpověď CD8+ TIL a současně inhibují aktivitu CD4+ a FOXP3 T-lymfocytů. <sup>(66)</sup> Uvedená zjištění tak upozorňují na potřebu hodnocení prognostického potenciálu imunitních biomarkerů v kontextu jejich vzájemných interakcí v TME, aby se předešlo chybným či nepřesným závěrům.

Hlavní výsledek této studie zdůrazňuje roli imunitních biomarkerů u pacientů s HNSCC. Interakce obou výše uvedených biomarkerů se shodně ukázala jako silný prognostický faktor přežití pacientů nezávislý na standardních klinicko-patologických charakteristikách (pohlaví, věk, stádium onemocnění, stupeň diferenciacie, HPV pozitivita), anamnéze kouření, abúzu alkoholu, režimu radioterapie nebo použití konkomitantní chemoterapie. Skutečnost, že nebyla zjištěna souvislost mezi stádiem onemocnění a mírou přežití, je pravděpodobně způsobena homogenitou souboru a výhradním zastoupením pokročilých stadií III a IV. Výsledky naší studie jsou v souladu s dříve publikovanými studiemi, které našly asociaci mezi expresí PD-L1 na IC a příznivým OS u pacientů s HNSCC podstupujících radikální resekci nebo radioterapii nádoru. <sup>(93, 94, 95)</sup> Nicméně žádná z těchto studií nehodnotila interakce biomarkerů, což může vysvětlovat, proč výsledky naznačují kratší míru přežití v porovnání s výsledky naší studie.

Prognostický potenciál kombinace imunitních biomarkerů, prokázaný v této studii, nabízí své uplatnění v terciární prevenci HNSCC. Odhad prognózy onemocnění umožňuje definovat skupinu pacientů nejvíce ohroženou rizikem selhání léčby. Na základě těchto informací je možné optimalizovat dispenzární protokoly a zvýšit pravděpodobnost časně detekce recidivy/progrese onemocnění. Takový postup by mohl pomoci zlepšit především nepříznivé výsledky léčby u pokročilých stadií HNSCC.

Navrhovaný postup není v současné době standardem v léčbě, nicméně by mohl být přínosem zejména pro pacienty s HPV negativními karcinomy, u nichž je terciární prevence založena výhradně na zobrazovacích metodách a fyzikálním vyšetření. V případě HPV pozitivních nádorů jsou diagnostické možnosti terciární prevence nepatrně širší. Nedávno publikované studie upozornily na možnost využití biomarkerů stanovených ze slin k predikci recidivy onemocnění. <sup>(106)</sup> Výsledky naší studie však prokázaly efekt kombinace biomarkerů i u HPV pozitivních nádorů, a tudíž je lze využít v postupech terciární prevence i u této skupiny nádorů.

K hlavním limitacím této studie patří malý počet zařazených pacientů a doba trvání sledování. Nedomníváme se však, že by velikost souboru pacientů mohla ovlivnit konečný výsledek, jelikož odhadovaná síla testu pro klíčovou kombinaci biomarkerů přesáhla 90 %. Na základě těchto výsledků předpokládáme reprodukovatelnost našich zjištění. Vzhledem k tomu, že medián doby sledování byl přibližně dva roky, není jisté, zda by delší doba sledování mohla zásadně zvrátit výsledky přežití. Předpokládáme, že námi navržené prediktory přežití budou stabilní i po delší dobu sledování, i kdyby se jejich prognostický potenciál mohl časem snižovat.

#### 4 ZÁVĚRY

Cíle této studie byly naplněny a podařilo se definovat nové prognostické faktory u pacientů se skvamózním karcinomem hlavy a krku (HNSCC) podstupujících radikální (definitivní) radioterapii nebo radiochemoterapii. Kombinace imunitních biomarkerů, vysoké exprese PD-L1 na IC a zvýšené denzity tumor-infiltrujících lymfocytů (TIL) se v této studii potvrdila jako silný prognostický faktor pro celkové i nádorově specifické přežití u pacientů s pokročilým HNSCC. Dříve publikované studie zabývající se touto problematikou konzistentně potvrdily prognostický potenciál CD8+ TIL, zatímco v případě exprese PD-L1 byly výstupy ze studií nejednoznačné. Výsledky naší studie tyto poznatky prohloubily, zpřesnily a současně zdůraznily význam metodiky hodnocení obou biomarkerů, především hodnocení denzity TIL a rozdílu expresí PD-L1 na imunitních a nádorových buňkách. Výsledky studie byly publikovány 4. dubna 2024 v časopise *Frontiers in Oncology*. <sup>(107)</sup> (Příloha 4 – full text manuskriptu)

Tumor infiltruující lymfocyty (TIL) jsou významným imunitním biomarkerem u pacientů s HNSCC, který lze využít k predikci prognózy onemocnění. Při hodnocení tumor infiltruujících lymfocytů poskytuje denzita TIL v porovnání s infiltrací CD8+ TIL přesnější informace o prognostickém potenciálu tohoto biomarkeru, jelikož zohledňuje jednotlivé fenotypy T-lymfocytů a jejich vzájemné interakce.

Signální molekula PD-L1 je vedle TIL dalším významným imunitním biomarkerem, který lze využít k predikci prognózy HNSCC. Zásadní je přitom metodika hodnocení PD-L1 exprese, tj. samostatné hodnocení na imunitních (IC) a nádorových (TC) buňkách při stanovení rozdílu hladin obou expresí, tj. IC ve vztahu k TC. Hodnocení biomarkeru pomocí kombinovaného pozitivního skóre (CPS), které je v současné klinické praxi používáno pro predikci účinnosti monoklonálních protilátek (checkpoint inhibitorů), nelze použít pro odhad prognózy HNSCC. Tento způsob hodnotí PD-L1 expresi neselektivně, sumačně na TC i IC a neumožňuje demonstrovat prognostický potenciál PD-L1 exprese na IC.

Oba biomarkery lze bezpečně použít k odhadu prognózy přežití pacientů s HNSCC. Nicméně, vzhledem k jejich funkčním charakteristikám a zapojení v nádorovém mikroprostředí je optimální hodnotit jejich interakce, tzn. kombinaci obou biomarkerů (PD-L1<sub>IC</sub> + denzita TIL). Tento způsob hodnocení poskytuje nejpřesnější výsledky. Metodika hodnocení biomarkerů použitá ve studii eliminuje potenciální zkreslení způsobené rozdíly v mezních hodnotách, definujících pozitivitu biomarkerů. V tomto ohledu se jeví jako spolehlivá, a tudíž by mohla být zavedena do běžné praxe i pro budoucí klinické studie, zabývající se podobnou problematikou.

Výsledky studie poskytují nový náhled na možnosti terciární prevence HNSCC. Vyšetření imunoprofilu nádoru a stanovení imunitních biomarkerů umožňuje definovat skupinu pacientů s agresivním fenotypem nádoru a nepříznivou prognózou, tzn. vyšším rizikem recidivy nebo progresu onemocnění. Tyto informace by mohly být využity pro optimalizaci léčebných postupů a úpravu dispenzárních protokolů. Zejména zvýšení frekvence a četnosti vyšetření při dispenzárních kontrolách by mohlo přispět k lepší diagnostice recidiv onemocnění a umožnit včasné zahájení léčby, což by ve výsledku mohlo pozitivně ovlivnit parametry přežití pacientů.

Vzhledem k účinku biomarkerů a výsledkům studie je možné tato zjištění aplikovat jak na HPV negativní, tak na HPV pozitivní karcinomy. Stratifikace pacientů do rizikových skupin by mohla být současně využita k modifikaci léčebných postupů. Deeskalace léčby u skupiny pacientů s příznivou prognózou by mohla pomoci snížit riziko pozdních nežádoucích účinků léčby a tím pozitivně ovlivnit kvalitu jejich života. Naopak u pacientů s vysokým rizikem recidivy onemocnění by bylo možné zvažovat zařazení inhibitorů kontrolních bodů do léčebných algoritmů v závislosti na charakteristikách imunoprofilu nádoru a kombinace obou imunitních biomarkerů v TME. Platnost těchto hypotéz však bude nutné ověřit v dalších klinických studiích.



## 5 ABSTRAKT

**Úvod:** Incidence skvamózního karcinomu hlavy a krku (HNSCC) zaznamenává celosvětově setrvale vzrůstající trend, navzdory známým rizikovým faktorům a primární prevenci tohoto onemocnění. Vzhledem k absenci screeningových programů je sekundární prevence neúčinná, proto je oblastí klinického a vědeckého zájmu terciární prevence. V této souvislosti se jeví žádoucí nalezení nových prognostických faktorů, které by pomohly přispět ke zlepšení výsledků a naplnění cílů terciární prevence. Výzkum v oblasti imuno-onkologie a studium imunitních biomarkerů v nádorovém mikroprostředí (TME) nabízí v tomto ohledu nové perspektivy. Jejich využití pro odhad prognózy onemocnění je v éře personalizované medicíny perspektivou pro optimalizaci terapeutických postupů s cílem zlepšení celkových výsledků léčby s pozitivním dopadem na terciární prevenci onemocnění.

**Pacienti a metody:** Pro hodnocení prognostického potenciálu imunitních biomarkerů v TME u pacientů s HNSCC byla iniciována monocentrická prospektivní kohortová studie „ONKOL-01-Head and neck“ na Onkologické klinice FN Ostrava Poruba od června 2020. Do studie byli zařazováni dospělí pacienti ve věku 18 až 90 let s histologicky verifikovaným HNSCC v lokalitách: dutina ústní, nosní, orofarynx, larynx a hypofarynx; v klinickém stádiu nemoci I–IVb, indikovaní k radikální radioterapii nebo radiochemoterapii. Ze studie byli vyloučeni pacienti s jiným histologickým typem než HNSCC, ale také pacienti se vzdálenými metastázami, synchronními či duplicitními malignitami, recidivujícími nádory nebo pacienti po předchozí léčbě zářením či chemoterapií. Podmínkou zařazení byla dostupnost bioptických vzorků nádorové tkáně v parafinových blocích. Přítomnost imunitních biomarkerů byla hodnocena v nádorové tkáni imunohistochemickou analýzou. Primární cíl studie hodnotil vztah mezi expresí ligandu receptoru programované smrti 1 (PD-L1), tumor infiltrujících lymfocytů (TIL) a parametrem celkového přežití (OS). Sekundární cíle hodnotily parametry specifických nádorových přežití. Asociace mezi přítomností biomarkerů a mírou přežití byly hodnoceny pomocí hrubých a adjustovaných poměrů rizika (cHR, resp. aHR), získaných z Coxovy regrese proporcionálních rizik.

**Výsledky:** Z celkového počtu 55 zařazených pacientů do studie v období od 1. června 2020 do 9. srpna 2022, došlo v průběhu mediánu sledování 19,7 měsíců k 21 (38,2 %) úmrtím z jakékoli příčiny a k 15 (27,3 %) úmrtím v souvislosti s nádorovým onemocněním. Celkové přežití (OS) dosahovalo 61,8 % a nádorově specifické přežití (DSS) 72,7 %. Z výsledků byla prokázána statisticky signifikantní asociace mezi mírou přežití pacientů a  $\geq 10\%$  rozdílem v expresi PD-L1 na imunitních a nádorových buňkách (vysoká exprese PD-L1<sub>IC</sub>) jak v univariantní, tak v multivariantní analýze. Současně byla také potvrzena silná asociace mezi OS a kompozitním biomarkerem vysoké exprese PD-L1<sub>IC</sub> spolu s vysokou infiltrací CD8<sup>+</sup> TIL nad mediánem počtu elementů nebo zvýšenou denzitou TIL > 30 %, jak demonstrovaly aHR 0,08 (95% CI, 0,01 až 0,52), resp. 0,07 (95% CI, 0,01 až 0,46). Podobné výsledky byly prokázány i u dalších specifických nádorových přežití.

**Závěr:** Výsledky této studie prokázaly silný prognostický potenciál imunitních biomarkerů (vysoké PD-L1<sub>IC</sub> ve spojení se zvýšenou denzitou TIL infiltrace) u pacientů s pokročilými HNSCC podstupujících definitivní léčbu radioterapií nebo radiochemoterapií. Metodika hodnocení biomarkerů a použitá definice vysoké exprese PD-L1<sub>IC</sub> a zvýšené denzity TIL se jeví jako přesná a spolehlivá, a mohla by být proto zavedena do klinické praxe pro účely budoucích studií. Prognostický potenciál kombinace biomarkerů by mohl být využit pro stratifikaci pacientů do rizikových skupin dle prognózy přežití, což by umožnilo optimalizovat dispenzární protokoly a upravit léčebné postupy.

**Registrace studie:** Studie byla registrována na *Clinicaltrials.gov* – NCT05941676.

**Grant:** institucionální podpora Fakultní nemocnice Ostrava – RVO-FNOs/2021.

## 6 ABSTRACT

**Introduction:** The incidence of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) is on a continuous increasing trend worldwide, despite known risk factors and primary prevention of the disease. Secondary prevention is ineffective due to the lack of screening programmes. Tertiary prevention is therefore a research and clinical area of interest. In this context, the search for new prognostic factors that would improve outcomes and meet the goals of tertiary prevention is desirable. Therefore, research in immuno-oncology and the study of immune biomarkers in the tumor microenvironment (TME) offers new perspectives in this regard. In the era of personalized medicine, the use of biomarkers to estimate disease prognosis is a promising strategy for optimizing therapeutic approaches to improve overall treatment outcomes with a positive impact on tertiary prevention of disease.

**Material and methods:** To evaluate the prognostic potential of immune biomarkers in TME of HNSCC patients, a prospective monocentric cohort study "ONKOL-01-Head and Neck" was initiated at the Department of Oncology, Ostrava University Hospital, from June 2020. The study enrolled adult patients aged 18 to 90 years with histologically verified HNSCC in the oral cavity, nasal cavity, oropharynx, larynx and hypopharynx; clinical stage I-IVb, indicated for radical radiotherapy and/or radiochemotherapy. Patients with histologic types other than HNSCC, as well as patients with distant metastases, synchronous or multiple malignancies, recurrent tumors, or patients after prior radiation or the use of chemotherapy were excluded from the study. Availability of biopsy samples of tumour tissue in paraffin blocks was required. Immunohistochemical analysis was used to evaluate the presence of immune biomarkers in tumor tissue. The primary endpoint of the study assessed the association between the expression of ligand of programmed death receptor 1 (PD-L1) and tumor infiltrating lymphocytes (TILs) and overall survival (OS). Secondary endpoints focused on other cancer specific survival rates. Associations between biomarkers and survival rates were assessed by crude and adjusted hazard ratios (cHR, aHR, respectively) obtained from Cox proportional hazards regression.

**Results:** Among a total of 55 patients enrolled in the study between June 1, 2020 and August 9, 2022 within a median follow-up of 19,7 months, there were 21 (38,2 %) all-cause deaths and 15 (27,3 %) cancer-related deaths. An overall survival (OS) rate of 61,8 % and a disease-specific survival (DSS) rate of 72,7 % were recorded. A significant association between survival rates and a  $\geq 10\%$  difference in PD-L1 expression on immune versus tumor cells (high PD-L1<sub>IC</sub> expression) was documented regardless of the type of analysis (univariate or multivariate). In addition, a stronger association was confirmed for OS and the composite biomarker high PD-L1<sub>IC</sub> expression along with either median-higher CD8<sup>+</sup> TIL count or increased TIL density  $\geq 30\%$ , as indicated by an aHR of 0,08 (95% CI, 0,01 to 0,52) and 0,07 (95% CI, 0,01 to 0,46), respectively. Similar results were demonstrated for other specific survival rates.

**Conclusion:** The early results of this study demonstrated the strong prognostic potential of immune biomarkers (high PD-L1<sub>IC</sub> in association with increased TIL density) in patients with advanced HNSCC undergoing definitive treatment with radiotherapy and/or radiochemotherapy. The methodology used for biomarker assessment and definition of high PD-L1<sub>IC</sub> expression and increased TIL density appears to be accurate and reliable and could therefore be implemented in clinical practice for future studies. The prognostic potential of the combination of biomarkers could be used to stratify patients into risk groups according to survival prognosis, which would allow to optimize follow-up protocols and tailor treatment strategies.

**Trial registration:** The study is registered with *Clinicaltrials.gov*. – NCT05941676

**Funding:** Institutional Support to Ostrava University Hospital grant – RVO-FNOs/2021.

## 7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- 1 Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, *et al.* Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer* 2019; **144**: 1941–53.
- 2 La Vecchia C, Bosetti C, Lucchini F, *et al.* Cancer mortality in Europe, 2000–2004, and an overview of trends since 1975. *Ann Oncol* 2010; **21**: 1323–60.
- 3 Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, *et al.* Cancer statistics for the year 2020: An overview. *Int J Cancer* 2021; **149**: 778–89.
- 4 Wyss A, Hashibe M, Chuang S-C, *et al.* Cigarette, Cigar, and Pipe Smoking and the Risk of Head and Neck Cancers: Pooled Analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Am J Epidemiol* 2013; **178**: 679–90.
- 5 Pande P, Soni S, Chakravarti N, Mathur M, Shukla NK, Ralhan R. Prognostic impact of Ets-1 overexpression in betel and tobacco related oral cancer. *Cancer Detect Prev* 2001; **25**: 496–501.
- 6 Sharma DC. Betel quid and areca nut are carcinogenic without tobacco. *Lancet Oncol* 2003; **4**: 587.
- 7 Tuyns A, Esteve J, Raymond L, *et al.* Cancer of the larynx/hypopharynx, tobacco and alcohol: Iarc international case-control study in Turin and Varese (Italy), Zaragoza and Navarra (Spain), Geneva (Switzerland) and Calvados (France). *Int J Cancer* 1988; **41**: 483–91.
- 8 Mork J, Lie AK, Glatte E, *et al.* Human Papillomavirus Infection as a Risk Factor for Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *N Engl J Med* 2001; **344**: 1125–31.
- 9 D’Souza G, Kreimer AR, Viscidi R, *et al.* Case–Control Study of Human Papillomavirus and Oropharyngeal Cancer. *N Engl J Med* 2007; **356**: 1944–56.
- 10 Hobbs CGL, Sterne JAC, Bailey M, Heyderman RS, Birchall MA, Thomas SJ. Human papillomavirus and head and neck cancer: a systematic review and meta-analysis. *Clin Otolaryngol* 2006; **31**: 259–66.
- 11 Gillison ML, Chaturvedi AK, Anderson WF, Fakhry C. Epidemiology of Human Papillomavirus–Positive Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *J Clin Oncol* 2015; **33**: 3235–42.
- 12 Tsao SW, Yip YL, Tsang CM, *et al.* Etiological factors of nasopharyngeal carcinoma. *Oral Oncol* 2014; **50**: 330–8.
- 13 Johnson DE, Burtneß B, Leemans CR, Lui VWY, Bauman JE, Grandis JR. Head and neck squamous cell carcinoma. *Nat Rev Dis Primer* 2020; **6**: 92.

- 14 Som PM, Curtin HD, Mancuso AA. Imaging-Based Nodal Classification for Evaluation of Neck Metastatic Adenopathy. *Am J Roentgenol* 2000; **174**: 837–44.
- 15 Mao Y, Hedgire S, Harisinghani M. Radiologic Assessment of Lymph Nodes in Oncologic Patients. *Curr Radiol Rep* 2014; **2**: 36.
- 16 Gaddikeri S, Gaddikeri RS, Tailor T, Anzai Y. Dynamic Contrast-Enhanced MR Imaging in Head and Neck Cancer: Techniques and Clinical Applications. *Am J Neuroradiol* 2016; **37**: 588–95.
- 17 Al-Ibraheem A, Buck A, Krause BJ, Scheidhauer K, Schwaiger M. Clinical Applications of FDG PET and PET/CT in Head and Neck Cancer. *J Oncol* 2009; **2009**: 1–13.
- 18 Brierley J, Gospodarowicz MK, Wittekind C, editors. TNM classification of malignant tumours, Eighth edition. Chichester, West Sussex, UK ; Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc, 2017.
- 19 Alfouzan AF. Review of surgical resection and reconstruction in head and neck cancer: Traditional versus current concepts. *Saudi Med J* 2018; **39**: 971–80.
- 20 Alterio D, Marvaso G, Ferrari A, Volpe S, Orecchia R, Jereczek-Fossa BA. Modern radiotherapy for head and neck cancer. *Semin Oncol* 2019; **46**: 233–45.
- 21 Muz B, de la Puente P, Azab F, Azab AK. The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy. *Hypoxia Auckl NZ* 2015; **3**: 83–92.
- 22 Cooper JS, Pajak TF, Forastiere AA, *et al*. Postoperative concurrent radiotherapy and chemotherapy for high-risk squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 2004; **350**: 1937–44.
- 23 Pignon J-P, le Maître A, Maillard E, Bourhis J, MACH-NC Collaborative Group. Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC): an update on 93 randomised trials and 17,346 patients. *Radiother Oncol J Eur Soc Ther Radiol Oncol* 2009; **92**: 4–14.
- 24 Graboyes EM, Garrett-Mayer E, Ellis MA, *et al*. Effect of time to initiation of postoperative radiation therapy on survival in surgically managed head and neck cancer. *Cancer* 2017; **123**: 4841–50.
- 25 Al-Sarraf M. Treatment of locally advanced head and neck cancer: historical and critical review. *Cancer Control J Moffitt Cancer Cent* 2002; **9**: 387–99.
- 26 Tobias JS, Monson K, Gupta N, *et al*. Chemoradiotherapy for locally advanced head and neck cancer: 10-year follow-up of the UK Head and Neck (UKHAN1) trial. *Lancet Oncol* 2010; **11**: 66–74.
- 27 Lacas B, Bourhis J, Overgaard J, *et al*. Role of radiotherapy fractionation in head and neck cancers (MARCH): an updated meta-analysis. *Lancet Oncol* 2017; **18**: 1221–37.

- 28 Kearney PL, Watkins JM, Shirai K, *et al.* Salvage Resection for Isolated Local and/or Regional Failure of Head/Neck Cancer Following Definitive Concurrent Chemoradiotherapy Case Series and Review of the Literature. *McGill J Med MJM Int Forum Adv Med Sci Stud* 2011; **13**: 29.
- 29 Lee DH, Roh J, Baek S, *et al.* Second Cancer Incidence, Risk Factor, and Specific Mortality in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Otolaryngol Neck Surg* 2013; **149**: 579–86.
- 30 Schwartz DL, Barker J, Chansky K, *et al.* Postradiotherapy surveillance practice for head and neck squamous cell carcinoma--too much for too little? *Head Neck* 2003; **25**: 990–9.
- 31 Langendijk JA, Doornaert P, Verdonck-de Leeuw IM, Leemans CR, Aaronson NK, Slotman BJ. Impact of late treatment-related toxicity on quality of life among patients with head and neck cancer treated with radiotherapy. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2008; **26**: 3770–6.
- 32 Simo R, Homer J, Clarke P, *et al.* Follow-up after treatment for head and neck cancer: United Kingdom National Multidisciplinary Guidelines. *J Laryngol Otol* 2016; **130**: S208–11.
- 33 Kawecki A, Krajewski R. Follow-up in patients treated for head and neck cancer. *Memo - Mag Eur Med Oncol* 2014; **7**: 87–91.
- 34 Barsouk A, Aluru JS, Rawla P, Saginala K, Barsouk A. Epidemiology, Risk Factors, and Prevention of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Med Sci* 2023; **11**: 42.
- 35 Hashim D, Genden E, Posner M, Hashibe M, Boffetta P. Head and neck cancer prevention: from primary prevention to impact of clinicians on reducing burden. *Ann Oncol* 2019; **30**: 744–56.
- 36 Herrero R, Quint W, Hildesheim A, *et al.* Reduced Prevalence of Oral Human Papillomavirus (HPV) 4 Years after Bivalent HPV Vaccination in a Randomized Clinical Trial in Costa Rica. *PLoS ONE* 2013; **8**: e68329.
- 37 Sankaranarayanan R, Ramadas K, Thomas G, *et al.* Effect of screening on oral cancer mortality in Kerala, India: a cluster-randomised controlled trial. *The Lancet* 2005; **365**: 1927–33.
- 38 Ng SP, Pollard C, Kamal M, *et al.* Risk of second primary malignancies in head and neck cancer patients treated with definitive radiotherapy. *Npj Precis Oncol* 2019; **3**: 22.
- 39 Rettig EM, Wentz A, Posner MR, *et al.* Prognostic Implication of Persistent Human Papillomavirus Type 16 DNA Detection in Oral Rinses for Human Papillomavirus–Related Oropharyngeal Carcinoma. *JAMA Oncol* 2015; **1**: 907.

- 40 Chuang AY, Chuang TC, Chang S, *et al.* Presence of HPV DNA in convalescent salivary rinses is an adverse prognostic marker in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2008; **44**: 915–9.
- 41 Nguyen N, Bellile E, Thomas D, *et al.* Tumor infiltrating lymphocytes and survival in patients with head and neck squamous cell carcinoma: Tumor infiltrating lymphocytes. *Head Neck* 2016; **38**: 1074–84.
- 42 Dittberner A, Friedl B, Wittig A, *et al.* Gender Disparities in Epidemiology, Treatment, and Outcome for Head and Neck Cancer in Germany: a Population-Based Long-Term Analysis from 1996 to 2016 of the Thuringian Cancer Registry. *Cancers* 2020; **12**: 3418.
- 43 Cadoni G, Giraldi L, Petrelli L, *et al.* Prognostic factors in head and neck cancer: a 10-year retrospective analysis in a single-institution in Italy. *Acta Otorhinolaryngol Ital* 2017; **37**: 458–66.
- 44 Azam F, Latif MF, Farooq A, *et al.* Performance Status Assessment by Using ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) Score for Cancer Patients by Oncology Healthcare Professionals. *Case Rep Oncol* 2019; **12**: 728–36.
- 45 Pogorzelski M, Hilser T, Ting SC, *et al.* Identification of a Prognostic Clinical Score for Patients With Recurrent or Metastatic Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck Treated With Systemic Therapy Including Cetuximab. *Front Oncol* 2021; **11**: 635096.
- 46 Sanabria A, Carvalho AL, Vartanian JG, Magrin J, Ikeda MK, Kowalski LP. Comorbidity is a prognostic factor in elderly patients with head and neck cancer. *Ann Surg Oncol* 2007; **14**: 1449–57.
- 47 Ruud Kjær EK, Jensen JS, Jakobsen KK, *et al.* The Impact of Comorbidity on Survival in Patients With Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: a Nationwide Case-Control Study Spanning 35 Years. *Front Oncol* 2020; **10**: 617184.
- 48 Fortin A, Couture C, Doucet R, Albert M, Allard J, Tetu B. Does Histologic Grade Have a Role in the Management of Head and Neck Cancers? *J Clin Oncol* 2001; **19**: 4107–16.
- 49 Schmitd LB, Scanlon CS, D’Silva NJ. Perineural Invasion in Head and Neck Cancer. *J Dent Res* 2018; **97**: 742–50.
- 50 Liu JT, Kann BH, De B, *et al.* Prognostic Value of Radiographic Extracapsular Extension in Locally Advanced Head and Neck Squamous Cell Cancers. *Int J Radiat Oncol* 2014; **90**: S509–10.
- 51 Wu Q, Wang M, Liu Y, *et al.* HPV Positive Status Is a Favorable Prognostic Factor in Non-Nasopharyngeal Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Patients: a Retrospective Study From the Surveillance, Epidemiology, and End Results Database. *Front Oncol* 2021; **11**: 688615.



- 52 Kale AD, Angadi PV. Tumor budding is a potential histopathological marker in the prognosis of oral squamous cell carcinoma: Current status and future prospects. *J Oral Maxillofac Pathol JOMFP* 2019; **23**: 318–23.
- 53 Navarro Cuéllar I, Espías Alonso S, Alijo Serrano F, *et al.* Depth of Invasion: Influence of the Latest TNM Classification on the Prognosis of Clinical Early Stages of Oral Tongue Squamous Cell Carcinoma and Its Association with Other Histological Risk Factors. *Cancers* 2023; **15**: 4882.
- 54 Mishra A, Das A, Dhal I, *et al.* Worst pattern of invasion in oral squamous cell carcinoma is an independent prognostic factor. *J Oral Biol Craniofacial Res* 2022; **12**: 771–6.
- 55 Zhu X, Zhang F, Zhang W, He J, Zhao Y, Chen X. Prognostic role of epidermal growth factor receptor in head and neck cancer: a meta-analysis: EGFR and Head and Neck Cancer. *J Surg Oncol* 2013; **108**: 387–97.
- 56 Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The Three Es of Cancer Immunoediting. *Annu Rev Immunol* 2004; **22**: 329–60.
- 57 Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The Immunobiology of Cancer Immunosurveillance and Immunoediting. *Immunity* 2004; **21**: 137–48.
- 58 Kim R, Emi M, Tanabe K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology* 2007; **121**: 1–14.
- 59 Garrido F, Romero I, Aptsiauri N, Garcia-Lora AM. Generation of MHC class I diversity in primary tumors and selection of the malignant phenotype. *Int J Cancer* 2016; **138**: 271–80.
- 60 Borrego F, Ulbrecht M, Weiss EH, Coligan JE, Brooks AG. Recognition of Human Histocompatibility Leukocyte Antigen (HLA)-E Complexed with HLA Class I Signal Sequence–derived Peptides by CD94/NKG2 Confers Protection from Natural Killer Cell–mediated Lysis. *J Exp Med* 1998; **187**: 813–8.
- 61 Balkwill FR, Capasso M, Hagemann T. The tumor microenvironment at a glance. *J Cell Sci* 2012; **125**: 5591–6.
- 62 Walcher L, Kistenmacher A-K, Suo H, *et al.* Cancer Stem Cells—Origins and Biomarkers: Perspectives for Targeted Personalized Therapies. *Front Immunol* 2020; **11**: 1280.
- 63 Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 2012; **12**: 252–64.
- 64 De Jaeghere EA, Denys HG, De Wever O. Fibroblasts Fuel Immune Escape in the Tumor Microenvironment. *Trends Cancer* 2019; **5**: 704–23.
- 65 Wherry EJ. T cell exhaustion. *Nat Immunol* 2011; **12**: 492–9.

- 66 Elmusrati A, Wang J, Wang C-Y. Tumor microenvironment and immune evasion in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Oral Sci* 2021; **13**: 24.
- 67 Barros MHM, Hauck F, Dreyer JH, Kempkes B, Niedobitek G. Macrophage polarisation: an immunohistochemical approach for identifying M1 and M2 macrophages. *PloS One* 2013; **8**: e80908.
- 68 Weber R, Fleming V, Hu X, *et al.* Myeloid-Derived Suppressor Cells Hinder the Anti-Cancer Activity of Immune Checkpoint Inhibitors. *Front Immunol* 2018; **9**: 1310.
- 69 Sionov RV, Fridlender ZG, Granot Z. The Multifaceted Roles Neutrophils Play in the Tumor Microenvironment. *Cancer Microenviron* 2015; **8**: 125–58.
- 70 He X, Xu C. Immune checkpoint signaling and cancer immunotherapy. *Cell Res* 2020; **30**: 660–9.
- 71 Chemnitz JM, Parry RV, Nichols KE, June CH, Riley JL. SHP-1 and SHP-2 Associate with Immunoreceptor Tyrosine-Based Switch Motif of Programmed Death 1 upon Primary Human T Cell Stimulation, but Only Receptor Ligation Prevents T Cell Activation. *J Immunol* 2004; **173**: 945–54.
- 72 Syn N, Wang L, Sethi G, Thiery J-P, Goh B-C. Exosome-Mediated Metastasis: From Epithelial-Mesenchymal Transition to Escape from Immunosurveillance. *Trends Pharmacol Sci* 2016; **37**: 606–17.
- 73 Rowshanravan B, Halliday N, Sansom DM. CTLA-4: a moving target in immunotherapy. *Blood* 2018; **131**: 58–67.
- 74 Binnewies M, Roberts EW, Kersten K, *et al.* Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. *Nat Med* 2018; **24**: 541–50.
- 75 Hadrup S, Donia M, Thor Straten P. Effector CD4 and CD8 T Cells and Their Role in the Tumor Microenvironment. *Cancer Microenviron* 2013; **6**: 123–33.
- 76 Angell H, Galon J. From the immune contexture to the Immunoscore: the role of prognostic and predictive immune markers in cancer. *Curr Opin Immunol* 2013; **25**: 261–7.
- 77 Curry JM, Sprandio J, Cognetti D, *et al.* Tumor Microenvironment in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Semin Oncol* 2014; **41**: 217–34.
- 78 Gooden MJM, De Bock GH, Leffers N, Daemen T, Nijman HW. The prognostic influence of tumour-infiltrating lymphocytes in cancer: a systematic review with meta-analysis. *Br J Cancer* 2011; **105**: 93–103.
- 79 Ward MJ, Thirdborough SM, Mellows T, *et al.* Tumour-infiltrating lymphocytes predict for outcome in HPV-positive oropharyngeal cancer. *Br J Cancer* 2014; **110**: 489–500.

- 80 Shang B, Liu Y, Jiang S, Liu Y. Prognostic value of tumor-infiltrating FoxP3+ regulatory T cells in cancers: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep* 2015; **5**: 15179.
- 81 Borsetto D, Tomasoni M, Payne K, *et al.* Prognostic Significance of CD4+ and CD8+ Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: a Meta-Analysis. *Cancers* 2021; **13**: 781.
- 82 De Ruiter EJ, Ooft ML, Devriese LA, Willems SM. The prognostic role of tumor infiltrating T-lymphocytes in squamous cell carcinoma of the head and neck: a systematic review and meta-analysis. *OncImmunity* 2017; **6**: e1356148.
- 83 Alsaab HO, Sau S, Alzhrani R, *et al.* PD-1 and PD-L1 Checkpoint Signaling Inhibition for Cancer Immunotherapy: Mechanism, Combinations, and Clinical Outcome. *Front Pharmacol* 2017; **8**: 561.
- 84 Lin Y-M, Sung W-W, Hsieh M-J, *et al.* High PD-L1 Expression Correlates with Metastasis and Poor Prognosis in Oral Squamous Cell Carcinoma. *PLOS ONE* 2015; **10**: e0142656.
- 85 Adamski ŁJ, Starzyńska A, Adamska P, *et al.* High PD-L1 Expression on Tumor Cells Indicates Worse Overall Survival in Advanced Oral Squamous Cell Carcinomas of the Tongue and the Floor of the Mouth but Not in Other Oral Compartments. *Biomedicines* 2021; **9**: 1132.
- 86 Yang F, Zeng Z, Li J, Zheng Y, Wei F, Ren X. PD-1/PD-L1 Axis, Rather Than High-Mobility Group Alarmins or CD8+ Tumor-Infiltrating Lymphocytes, Is Associated With Survival in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Patients Who Received Surgical Resection. *Front Oncol* 2018; **8**: 604.
- 87 Yang W, Wong MCM, Thomson PJ, Li K-Y, Su Y. The prognostic role of PD-L1 expression for survival in head and neck squamous cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Oral Oncol* 2018; **86**: 81–90.
- 88 Troiano G, Caponio VCA, Zhurakivska K, *et al.* High PD-L1 expression in the tumour cells did not correlate with poor prognosis of patients suffering for oral squamous cells carcinoma: a meta-analysis of the literature. *Cell Prolif* 2019; **52**: e12537.
- 89 Li J, Wang P, Xu Y. Prognostic value of programmed cell death ligand 1 expression in patients with head and neck cancer: a systematic review and meta-analysis. *PLOS ONE* 2017; **12**: e0179536.
- 90 Wusiman D, Guo L, Huang Z, *et al.* The clinicopathological significance of PD-L1 expression assessed by the combined positive score (CPS) in head and neck squamous cell carcinoma. *Pathol Res Pract* 2022; **236**: 153934.
- 91 Lilja-Fischer JK, Eriksen JG, Georgsen JB, *et al.* Prognostic impact of PD-L1 in oropharyngeal cancer after primary curative radiotherapy and relation to HPV and tobacco smoking. *Acta Oncol* 2020; **59**: 666–72.

- 92 Sanchez-Canteli M, Granda-Díaz R, Del Rio-Ibáñez N, *et al.* PD-L1 expression correlates with tumor-infiltrating lymphocytes and better prognosis in patients with HPV-negative head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer Immunol Immunother* 2020; **69**: 2089–100.
- 93 Fukushima Y, Someya M, Nakata K, *et al.* Influence of PD-L1 expression in immune cells on the response to radiation therapy in patients with oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Radiother Oncol* 2018; **129**: 409–14.
- 94 Kim HR, Ha S-J, Hong MH, *et al.* PD-L1 expression on immune cells, but not on tumor cells, is a favorable prognostic factor for head and neck cancer patients. *Sci Rep* 2016; **6**: 36956.
- 95 Sato F, Ono T, Kawahara A, *et al.* Prognostic impact of p16 and PD-L1 expression in patients with oropharyngeal squamous cell carcinoma receiving a definitive treatment. *J Clin Pathol* 2019; **72**: 542–9.
- 96 Blažek T, Petráš M, Knybel L, Cvek J, Soumarová R. Programmed Cell Death Ligand 1 Expression on Immune Cells and Survival in Patients With Nonmetastatic Head and Neck Cancer: a Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Netw Open* 2023;**6**: e236324.
- 97 Falk DE, O'Malley SS, Witkiewitz K, *et al.* Evaluation of Drinking Risk Levels as Outcomes in Alcohol Pharmacotherapy Trials: a Secondary Analysis of 3 Randomized Clinical Trials. *JAMA Psychiatry* 2019; **76**: 374.
- 98 Spector ME, Bellile E, Amlani L, *et al.* Prognostic Value of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *JAMA Otolaryngol Neck Surg* 2019; **145**: 1012.
- 99 Hendry S, Salgado R, Gevaert T, *et al.* Assessing Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Solid Tumors: a Practical Review for Pathologists and Proposal for a Standardized Method from the International Immuno-Oncology Biomarkers Working Group: Part 2: TILs in Melanoma, Gastrointestinal Tract Carcinomas, Non-Small Cell Lung Carcinoma and Mesothelioma, Endometrial and Ovarian Carcinomas, Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck, Genitourinary Carcinomas, and Primary Brain Tumors. *Adv Anat Pathol* 2017; **24**: 311–35.
- 100 Ono T, Azuma K, Kawahara A, *et al.* Predictive value of CD8 / FOXP3 ratio combined with PD-L1 expression for radiosensitivity in patients with squamous cell carcinoma of the larynx receiving definitive radiation therapy. *Head Neck* 2020; **42**: 3518–30.
- 101 Hughes RT, Porosnicu M, Levine BJ, *et al.* Chemoradiotherapy with high-dose cisplatin compared with weekly cisplatin for locally advanced head and neck squamous cell carcinoma. *J Med Imaging Radiat Oncol* 2021; **65**: 796–805.
- 102 Cvek J, Kubes J, Skacelikova E, *et al.* Hyperfractionated accelerated radiotherapy with concomitant integrated boost of 70–75 Gy in 5 weeks for advanced head and neck cancer: a phase I dose escalation study. *Strahlenther Onkol* 2012; **188**: 666–70.

103 Blažek T, Zděblová Čermáková Z, Knybel L, *et al.* Dose escalation in advanced floor of the mouth cancer: a pilot study using a combination of IMRT and stereotactic boost. *Radiat Oncol* 2021; **16**: 122.

104 Fowler JF. 21 years of Biologically Effective Dose. *Br J Radiol* 2010; **83**: 554–68.

105 Peltanova B, Raudenska M, Masarik M. Effect of tumor microenvironment on pathogenesis of the head and neck squamous cell carcinoma: a systematic review. *Mol Cancer* 2019; **18**: 63.

106 Mirghani H, Jung AC, Fakhry C. Primary, secondary and tertiary prevention of human papillomavirus-driven head and neck cancers. *Eur J Cancer* 2017; **78**: 105–15.

107 Blažek T, Petráš M, Hurník P, *et al.* High PD-L1 expression on immune cells along with increased density of tumor-infiltrating lymphocytes predicts a favorable survival outcome for patients with loco-regionally advanced head and neck cancer: early results from a prospective study. *Front Oncol* 2024; **14**: 1346793.

## 8 PUBLIKACE VZTAHUJÍCÍ SE K TÉMATU

1/ Blažek T, Zděblová Čermáková Z, Knybel L, *et al.* Dose escalation in advanced floor of the mouth cancer: a pilot study using a combination of IMRT and stereotactic boost. *Radiat Oncol* 2021; **16**: 122.

2/ Blažek T, Petráš M, Knybel L, Cvek J, Soumarová R. Programmed Cell Death Ligand 1 Expression on Immune Cells and Survival in Patients With Nonmetastatic Head and Neck Cancer: a Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Netw Open* 2023; **6**: e236324.

3/ Blažek T, Petráš M, Hurník P, *et al.* High PD-L1 expression on immune cells along with increased density of tumor-infiltrating lymphocytes predicts a favorable survival outcome for patients with loco-regionally advanced head and neck cancer: early results from a prospective study. *Front Oncol* 2024; **14**: 1346793.

## 9 Přílohy

### 9.1 Příloha 1: Metaanalýza – full text manuskriptu



Original Investigation | Oncology

## Programmed Cell Death Ligand 1 Expression on Immune Cells and Survival in Patients With Nonmetastatic Head and Neck Cancer A Systematic Review and Meta-analysis

Tomáš Blažek, MD; Marek Petráš, PhD; Lukáš Knybel, PhD; Jakub Cvek, PhD; Renata Soumarová, PhD

### Abstract

**IMPORTANCE** The failure or success of radical treatment in patients with head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) is associated with many known and unknown factors; hence, there is a search for further prognostic markers to help optimize therapeutic strategy and improve treatment outcomes.

**OBJECTIVE** To assess the association of programmed cell death ligand 1 (PD-L1) expression on immune or tumor cells, including its composite expression on both cell types, with overall survival (OS) or specific survival.

**DATA SOURCES** MEDLINE, Embase, PQSciTech, and HCAPlus databases were systematically searched for cohort studies focused on the prognostic role of PD-L1 expression in patients with HNSCC in curative stages of the disease. Search results generated publications from January 1, 2010, to January 6, 2023.

**STUDY SELECTION** Of 3825 publications identified, a total of 17 cohort studies in the English language met inclusion criteria of this systematic review and meta-analysis. Eligible studies reported adjusted hazard ratios (aHRs) with 95% CIs for the association of PD-L1 expression levels with OS and arbitrary specific survival.

**DATA EXTRACTION AND SYNTHESIS** Data from studies were extracted independently by 2 researchers strictly adhering to the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-analyses reporting guidelines and recommendations. The risk of bias was assessed using the Quality in Prognosis Studies tool and Newcastle-Ottawa Scale. Pooled effect estimates were obtained using a random-effect or fixed-effect model based on homogeneity of studies.

**MAIN OUTCOMES AND MEASURES** The primary outcome was to investigate whether there was an association between PD-L1 expression on immune or tumor cells and OS.

**RESULTS** In 17 cohort studies of the association of PD-L1 expression with survival in 3190 patients with HNSCC, high PD-L1 expression on immune cells was associated with a favorable OS (pooled aHR, 0.39; 95% CI, 0.25-0.59). There was no association between composite PD-L1 expression on immune and tumor cells and OS (pooled aHR, 0.79; 95% CI, 0.55-1.14) or between PD-L1 expressed only on tumor cells and OS (pooled aHR, 1.22; 95% CI, 0.87-1.70). A high level of PD-L1 expression on immune cells was associated with favorable specific survival (pooled aHR, 0.52; 95% CI, 0.38-0.72). There were no interactions between tumor location or type of primary treatment (ie, surgery vs radiotherapy or radiochemotherapy) and the association between PD-L1 expression and OS.

(continued)

### Key Points

**Question** Is programmed cell death ligand 1 (PD-L1) expression in the tumor microenvironment of patients with curative-stage head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) associated with overall and specific survival?

**Findings** This systematic review and meta-analysis of 17 cohort studies with 3190 participants of PD-L1 expression found that high PD-L1 expression levels exclusively on immune cells were associated with prolonged overall and specific survival in patients with localized and locoregionally advanced HNSCC, while PD-L1 expression on tumor cells was not associated with survival.

**Meaning** In this systematic review and meta-analysis, the strength of evidence was limited by the small number of studies, which suggests that future research should seek to investigate whether PD-L1 expression on immune cells is associated with survival in patients with HNSCC undergoing curative therapy.

### + Supplemental content

Author affiliations and article information are listed at the end of this article.

**Open Access.** This is an open access article distributed under the terms of the CC-BY License.

JAMA Network Open. 2023;6(3):e236324. doi:10.1001/jamanetworkopen.2023.6324

March 31, 2023 1/10

Abstract (continued)

**CONCLUSIONS AND RELEVANCE** This study's findings suggest that PD-L1 expression on immune cells may serve as a new prognostic biomarker in patients with HNSCC. However, future studies may be warranted to verify this potential role given the limited number of studies on this topic conducted and published to date.

JAMA Network Open. 2023;6(3):e236324. doi:10.1001/jamanetworkopen.2023.6324

## Introduction

In recent years, the concept of the tumor immune microenvironment, with the presence of tumor cells and infiltrating immune cells, has been intensively studied. Of particular interest are the complex interactions between tumor and immune cells that are involved in the dynamic balance between tumor control and progression.<sup>1-5</sup> Several studies<sup>6-8</sup> have reported the potential prognostic relevance of tumor-infiltrating T lymphocytes in various types of cancer, including studies conducted in patients with head and neck cancers. Specifically, head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) is considered a tumor with high immunogenic potential.<sup>5,9</sup>

An integral component of the tumor immune microenvironment is the immunosuppressive activity represented by inhibitory signaling molecules expressed on tumor and immune cells. A major molecule associated with tumor growth is programmed cell death ligand 1 (PD-L1). It suppresses the cytotoxic immune response mediated by CD8+ tumor-infiltrating T lymphocytes by stimulating programmed cell death 1 protein (PD-1) receptors localized on lymphocyte surfaces.<sup>10</sup> While the mechanism of action of PD-L1 and PD-1 complex is well known, the prognostic role of PD-L1 expression in patients with HNSCC remains largely uncertain. Some studies have found a positive association between high PD-L1 expression and improved disease-specific survival, while others have reported a negative association.<sup>11-13</sup> Therefore, we performed this systematic review and meta-analysis to investigate whether PD-L1 expression is associated with survival in patients with curative-stage HNSCC.

## Methods

This systematic review and meta-analysis was prepared in accordance with the recommendations of the Meta-analysis of Observational Studies in Epidemiology (MOOSE) reporting guideline and Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-analyses (PRISMA) reporting guideline. The study protocol was registered in the international prospective register of systematic reviews. The Medical Literature Analysis and Retrieval System Online (MEDLINE), PubMed, Excerpta Medica Database (Embase), ProQuest Science and Technology (PQSciTech), and Chemical Abstracts Plus (HCAPlus) were used in our computerized search combined with manual search for relevant publications using keywords in titles. The search strategy aimed to identify English-language articles and scientific manuscripts published between January 1, 2010, and January 6, 2023, focused on the association of PD-L1 expression with outcomes among patients with HNSCC.

The following main keywords and their synonyms were used: PD-L1 expression coupled with head and neck cancer or head and neck squamous cell carcinoma (eTable 1 in Supplement 1). Studies were considered eligible if they met the following inclusion criteria: was a cohort study of patients with HNSCC in a curative stage of the disease (ie, localized and locoregionally advanced tumors), investigated the association between PD-L1 expression and overall survival (OS) expressed by adjusted hazard ratios (aHRs) with 95% CIs, a biomarker detected by immunohistochemical analysis, included treatment modalities of surgery and radiotherapy or radiochemotherapy, and investigated human papillomavirus (HPV)-negative oropharyngeal carcinomas. Excluded were studies investigating paranasal sinus tumors, thyroid or nasopharyngeal carcinomas, salivary gland tumors,



mucosal melanoma, skin carcinoma, or lymphomas or occult primary tumors, as well as studies involving recurrent disease, previous radiotherapy, or distant metastatic disease. Likewise, studies assessing only HPV-positive carcinoma with different prognoses and biological natures were ineligible for inclusion.

### Data Extraction and Assessment of Risk of Bias

Data extraction, performed separately by 2 authors (T.B. and M.P.), included the study first author and title, year of publication, sample size, type of tissue (resected or biopsy), PD-L1 expression levels on tumor or immune cells, immunohistochemical method with membrane or cytoplasmic staining and cutoff values for PD-L1 positivity, median follow-up time, and survival outcomes and study patient tumor site, stage, grade, HPV status, and treatment modality. Quantitative synthesis was conducted using extracted estimates (ie, aHRs and 95% CIs for OS or specific survival). Study risk of bias (RoB) was assessed using the Quality in Prognosis Studies (QUIPS) tool and Newcastle-Ottawa Quality Assessment Scale.<sup>14,15</sup> Risk of bias was evaluated by 2 independent assessors (T.B. and M.P.), with discrepancies discussed and resolved by consensus.

### Study End Points

The primary end point was OS, defined as the period from initial radical treatment to death for any cause or the time of the last follow-up visit. A secondary end point, specific survival, was the composite of various non-OS outcome types used in selected studies. While tumor and nodal persistence or recurrence of carcinoma were defined by locoregional failure, any type of recurrence was assessed using progression-free survival, disease-free survival, or relapse-free survival. These measures were determined from the date of radiotherapy completion (for locoregional failure), initial treatment (for progression-free survival), or surgery or radiotherapy (for relapse-free survival) to the date of detection of any recurrence or relapse, death from any cause, or the date of last follow-up visit, respectively. Disease-specific survival was established as the time from initial treatment to death from cancer.

### Statistical Analysis

Study-reported aHRs for investigated factors were used for quantitative analysis. The association of PD-L1 expression on immune or tumor cells with OS or specific survival was estimated from pooled aHRs with 95% CIs. The decrease in risk of death was calculated as  $(1 - \text{pooled aHR}) \times 100\%$ .

The pooled outcome was obtained using a random-effects model (DerSimonian-Laird method)<sup>16</sup> or a fixed-effects model (inverse variance method) based on homogeneity among studies. If the inconsistency index  $I^2$  was higher than 25% and the  $P$  value was lower than .10, then interstudy heterogeneity was considered and the pooled aHR was obtained from a random-effects model; otherwise, a fixed-effects model was used.<sup>17</sup> Moreover, changes in outcomes associated with small studies and missing studies were tested as follows: changes in outcomes associated with small studies were determined by the regression model with Egger test, and the summary change in outcome associated with asymmetry while identifying unpublished studies was estimated by the trim and fill method.<sup>18</sup>

In addition, metaregression of investigated associations was conducted to investigate the association of covariates (ie, type of cells, tumor locality, and treatment modality) with outcomes. Statistical analyses were performed using Stata/BE statistical software version 17.0 (StataCorp). All tests were 2-tailed, with the level of significance set at .05.

## Results

A total of 3825 publications were identified, and of 82 eligible articles, 17 studies<sup>19-35</sup> met inclusion criteria and hence were considered eligible for our meta-analysis (**Figure 1**). Characteristics of these studies conducted in a total of 3190 patients with HNSCC at various sites (including the oral cavity,



oropharynx, larynx, and hypopharynx) with stage I through IV disease who underwent radical curative treatment are reported in **Table 1**. The median (IQR) age ranged from 36 (15-45) years<sup>27</sup> to 67 (50-89) years,<sup>19</sup> and the proportion of patients by sex ranged from 14 female patients among 372 total patients (3.8%)<sup>23</sup> to 135 female patients among 517 total patients (26.1%).<sup>30</sup>

In all studies, formalin-fixed, paraffin-embedded hematoxylin and eosin-stained tissue sections were used for PD-L1 detection. Specimens were obtained by surgical resection (15 studies<sup>20-23,25-35</sup>), biopsy (2 studies<sup>19,24</sup>), or both methods (5 studies<sup>21,25,27,28,30</sup>). PD-L1 expression on tumor or immune cells was measured by immunohistochemical analysis using monoclonal or polyclonal antibodies. The level of PD-L1 positivity, not reported in 1 study,<sup>31</sup> was determined using the tumor proportion score in 10 studies,<sup>23,26-30,32-35</sup> immunoreactivity score in 5 studies,<sup>19-22,25</sup> and combined positive score (CPS) in 2 studies.<sup>23,24</sup>

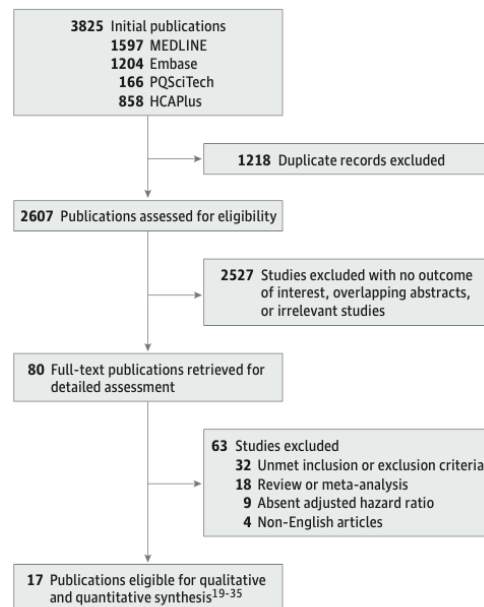
### Association of PD-L1 Expression With Survival

The pooled aHR of 0.93 (95% CI, 0.72-1.20) showed no association between PD-L1 expression on tumor or immune cells and OS (**Figure 2**). However, different outcomes were found when PD-L1 expression was stratified by cell type. High PD-L1 expression on immune cells was associated with OS (pooled aHR, 0.39; 95% CI, 0.25-0.59). There was no association between composite PD-L1 expression on tumor or immune cells and OS (pooled aHR, 0.79; 95% CI, 0.55-1.14) or ligand expression on tumor cells only and OS (pooled aHR, 1.22; 95% CI, 0.87-1.70).

Mutually adjusted metaregression coefficients demonstrated significantly more favorable OS in patients with PD-L1 highly expressed on immune vs tumor cells (regression coefficient, -1.15; 95% CI, -1.95 to -0.35;  $P = .005$ ). Composite PD-L1 expression on both cell types was not associated improved OS or specific survival compared with PD-L1 expressed on only tumor cells (**Table 2**).

Primary outcome results were supported by secondary analysis results. More favorable specific survival was found exclusively in patients with high levels of PD-L1 expression on immune cells (pooled aHR, 0.52; 95% CI, 0.38 to 0.72). In addition, these patients had longer survival compared

Figure 1. Study Flowchart



with those with PD-L1 expression on tumor cells, with a negative metaregression coefficient (−0.88; 95% CI, −1.52 to −0.23; *P* = .008).

### Interaction of Tumor Locality or Treatment Modality With Survival Associations

There was no interaction between cancer site and the association of PD-L1 expression with OS or specific survival, although longer survival was observed in patients with oropharyngeal and hypopharyngeal cancers, with pooled aHRs of 0.70 (95% CI, 0.58-0.85) for OS and 0.80 (95% CI, 0.68-0.95) for specific survival. Nevertheless, outcomes of our metaregression showed no difference in survival among patients without a specified carcinoma site compared with those with oral cavity or oropharyngeal and hypopharyngeal carcinomas. In pooled aHRs and metaregression coefficients stratified by treatment modality (ie, radiotherapy or surgery followed by radiochemotherapy or surgery only), there was no interaction with the association between PD-L1 expression and OS or specific survival (Table 2).

### Quality of Evidence

While all studies exhibited low RoB using the Newcastle-Ottawa Quality Assessment Scale system (eTable 2 in Supplement 1), 7 studies<sup>23,24,27,30-32,35</sup> showed moderate RoB that was associated with

**Table 1. Characteristics of Studies**

Study	No. of patients (cancer site)	Sex, No. male/No. female	Age, median (IQR), y	Treatment	Follow-up, median (IQR), mo	PD-L1 expression	Immunohistochemistry assay	Survival outcome	Determination of PD-L1 positivity	RoB <sup>a</sup>
Fukushima et al, <sup>19</sup> 2018	92 (OP)	77/15	67 (49)	RT, CRT	36 (59)	ICs, TCs	M + C	OS, PFS	IRS	Low
Kim et al, <sup>20</sup> 2016	204 (OC), 122 (OP), 44 (L), 28 (HP), 4 (other)	302/100	58 (66)	S, S + CRT	46 (NR)	ICs, TCs	M + C	OS, RFS	IRS	Low
Sato et al, <sup>21</sup> 2019	137 (OP)	113/24	63 (25)	S, S + RT, CRT	37 (202)	ICs, TCs	M + C	OS, DFS	IRS	Low
Balermipas et al, <sup>22</sup> 2017	41 (OC), 88 (OP), 22 (HP)	131/30	57 (NR)	S, S + CRT	48 (96)	ICs and TC	M + C	OS	IRS	Low
Sánchez-Canteli et al, <sup>23</sup> 2020	24 (OP), 67 (L), 64 (HP)	358/14	59 (56)	S, S + RT	22 (NR)	ICs and TCs	M	OS, DSS	TPS, CPS	Moderate
Lilja-Fischer et al, <sup>24</sup> 2020	303 (OP)	217/86	64 (NR)	RT, CRT	64 (84)	ICs and TCs	M	OS, LRF, DSS	CPS	Moderate
Ngamphaiboon et al, <sup>25</sup> 2019	94 (OC), 31 (OP), 47 (L), 26 (HP), 5 (other)	145/58	64 (59)	S, S + RT, CRT	40 (NR)	ICs and TCs	M + C	OS	IRS	Low
Pena-Cardelles et al, <sup>26</sup> 2022	65 (OC)	40/25	65 (NR)	S, S + CRT	73 (51)	TCs	M	OS, DFS	TPS	Low
Hanna et al, <sup>27</sup> 2018	81 (OC)	49/32	36 (30)	S, S + RT, CRT	74 (226)	TCs	M + C	OS, DFS	TPS	Moderate
Hong et al, <sup>28</sup> 2016	99 (OP)	79/20	58 (49)	S, S + RT, CRT	56 (183)	TCs	M	OS, LRF	TPS	Low
Zhou et al, <sup>29</sup> 2020	36 (L), 38 (OC), 9 (HP), 2 (other)	67/18	57 (49)	S, S + CRT	62 (64)	TCs	M	OS, RFS	TPS	Low
Lyu et al, <sup>30</sup> 2019	391 (OC), 116 (L), 10 (HP)	382/135	NR	S, S + RT, CRT	35 (211)	TCs	M	OS, RFS	TPS	Moderate
Lin et al, <sup>31</sup> 2015	305 (OC)	236/69	NR	S, S + CRT	46 (132)	TCs	M + C	OS	NR	Moderate
Fu et al, <sup>32</sup> 2022	63 (HNSCC)	45/18	65 (37)	S, S + CRT	72 (148)	TCs	M + C	OS, DFS	TPS	Moderate
Adamski et al, <sup>33</sup> 2021	95 (OC)	63/32	NR	S, S + CRT	46 (129)	TCs	M + C	OS	TPS	Low
Yang et al, <sup>34</sup> 2018	64 (HNSCC), 17 (OP)	65/16	NR	S, S + CRT	41 (96)	TCs	M + C	OS, DFS	TPS	Low
Schneider et al, <sup>35</sup> 2018	36 (OC), 58 (OP), 14 (L), 21 (HP)	97/28	NR	S, S + CRT	121 (161)	TCs	M + C	OS, DFS	TPS	Moderate

Abbreviations: C, cytoplasmic staining; CPS, combined positive score; CRT, chemoradiotherapy; DFS, disease-free survival; DSS, disease-specific survival; HNSCC, head and neck squamous cell carcinoma with no specified site; HP, hypopharyngeal; IC, immune cell; IRS, immunoreactivity score; L, laryngeal; LRF, locoregional failure; M, membranous staining; NR, not reported; OC, oral cavity; OP, oropharyngeal; OS, overall survival; PD-L1, programmed cell death ligand 1; PFS, progression-free survival; RFS,

relapse-free survival; RoB, risk of bias; RT, radiotherapy; S, surgery; S + CRT, surgery followed adjuvant chemoradiotherapy; S + RT, surgery followed adjuvant radiotherapy; TC, tumor cell; TPS, tumor proportion score.

<sup>a</sup> Assessed with Quality in Prognosis Study tool.

prognostic and confounding factors or analysis domains when using the QUIPS tool (eTable 3 in Supplement 1). The QUIPS-assessed RoB of studies focusing on the association between PD-L1 expression on immune cells and OS was low.

Figure 2. Association of Programmed Cell Death Ligand 1 Expression Levels With Overall Survival

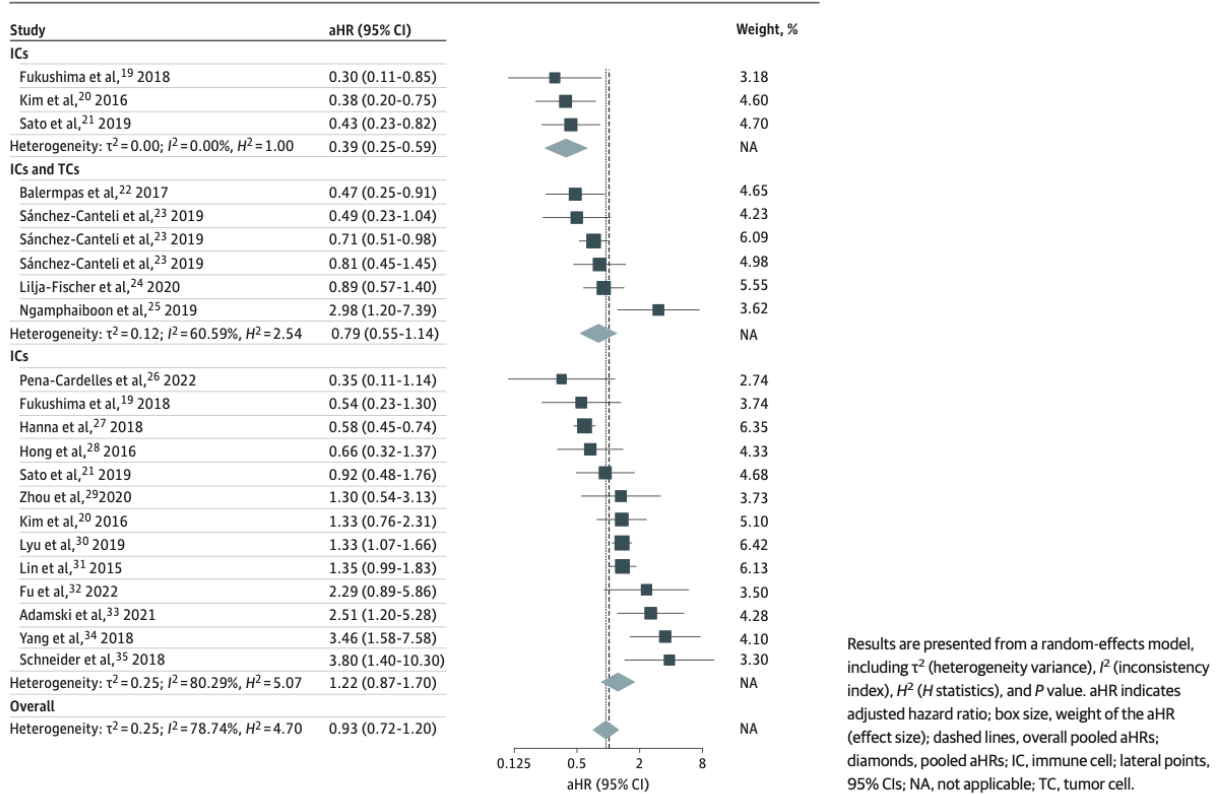


Table 2. Outcomes of Subgroup Meta-analysis and Meta-regression

Factor	Overall survival				Specific survival			
	Estimates, No.	Pooled aHR (95% CI)	Regression coefficient (95% CI)	P value	Estimates, No.	Pooled aHR (95% CI)	Regression coefficient (95% CI)	P value
<b>PD-L1 expression location</b>								
ICs	3	0.39 (0.25 to 0.59)	-1.15 (-1.95 to -0.35)	.005	3	0.52 (0.38 to 0.72)	-0.88 (-1.52 to -0.23)	.008
ICs and TCs	6	0.79 (0.55 to 1.14)	-0.45 (-1.08 to 0.18)	.16	7	0.84 (0.70 to 1.02)	-0.45 (-1.13 to 0.22)	.18
TCs	13	1.22 (0.87 to 1.70)	0 [Reference]	NA	9	1.35 (0.93 to 1.95)	0 [Reference]	NA
<b>Tumor locality</b>								
HNSCC	4	1.27 (0.81 to 1.98)	0 [Reference]	NA	2	1.22 (0.75 to 1.96)	0 [Reference]	NA
Oral cavity	10	0.96 (0.48 to 1.93)	-0.15 (-1.04 to 0.74)	.16	7	1.02 (0.16 to 6.44)	0.27 (-0.28 to 0.82)	.56
Oropharynx and hypopharynx	8	0.70 (0.58 to 0.85)	-0.12 (-0.71 to 0.46)	.25	10	0.80 (0.68 to 0.95)	-0.09 (-0.74 to 0.55)	.42
<b>Treatment modality</b>								
Surgery	13	1.07 (0.74 to 1.55)	-0.49 (-1.17 to 0.20)	.74	9	0.97 (0.63 to 1.50)	0.25 (-1.11 to 0.60)	.34
RT, RCHT, or both	3	0.60 (0.33 to 1.12)	0 [Reference]	NA	7	0.95 (0.73 to 1.24)	0 [Reference]	NA
Surgery and RCHT	6	0.88 (0.54 to 1.44)	-0.38 (-1.04 to 0.27)	.68	3	0.80 (0.41 to 1.54)	-0.27 (-0.93 to 0.38)	.78

Abbreviations: aHR, adjusted hazard ratio; IC, immune cell; HNSCC, head and neck squamous cell carcinoma with no specified site; NA, not applicable; PD-L1, programmed cell death ligand 1; RT, radiotherapy; RCHT, radiochemotherapy; TC, tumor cell.

No publication bias was found among studies assessing PD-L1 expression on immune cells given that the studies met criteria of interstudy homogeneity, and no change in outcome was associated with small studies. Moreover, the estimated contribution of 2 missing studies did not change the primary outcome (imputed aHR, 0.43; 95% CI, 0.31-0.60). By contrast, studies assessing composite PD-L1 expression on both cell types had publication bias associated with different results of the DerSimonian-Laird and inverse variance models. In addition, the fixed-effects models suggested an association as documented by a pooled aHR of 0.76 (95% CI, 0.62-0.94). Nevertheless, no changes in outcomes associated with small studies or missing studies were found.

Likewise, no publication bias was noted in studies with PD-L1 measured exclusively on tumor cells. That is, there was no difference between fixed- and random-effects models and no change in outcome associated with small studies, and there were no missing unpublished studies.

## Discussion

This systematic review and meta-analysis found that PD-L1 expression levels were favorably associated with OS and specific survival when analyzing PD-L1 expressed only on infiltrating immune cells. The outcome of OS and specific survival estimated a reduction in risk of death by 61% and 48%, respectively. Composite PD-L1 expression on tumor and immune cells was not associated with improved survival.

There was no interaction between cancer site in patients with HNSCC and the association between PD-L1 expression and OS or specific survival given that metaregression coefficients did not demonstrate significantly shorter or prolonged survival in patients with oropharyngeal, hypopharyngeal, or oral cavity cancer compared with patients with no site specification. Our metaregression did not suggest whether there was an interaction between treatment modality and the association of PD-L1 and survival because survival stratified by patients undergoing surgery alone or with subsequent radiochemotherapy vs those with radiotherapy did not differ. Our outcomes were independent of tumor grade and stage and patient HPV, smoking, and alcohol consumption status given that the meta-analysis was conducted using only adjusted estimates. We can only speculate whether different immunohistochemical protocols of PD-L1 expression determination, including the cutoff value of positivity, may invert the outcome of our meta-analysis.

Previous meta-analyses in patients with nonmetastatic HNSCC did not show a prognostic potential of PD-L1 expression in association with OS.<sup>36-40</sup> The reason for this may be the cell type specification of PD-L1 expression as documented in our meta-analysis.

Moreover, shortened survival was reported in a study<sup>36</sup> assessing the association of low CD8+ tumor-infiltrating T lymphocytes and PD-L1 expressed on tumor cells with OS and was consistent with our subresult. Weaknesses of recently published meta-analyses may be that they were syntheses of low- to moderate-quality studies with insufficient or unavailable follow-up, missing survival data, or results obtained from univariate analyses.

## Limitations

Although our systematic review and meta-analysis suggested PD-L1 expression on immune cells as a novel prognostic biomarker, the strength of evidence was limited by the small number of studies assessing specific PD-L1 expression. Nevertheless, these studies exhibited interstudy homogeneity and no publication bias. Therefore, future studies may confirm the consistency of our findings as suggested by the pooled aHR of imputed missing studies.

## Conclusions

This systematic review and meta-analysis of 17 studies<sup>19-35</sup> found that high PD-L1 expression levels on immune cells in the tumor immune microenvironment were associated with extended OS and

specific survival in patients with localized and locoregionally advanced HNSCC. Further studies focused on this objective may be warranted to investigate whether high PD-L1 levels on immune cells may serve as a reliable and widely recognized prognostic marker.

#### ARTICLE INFORMATION

**Accepted for Publication:** February 18, 2022.

**Published:** March 31, 2023. doi:10.1001/jamanetworkopen.2023.6324

**Open Access:** This is an open access article distributed under the terms of the [CC-BY License](#). © 2023 Blažek T et al. *JAMA Network Open*.

**Corresponding Author:** Tomáš Blažek, MD, Department of Oncology, Ostrava University Hospital, 17. listopadu 1790/5, 708 52 Ostrava-Poruba, Czech Republic ([tomas.blazek@fno.cz](mailto:tomas.blazek@fno.cz)).

**Author Affiliations:** Department of Oncology, Ostrava University Hospital, Ostrava, Czech Republic (Blažek, Knybel, Cvek); Faculty of Medicine, University of Ostrava, Ostrava, Czech Republic (Blažek, Knybel, Cvek); Department of Epidemiology and Biostatistics, Third Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic (Blažek, Petráš); Department of Oncology, Královské Vinohrady University Hospital, Prague, Czech Republic (Soumarová).

**Author Contributions:** Dr Blažek had full access to all of the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

**Concept and design:** Blazek, Petráš, Soumarová.

**Acquisition, analysis, or interpretation of data:** Blazek, Petráš, Knybel, Cvek.

**Drafting of the manuscript:** Blazek, Petráš, Knybel.

**Critical revision of the manuscript for important intellectual content:** Blazek, Cvek, Soumarová.

**Statistical analysis:** Petráš, Knybel.

**Administrative, technical, or material support:** Blazek, Cvek.

**Supervision:** Petráš, Soumarová.

**Conflict of Interest Disclosures:** Dr Knybel reported receiving grants from University Hospital Ostrava by the Ministry of Health of the Czech Republic and European Union Horizon 2020 research and innovation program outside the submitted work. No other disclosures were reported.

**Funding/Support:** This work was supported by grant NU-22-03-00435 from the Ministry of Health of the Czech Republic.

**Role of the Funder/Sponsor:** The funder had no role in the design and conduct of the study; collection, management, analysis, and interpretation of the data; preparation, review, or approval of the manuscript; and decision to submit the manuscript for publication.

**Data Sharing Statement:** See [Supplement 2](#).

#### REFERENCES

1. Balkwill FR, Capasso M, Hagemann T. The tumor microenvironment at a glance. *J Cell Sci*. 2012;125(Pt 23):5591-5596. doi:10.1242/jcs.116392
2. Curry JM, Sprandio J, Cognetti D, et al. Tumor microenvironment in head and neck squamous cell carcinoma. *Semin Oncol*. 2014;41(2):217-234. doi:10.1053/j.seminoncol.2014.03.003
3. Binnewies M, Roberts EW, Kersten K, et al. Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. *Nat Med*. 2018;24(5):541-550. doi:10.1038/s41591-018-0014-x
4. Hadrup S, Donia M, Thor Straten P. Effector CD4 and CD8 T cells and their role in the tumor microenvironment. *Cancer Microenviron*. 2013;6(2):123-133. doi:10.1007/s12307-012-0127-6
5. Angell H, Galon J. From the immune contexture to the immunoscore: the role of prognostic and predictive immune markers in cancer. *Curr Opin Immunol*. 2013;25(2):261-267. doi:10.1016/j.coi.2013.03.004
6. Mei Z, Liu Y, Liu C, et al. Tumour-infiltrating inflammation and prognosis in colorectal cancer: systematic review and meta-analysis. *Br J Cancer*. 2014;110(6):1595-1605. doi:10.1038/bjc.2014.46
7. Mahmoud SMA, Paish EC, Powe DG, et al. Tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2011;29(15):1949-1955. doi:10.1200/JCO.2010.30.5037



8. Gooden MJM, de Bock GH, Leffers N, Daemen T, Nijman HW. The prognostic influence of tumour-infiltrating lymphocytes in cancer: a systematic review with meta-analysis. *Br J Cancer*. 2011;105(1):93-103. doi:10.1038/bjc.2011.189
9. Uppaluri R, Dunn GP, Lewis JS Jr. Focus on TILs: prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in head and neck cancers. *Cancer Immun*. 2008;8:16.
10. Alsaab HO, Sau S, Alzhrani R, et al. PD-1 and PD-L1 checkpoint signaling inhibition for cancer immunotherapy: mechanism, combinations, and clinical outcome. *Front Pharmacol*. 2017;8:561. doi:10.3389/fphar.2017.00561
11. Rühle A, Todorovic J, Spohn SSK, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating immune cells and immune checkpoints in elderly head-and-neck squamous cell carcinoma patients undergoing definitive (chemo)radiotherapy. *Radiat Oncol*. 2022;17(1):181. doi:10.1186/s13014-022-02153-9
12. Quan H, Liu S, Shan Z, et al. Differential expression of programmed death-1 and its ligand, programmed death ligand-1 in oral squamous cell carcinoma with and without oral submucous fibrosis. *Arch Oral Biol*. 2020;119:104916. doi:10.1016/j.archoralbio.2020.104916
13. de Vicente JC, Rodríguez-Santamarta T, Rodrigo JP, Blanco-Lorenzo V, Allonca E, García-Pedrero JM. PD-L1 expression in tumor cells is an independent unfavorable prognostic factor in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2019;28(3):546-554. doi:10.1158/1055-9965.EPI-18-0779
14. Hayden JA, van der Windt DA, Cartwright JL, Côté P, Bombardier C. Assessing bias in studies of prognostic factors. *Ann Intern Med*. 2013;158(4):280-286. doi:10.7326/0003-4819-158-4-201302190-00009
15. Wells GA, Shea B, O'Connell D, et al. The Newcastle-Ottawa Scale (NOS) for assessing the quality of nonrandomised studies in meta-analyses. Accessed December 11, 2022. [http://www.ohri.ca/programs/clinical\\_epidemiology/oxford.asp](http://www.ohri.ca/programs/clinical_epidemiology/oxford.asp)
16. Simmonds M. Quantifying the risk of error when interpreting funnel plots. *Syst Rev*. 2015;4(1):24. doi:10.1186/s13643-015-0004-8
17. Xie S, Xu H, Shan X, Liu B, Wang K, Cai Z. Clinicopathological and prognostic significance of survivin expression in patients with oral squamous cell carcinoma: evidence from a meta-analysis. *PLoS One*. 2015;10(2):e0116517. doi:10.1371/journal.pone.0116517
18. Sterne JAC, Egger M. Funnel plots for detecting bias in meta-analysis: guidelines on choice of axis. *J Clin Epidemiol*. 2001;54(10):1046-1055. doi:10.1016/S0895-4356(01)00377-8
19. Fukushima Y, Someya M, Nakata K, et al. Influence of PD-L1 expression in immune cells on the response to radiation therapy in patients with oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Radiother Oncol*. 2018;129(2):409-414. doi:10.1016/j.radonc.2018.08.023
20. Kim HR, Ha SJ, Hong MH, et al. PD-L1 expression on immune cells, but not on tumor cells, is a favorable prognostic factor for head and neck cancer patients. *Sci Rep*. 2016;6(1):36956. doi:10.1038/srep36956
21. Sato F, Ono T, Kawahara A, et al. Prognostic impact of p16 and PD-L1 expression in patients with oropharyngeal squamous cell carcinoma receiving a definitive treatment. *J Clin Pathol*. 2019;72(8):542-549. doi:10.1136/jclinpath-2019-205818
22. Balermias P, Rödel F, Krause M, et al; DTK-ROG. The PD-1/PD-L1 axis and human papilloma virus in patients with head and neck cancer after adjuvant chemoradiotherapy: a multicentre study of the German Cancer Consortium Radiation Oncology Group (DTK-ROG). *Int J Cancer*. 2017;141(3):594-603. doi:10.1002/ijc.30770
23. Sanchez-Canteli M, Granda-Díaz R, Del Rio-Ibáñez N, et al. PD-L1 expression correlates with tumor-infiltrating lymphocytes and better prognosis in patients with HPV-negative head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer Immunol Immunother*. 2020;69(10):2089-2100. doi:10.1007/s00262-020-02604-w
24. Lilja-Fischer JK, Eriksen JG, Georgsen JB, et al. Prognostic impact of PD-L1 in oropharyngeal cancer after primary curative radiotherapy and relation to HPV and tobacco smoking. *Acta Oncol*. 2020;59(6):666-672. doi:10.1080/0284186X.2020.1729407
25. Ngamphaiboon N, Chureemas T, Siripoon T, et al. Characteristics and impact of programmed death-ligand 1 expression, CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes, and p16 status in head and neck squamous cell carcinoma. *Med Oncol*. 2019;36(2):21. doi:10.1007/s12032-018-1241-1
26. Peña-Cardelles JF, Pozo-Kreilinger JJ, Roncador G, et al. Prognosis value of immunoregulatory molecules in oral cancer microenvironment: an immunohistochemical study. *Biomedicines*. 2022;10(3):710. doi:10.3390/biomedicines10030710
27. Hanna GJ, Woo SB, Li YY, Barletta JA, Hammerman PS, Lorch JH. Tumor PD-L1 expression is associated with improved survival and lower recurrence risk in young women with oral cavity squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2018;47(5):568-577. doi:10.1016/j.ijom.2017.09.006

28. Hong AM, Vilain RE, Romanes S, et al. PD-L1 expression in tonsillar cancer is associated with human papillomavirus positivity and improved survival: implications for anti-PD1 clinical trials. *Oncotarget*. 2016;7(47):77010-77020. doi:10.18632/oncotarget.12776
29. Zhou AL, Wang X, Yu W, et al. Expression level of PD-L1 is involved in ALDH1A1-mediated poor prognosis in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Pathol Res Pract*. 2020;216(9):153093. doi:10.1016/j.prp.2020.153093
30. Lyu X, Zhang M, Li G, Jiang Y, Qiao Q. PD-1 and PD-L1 expression predicts radiosensitivity and clinical outcomes in head and neck cancer and is associated with HPV infection. *J Cancer*. 2019;10(4):937-948. doi:10.7150/jca.27199
31. Lin YM, Sung WW, Hsieh MJ, et al. High PD-L1 expression correlates with metastasis and poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. *PLoS One*. 2015;10(11):e0142656. doi:10.1371/journal.pone.0142656
32. Fu ZM, Zhang DJ, Guo YY, et al. Expression of PD-L1 and CD4+ tumor-infiltrating lymphocytes predict survival in head and neck squamous cell carcinoma. *Mol Clin Oncol*. 2022;16(3):59. doi:10.3892/mco.2022.2492
33. Adamski Ł, Starzyńska A, Adamska P, et al. High PD-L1 expression on tumor cells indicates worse overall survival in advanced oral squamous cell carcinomas of the tongue and the floor of the mouth but not in other oral compartments. *Biomedicines*. 2021;9(9):1132. doi:10.3390/biomedicines9091132
34. Yang F, Zeng Z, Li J, Zheng Y, Wei F, Ren X. PD-1/PD-L1 axis, rather than high-mobility group alarmins or CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes, is associated with survival in head and neck squamous cell carcinoma patients who received surgical resection. *Front Oncol*. 2018;8:604. doi:10.3389/fonc.2018.00604
35. Schneider S, Kadletz L, Wiebringhaus R, et al. PD-1 and PD-L1 expression in HNSCC primary cancer and related lymph node metastasis—impact on clinical outcome. *Histopathology*. 2018;73(4):573-584. doi:10.1111/his.13646
36. Yang WF, Wong MCM, Thomson PJ, Li KY, Su YX. The prognostic role of PD-L1 expression for survival in head and neck squamous cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Oral Oncol*. 2018;86:81-90. doi:10.1016/j.oraloncology.2018.09.016
37. Li J, Wang P, Xu Y. Prognostic value of programmed cell death ligand 1 expression in patients with head and neck cancer: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2017;12(6):e0179536. doi:10.1371/journal.pone.0179536
38. Troiano G, Caponio VCA, Zhurakivska K, et al. High PD-L1 expression in the tumour cells did not correlate with poor prognosis of patients suffering for oral squamous cells carcinoma: a meta-analysis of the literature. *Cell Prolif*. 2019;52(2):e12537. doi:10.1111/cpr.12537
39. Tang H, Zhou X, Ye Y, Zhou Y, Wu C, Xu Y. The different role of PD-L1 in head and neck squamous cell carcinomas: a meta-analysis. *Pathol Res Pract*. 2020;216(1):152768. doi:10.1016/j.prp.2019.152768
40. Lenouvel D, González-Moles MÁ, Ruiz-Ávila I, Gonzalez-Ruiz L, Gonzalez-Ruiz I, Ramos-García P. Prognostic and clinicopathological significance of PD-L1 overexpression in oral squamous cell carcinoma: a systematic review and comprehensive meta-analysis. *Oral Oncol*. 2020;106:104722. doi:10.1016/j.oraloncology.2020.104722

#### SUPPLEMENT 1.

eTable 1. Search Strategy

eTable 2. Newcastle-Ottawa Scale Assessment of Quality of Included Studies

eTable 3. Quality Assessment of Risk of Bias of Included Studies With Quality in Prognosis Studies Tool

#### SUPPLEMENT 2.

Data Sharing Statement

## 9.2 Příloha 2: Studie s dávkově eskalovaným režimem radioterapie – full text manuskriptu

Blažek et al. *Radiat Oncol* (2021) 16:122  
<https://doi.org/10.1186/s13014-021-01842-1>

Radiation Oncology

RESEARCH

Open Access



# Dose escalation in advanced floor of the mouth cancer: a pilot study using a combination of IMRT and stereotactic boost

Tomáš Blažek<sup>1,2,6</sup>, Zuzana Zdeňblová Čermáková<sup>1,2\*</sup>, Lukáš Knybel<sup>1</sup>, Pavel Hurník<sup>2,3</sup>, Jan Štembírek<sup>4,8</sup>, Kamila Resová<sup>1,9</sup>, Tereza Paračková<sup>1,9</sup>, Martin Formánek<sup>2,5</sup>, Jakub Cvek<sup>1,2</sup> and Renata Soumarová<sup>6,7</sup>

### Abstract

**Purpose:** We evaluated the efficiency and toxicity of stereotactic hypofractionated boost in combination with conventionally fractionated radiotherapy in the treatment of advanced floor of the mouth cancer.

**Methods:** Thirty-seven patients with advanced stage of the floor of the mouth cancer, histologically confirmed squamous cell carcinoma (p16 negative) ineligible for surgical treatment, were indicated for radiochemotherapy or hyperfractionated accelerated radiotherapy (HART). The radiotherapy protocol combined external beam radiotherapy (EBRT) and a stereotactic hypofractionated boost to the primary tumor. The dose delivered from EBRT was 70–72.5 Gy in 35/50 fractions. The hypofractionated boost followed with 10 Gy in two fractions. For the variables—tumor volume, stage and grade a multivariate analysis was performed to find the relationship between overall survival, local progression and metastasis. Toxicity was evaluated according to CTCAE scale version 4.

**Results:** After a median follow-up of 16 months, 23 patients (62%) achieved complete remission. The median time to local progression and metastasis was 7 months. Local control (LC) at 2 and 5-years was 70% and 62%, respectively. Progression-free survival (PFS) and overall survival (OS) were 57% and 49% at 2 years and 41% and 27% at 5 years, respectively. Statistical analysis revealed that larger tumors had worse overall survival and a greater chance of metastasis. Log-Rank GTV > 44 ccm (HR = 1.96; [95% CI (0.87; 4.38)];  $p = 0.11$ ). No boost-related severe acute toxicity was observed. Late osteonecrosis was observed in 3 patients (8%).

**Conclusion:** The combination of EBRT and stereotactic hypofractionated boost is safe and seems to be an effective option for dose escalation in patients with advanced floor of the mouth tumors who are ineligible for surgical treatment and require a non-invasive approach.

**Keywords:** Oral cavity tumor, Floor of the mouth tumor, CyberKnife, CyberKnife boost, Stereotactic radiotherapy, Hypofractionated boost

### Introduction

Tumors of the floor of the mouth represent approximately 28% of oral cavity tumors [1], and many of them are presented in advanced stages of disease at the time

of diagnosis. [2] Though surgical resection is an effective and preferred modality in early stages, [3–5] treatment of advanced tumors requires a complex approach based on a combination of surgery and radiotherapy [6–9]. For patients who are considered beyond cure and surgery is not feasible, definitive radiochemotherapy is the preferred option [4, 7]. However, locoregional failure is the predominant pattern of failure in these patients [10], and

\*Correspondence: [zuzana.zdeblova.cermakova@fno.cz](mailto:zuzana.zdeblova.cermakova@fno.cz)

<sup>1</sup> Department of Oncology, University Hospital Ostrava, Ostrava, Czech Republic

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2021. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.



the majority of local failures are identified in high-dose areas of modern radiochemotherapy due to the presence of a subpopulation of cells resistant to the standard radiation dose. Therefore, a higher total delivered radiation dose may be required [11]. However, the dose-escalation and exposure of organs at risk (OARs) to a higher dose can be associated with severe late toxicity, such as osteonecrosis [12, 13]. However, technological and technical improvements during the last years allowed for significant advances in the field of radiation therapy of head and neck cancer. The adoption of intensity-modulated radiation therapy and the use of multimodality imaging for tumor volume definition and organ at risk delineation have improved the clinical outcomes of patients with head and neck tumors [14]. Brachytherapy in combination with external beam radiotherapy (EBRT) and chemotherapy is an effective technique that leads to local dose escalation over the possibilities of up-to-date EBRT technologies [15, 16]. In technically infeasible cases, such as large tumors, patients low-performance status, and contraindications of invasive procedures, a new image-guided stereotactic radiotherapy technique is an alternative option. Recently have been published studies with stereotactic dose escalation in patients with oropharyngeal carcinomas [17, 18]. In addition, preclinical studies suggest that the effect of stereotactic radiotherapy includes the activation of ceramide apoptosis and alteration of the tumor vasculature, which may eventually help overcome tumor radioresistance [19]. Here, we present our experience with stereotactic hypofractionated radiotherapy boost combined with conventionally fractionated radiotherapy in the treatment of advanced floor of the mouth tumour.

### Materials and methods

We analyzed prospectively collected data from 37 patients treated between March 2011 and October 2018. Detailed patient characteristics are presented in Table 1. The tumor stage was defined according to the TNM classification (7th edition). All tumors were histologically confirmed as p16 negative squamous cell carcinoma. The inclusion criteria in this study were defined by the stage of disease and patients general performance status. Only patients with advanced stages of the floor of the mouth tumors were consecutively enrolled in the study. Patients with technically or medically unresectable tumors (65% technically, 32% medically, 13% both), but still enough feasible for curative intent according to multidisciplinary evaluation. The medical reasons for avoiding surgical treatment were as follows: severe malnutrition, poor performance status and multiple comorbidities (chronic kidney disease, hepatopathy, cardiac disease). All other patients were excluded from the study and were offered

**Table 1** Patient and tumor characteristics

Characteristic	No. of patients (%) (N = 37)
Age (median)	60 (35–82)
Gender	
Male	25 (68%)
Female	12 (32%)
Primary site	
Floor of the mouth	31 (84%)
Oral tongue	6 (16%)
ECOG performance status	
0	25 (68%)
1	12 (32%)
T stage	
2	3 (8%)
3	10 (27%)
4	24 (65%)
N stage	
0	5 (14%)
1	4 (11%)
2a	4 (11%)
2b	6 (16%)
2c	16 (43%)
3	2 (5%)
Histology	
Squamous cell carcinoma HPV negative	37 (100%)
Tumor grading	
Gr.1	25 (68%)
Gr.2	10 (27%)
Gr.3	2(5%)
SRT boost TU volume (median)	43,98cm3 (23.4–89.4)

ECOG Eastern cooperative oncology group

surgical resection (followed by chemoradiation) or palliative treatment (short course radiotherapy). The rationale for this patients selection was due to the concerns of unknown and unexpected results and toxicity of a new dose escalation regimen.

From this perspective, there was an effort to avoid harming patients with less advanced tumor stages in whom other well established and proven radical treatment modalities should be preferred. In the study, there was no control arm of patients treated with standard radical treatment modalities.

Patients were indicated for radical radiochemotherapy or hyperfractionated radiotherapy in combination with the stereotactic hypofractionated boost to the primary tumor. The radiotherapy protocol was approved by the Institutional Revision Board. Concurrent chemoradiation with cisplatin (40 mg/m<sup>2</sup>) administered weekly was preferred. But only a small subset of patients met the indication criteria for combined radiochemotherapy (16%). The

majority of patients (84%) were unfit for chemoradiation and therefore were indicated for hyperfractionated accelerated radiotherapy (HART) [20]. Chronic kidney disease (30%), poor performance status (32%), lower BMI, elevated liver function tests and malnutrition (22%) were the main risk and exclusion factors for chemoradiation. Patients followed standard radiotherapy planning procedures. Before treatment initiation, dentition in poor condition was extracted to minimize the subsequent risk of osteoradionecrosis. None of the patients reached complete remission of the primary tumor at the end of the EBRT course. This may be related to the stage of the disease. In all patients, there was a visible tumor residue at the end of EBRT. Therefore within five days before the completion of EBRT, a new contrast-enhanced planning CT with 1 mm slice thickness was performed. After evaluation of the presence of residual tumor on CT scans and clinical examination, the stereotactic hypofractionated boost was indicated.

#### Target volumes

The definition of planning target volumes in EBRT followed the recommendations of the DAHANCA, EORTC and RTOG guidelines with 3 mm isometric PTV (planning target volume) margins. Stereotactic boost (PTV-boost) was defined as the gross tumor volume before EBRT with a uniform 1 mm margin.

#### Dose and fractionation

The conventional EBRT protocol was based on intensity-modulated radiation therapy (IMRT) with simultaneous integrated boost (SIB). IMRT technique was utilized to spare organs at risk. The prescribed dose to the primary tumor and bulky lymph node (LN) was 70 Gy in 35 fractions. Elective low-risk LN levels were irradiated up to 56 Gy in 35 fractions. Hyper-fractionated accelerated radiotherapy regime (HART) was used in patients ineligible for combined chemoradiation. For HART, two PTVs were defined. First PTV was determined for elective nodal level irradiation using 55 Gy in 50 fractions (i.e., 1.1 Gy/fraction twice a day at least 6 h apart). Primary tumor with bulky LN and high-risk LN levels was irradiated with 70–72.5 Gy in 50 fractions i.e., (1.4–1.45 Gy/fraction twice a day at least 6 h apart). The stereotactic hypofractionated boost continuously followed the course of conventional EBRT. Within 1 week after EBRT completion, patients received a stereotactic boost of 10 Gy in two fractions. The rationale for this fractionated regimen was supported by results from dose escalation studies in locally advanced oropharyngeal and nasopharyngeal cancer. [18, 21] The biologic effective dose for tumor effects using alpha–beta ratio of 10 ( $BED_{10}$ ) was defined as a sum of the total dose from EBRT (by applying the LQ

model) and the dose from hypofractionated boost. BED was recalculated from the corresponding BED values by subtracting a repopulation correction factor. This factor represented a daily loss of 0.5 Gy after recalculation. The final BED corresponded to the dose of 85 Gy and 90 Gy, respectively in 2 Gy equivalent dose fractionation ( $EQD_{10/2}$ ). Detailed information about the radiotherapy regimes is depicted in Table 2. The median overall treatment time in the group of patients treated with radiochemotherapy was 49 days (range 49–54 days), and it was 41 days (range 36–56 days) in the group treated with HART regime. For the stereotactic boost, non-isocentric conformal beams were used. The 10 Gy dose in two fractions was prescribed to cover at least 95% of the intended irradiated volume, resulting in a prescribed isodose of 60 to 80%. During the planning process, the lower jawbone was the OAR with a high priority of minimizing the risk of osteonecrosis (Fig. 1a,b).

#### IGRT strategy

In EBRT, daily KV imaging and matching on bone structures was performed. In the stereotactic boost regime, online image guidance according to the bone structures (XST mode—Xsight Spine Tracking and 6D skull tracking) was used. No contrast fiducial markers were used.

#### Toxicity management and scoring

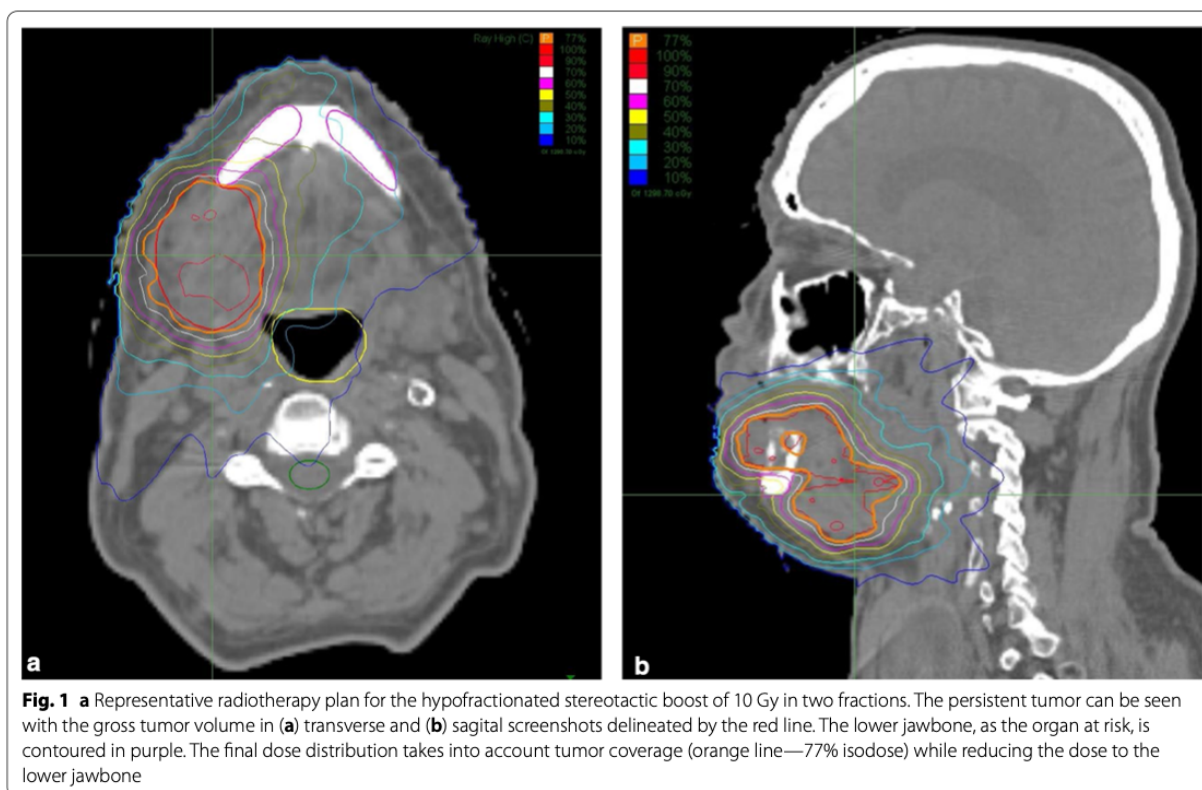
The Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) scoring system version 4 was used to evaluate acute and late radiation toxicity. Percutaneous endoscopic gastrostomy tube placement was indicated in patients with weight loss of  $\geq 10\%$  body weight before or during EBRT or the presence of abnormal swallowing and severe pain and multiple comorbidities.

**Table 2** Radiotherapy regimens and techniques

	No. of patients (%)
<i>EBRT regime</i>	
HART 72,5 Gy (1,45 Gy/fr. BID)	17 (46%)
HART 70 Gy (1,4 Gy/fr. BID)	14 (38%)
IMRT-SIB 70 Gy/56 Gy in 35fr. + cisplatin 40 mg/m <sup>2</sup> weekly	6 (16%)
<i>SRT boost</i>	
5 Gy in 1fraction	1 (3%)
10 Gy in 2fractions	36 (97%)

*EBRT* external beam radiotherapy; *HART* hyperfractionated accelerated radiotherapy; *IMRT* intensity modulated radiotherapy; *SIB* simultaneous integrated boost; *SRT* stereotactic radiotherapy





### Follow-up and evaluation

The standard pre-treatment workup included the patient's history, physical examination, CT-enhanced scans of the head and neck, chest X-ray, and abdomen ultrasound. Evaluation of the treatment response was based on physical examination and imaging (CT, PET/CT). Patients were seen every 3 months for the first year, every 4–6 months the second year, and every 6 months thereafter.

### Statistical analysis

STATISTICA 12 software was used for the statistical analysis. For the variables, tumor volume, tumor stage, and tumor grade, patients were divided into two groups, based on the median volume. The Log-Rank test was used to compare these two groups. The level of significance was 5%. Local control (LC) was defined by reaching complete remission of the primary tumor and involved lymph nodes within 12 weeks after completion of radical treatment. Progression-free survival (PFS) represented the length of time during and after the treatment without cancer progression of either local or metastatic progression. We also carried out, multivariate analysis to find relationships between local progression, metastasis, and

osteonecrosis and oncological parameters, such as tumor volume, tumor stage, and tumor grading. Two sample *t* test, a univariate logistic regression model, and Pearson chi-squared test in a contingency table were used.

### Results

Thirty-six (97%) patients finished the prescribed protocol. One patient received a single-fraction stereotactic boost of 5 Gy and finished the treatment earlier due to non-compliance. Acute radiation toxicity is presented in Table 3. Dysphagia grade 2 manifested in 59% of patients. The maximum acute treatment toxicity was grade 3 mucositis and grade 3 dysphagia, both of which manifested in 10 (27%) patients who required intensification of pain treatment with opioids and nutritional support via the feeding tube. The median time to recovery from opioid dependence was 60 days (range 22–82 days). The stereotactic boost did not increase the incidence of higher acute radiation toxicity and all cases recovered within 12 weeks after completing treatment. Late radiation toxicity manifested as osteonecrosis and dysphagia. Osteonecrosis was observed in 3 (8%) patients. One of these cases was associated with local tumor progression. The two other cases were observed in patients with good local control of the primary tumor. The general

**Table 3** Acute radiation toxicity (within 90 days of radiation treatment) classified according to CTCAE version 4

Dermatitis	
Grade 1	6 (16%)
Grade 2	31 (84%)
Mucositis	
Grade 1	9 (24%)
Grade 2	18 (49%)
Grade 3	10 (27%)
Dysphagia	
Grade 1	5 (14%)
Grade 2	22 (59%)
Grade 3	10 (27%)

CTCAE common terminology criteria for adverse events

management of osteonecrosis was based on a combination of surgical resection, antibiotics, and local antiseptic care. Plan parameters and dose to the lower jaw are summarized in Table 4. Twenty-six patients (70%) were not feeding tube-dependent 3 months after completion of the treatment. After a median follow-up of 16 months (range 6–82 months), local control (LC) at 2 and 5-years was 70% and 62%, respectively. Among the 37 patients, 23 (62%) showed good local control and achieved complete response and 14 (38%) experienced local progression (Fig. 2a). The median time to local progression was 6.5 months (range 3–48 months). Of the 14 patients who experienced local progression, 2 (14%) underwent salvage surgery, 1 (7%) patient was re-irradiated, and 6 (43%) were indicated for palliative chemotherapy. Five (36%) patients were ineligible for local salvage treatment or palliative chemotherapy and died due to the complications of local tumor progression. Progression-free survival (PFS) and overall survival (OS) were 57% and 49% at 2 years and 41% and 27% at 5 years, respectively. (Fig. 2b) Metastatic progression of disease was observed in 9 (24%) patients (Fig. 2c). The median time to metastasis was 7 months (range 3–47 months). Among the patients with metastatic progression, 4 (11%) had simultaneous local progression of the primary tumor. All 9 (24%)

patients with metastatic progression were treated with palliative chemotherapy; 17 (46%) patients died of progression of the primary malignancy and 2 (5%) patients died of secondary malignancy. In 8 (22%) patients, the cause of death was due to other non-malignant diseases specifically due to comorbidities. Log-Rank test indicated a correlation between tumor volume and OS and metastasis. Larger tumors had a higher risk of progression and metastasis. Patients with a tumor volume  $\geq 44$  ccm tended to have worse OS than patients with tumor volume  $\leq 44$  ccm (HR = 1.96; [95% CI (0.87;4.38)];  $p = 0.11$ ); (Fig. 3a). A similar correlation was observed in the time to metastatic progression. Patients with tumor volume  $\geq 44$  ccm had a higher risk of metastasis (HR = 3.02; [95% CI (0.61; 15.08)];  $p = 0, 17$ ); (Fig. 3b).

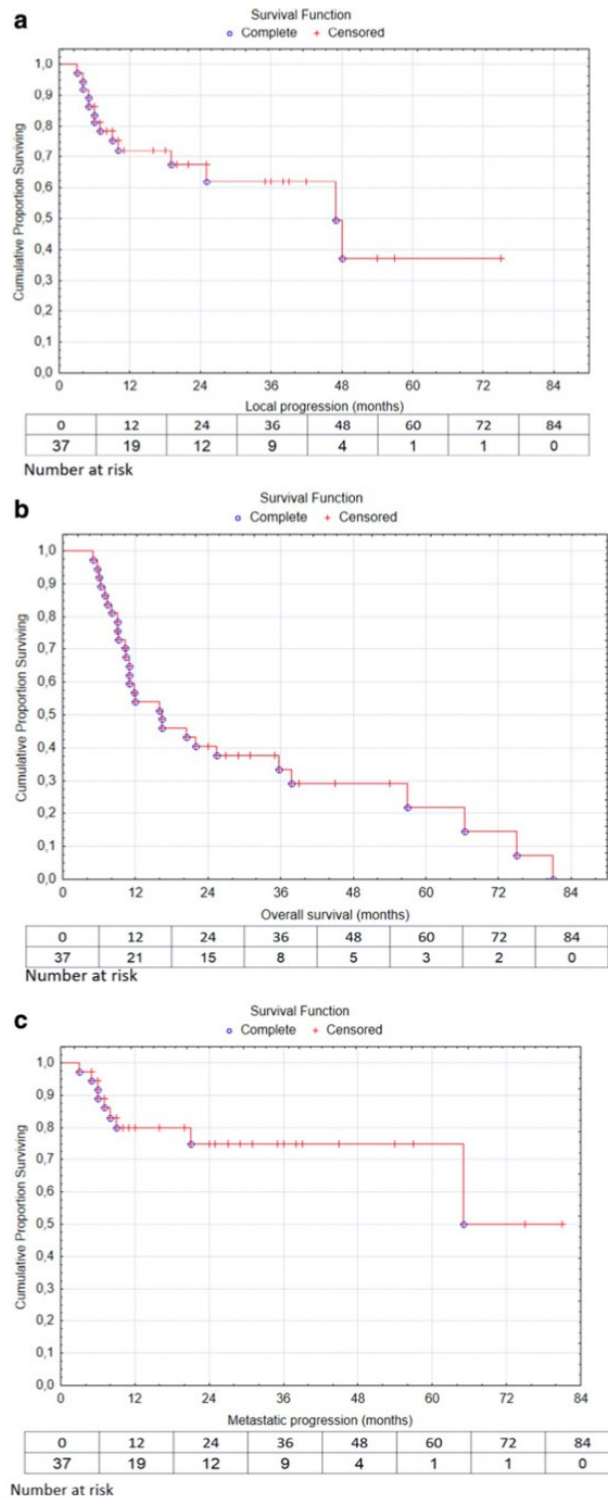
### Discussion

In this study, we demonstrated the feasibility of a combination of EBRT and stereotactic hypofractionated boost in the treatment of advanced, non-resected floor of the mouth tumors in patients with other limited treatment options. Our results indicate no additional increase in acute radiation toxicity and a low rate of late toxicity. In addition, the results suggest a potential effect of dose escalation on local control. The acute radiation toxicity in the cohort was comparable to the results reported in other published studies [7, 17, 18, 22] using different radiotherapy techniques and doses. No acute CTCAE grade 4 toxicity manifested. The incidence of mucositis grade 3 (27%) and dysphagia grade 3 (27%) was associated with tumor characteristics and radiotherapy technique. However, we found no increase in the duration of acute toxicity. One patient discontinued treatment earlier due to non-compliance and a worse tolerance of radiation toxicity. In contrast, Zeno et al. [17] reported an incidence of acute grade 3 dermatitis, mucositis, and dysphagia of 15%, 15%, and 40% during treatment of T2–T4 oropharyngeal, laryngeal, and hypopharyngeal cancer by a combination of EBRT and stereotactic boost. Al-Mamgani et al. [22] reported acute radiation toxicity grade 3 dysphagia in 17–20% of patients treated for oropharyngeal cancer with a

**Table 4** Dose from both radiotherapy courses to the lower jaw in patients with osteonecrosis

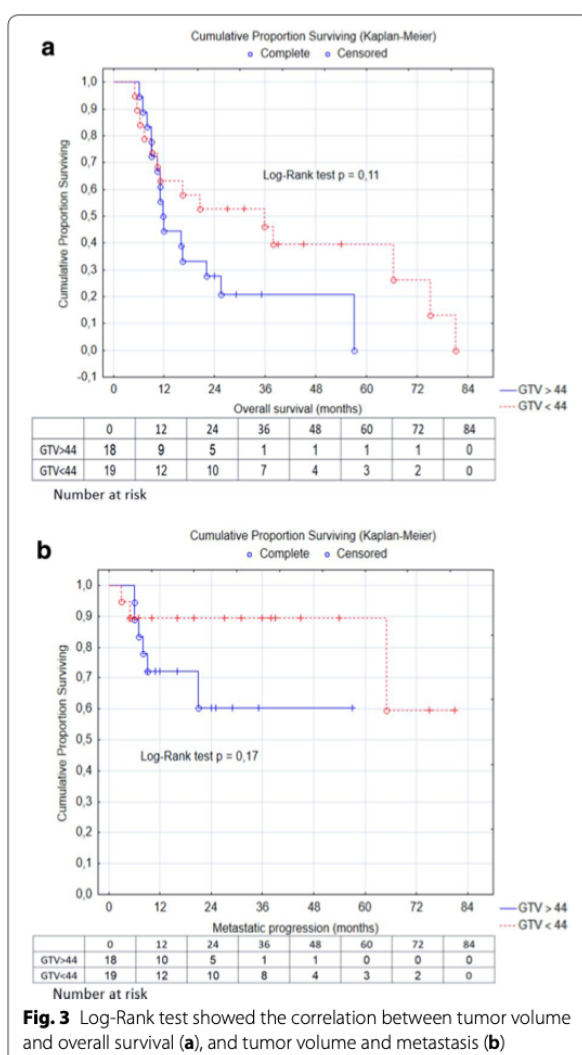
Patients with osteonecrosis 3 (8%)	EBRT dose—D98%	SRT dose—Dmax
Case No. 1	73.8 Gy	11,6 Gy
Case No. 2	74.4 Gy	10,6 Gy
Case No. 3	75 Gy	10,7 Gy
	EBRT dose—D98% (median)	SRT dose—Dmax (median)
Dose to the lower jaw of the entire study population	71.5 Gy (68.1–75)	11.6 Gy (5.6–11.68)

EBRT external beam radiotherapy; SRT stereotactic radiotherapy; Dmax maximum dose; D98% dose near maximum



**Fig. 2** Kaplan–Meier curves for patients with oral cavity tumor (n = 37) after a median 16-month follow-up. **(a)** Local progression, **(b)** overall survival, **(c)** metastatic progression





combination of EBRT and brachytherapy or stereotactic boost. In brachytherapy studies complication rate has been as high as 50–60% for acute grade 1–2 toxicities, including mucositis, dermatitis, infections, and hematoma. Moreover, the risk of mucositis grade 3 has been reported to be up to 25%, particularly when brachytherapy is combined with EBRT [23–25]. During follow-up, osteonecrosis and long-term feeding tube dependence were observed in 8% and 22% of patients. This is comparable to the results of studies with different dose-escalation techniques [12, 26, 27]. Hosni et al. [7] published the results for 108 patients with T1–T4 stage oral cavity tumors treated with definitive radiochemotherapy; after a median follow-up of 52 months, osteonecrosis developed in 6.6% of the patients. Foster

et al. [28] reported the incidence of osteonecrosis and long-term feeding tube dependence in 20.7% and 10% of patients after definitive radiochemotherapy in 140 patients with oral cavity cancer. In Al-Mamgani’s study [22], the combination with brachytherapy or stereotactic boost in the treatment of oropharyngeal cancer resulted in 11% and 8% of patients having dysphagia grade  $\geq 2$  and feeding tube dependence in 17% and 20% of patients, respectively. In other brachytherapy studies, the incidence of late toxicity, specifically soft tissue necrosis has been reported in 10–30% of patients [13, 15, 23]. The local control rate in our cohort at 2 and 5-years was 70% and 62%, respectively. Compared to other published studies, Hosni et al. [7] recently reported the results for 108 patients with oral cavity tumors treated with definitive chemoradiotherapy. The 2-year local control rate was 80%. The 5-year local control rate was 78% for T3 stage and 72% for T4 stage. Although the results are better, in the subgroup analysis only 12% represented floor of the mouth tumors. Retrospective studies have shown that brachytherapy alone or in combination with EBRT can improve the local control rate from approximately 70% up to >95% [15, 16, 25] in early stages. Decroix and Ghossein [29] reported outcomes in 602 patients with oral tongue tumors who underwent brachytherapy as a single-modality treatment or in combination with EBRT. In this series, the local relapse rate after treatment was 14% and 22% for T1 and T2 tumors, respectively. Pernot et al. [30] reported local control rates of 96% for T1, 85% for T2, and 64% for T3 tumors of the oral cavity treated with brachytherapy in combination with nodal neck dissection. Although brachytherapy is a very effective technique for dose escalation, it has some limitations and is mostly favoured for treatment in early stages. Yamazaki et al. [31] reported an impressive local control rate at 2- and 5-years of 89% and 71%, respectively, using a hypofractionated stereotactic CyberKnife boost in 25 patients with head and neck cancer. However, only three patients presented in the study had oral cavity tumors, which makes comparing the results with our study difficult. Evaluation of OS and PFS in a cohort of our patients with other published studies is slightly difficult due to a short median follow-up time (16 months). However, the length of follow-up is related to the number of patients in the study, the aggressiveness of the tumor and the advanced stages of the disease. From this perspective, we tried to discuss mainly 2-year rather than 5-year results. In our study, the PFS and OS were slightly worse than those reported by Foster et al. [28], who achieved 2-year OS and PFS of 73% and 61.4% and 5-year results of 63.2% and 58.7% in 140 patients with oral cavity cancer treated with definitive

radiochemotherapy. A detailed analysis of the patient cohort showed that T3/T4 stage was present in 75%. Of these patients, 47.9% had oral tongue cancer and 24.3% had the floor of the mouth cancer. Tumor stage and site distribution can explain the treatment results. In contrast, Scher et al. [30] published the results for 73 patients with oral cavity tumors treated with definitive radiochemotherapy. The 2-year and 5-year OS were 24% and 15%, respectively. Disease-specific survival was 52%, 43.8%, and 38% at 1, 2, and 3 years, respectively. The disease distribution in the study was 14% stage III to 73% stage IV. However, 48% of patients had oral tongue cancer and only 19% had the floor of the mouth cancer. Hosni et al. [7] in the study of 108 patients with oral cavity cancer reached a 2-year OS of 56% and PFS of 47%, which was comparable to our results. In 5-year the OS and PFS dropped to 50% and 42%, respectively. Finally, Yamazaki et al. [31] published impressive 2-year OS and PFS of 83% and 70%, and 5-year OS of 70%, respectively. However, in the last two of these studies, the proportion of patients with the floor of the mouth tumors was only 12%, which could affect the treatment results. Statistical analysis showed that dose escalation in patients with tumor volume  $\leq 44$  ccm seems to be important to achieve long-term local control and survival. Patients with tumor volume  $> 44$  ccm presented with distant failure, and dose escalation could be more controversial, though local control is still important for the quality of life. This result supports findings that larger tumors present a higher tumor mutation burden, which correlates with metastatic potential. One of the new promising options that could reduce the tumor metastatic potential is systemic maintenance therapy. A recently published study by Eder et al. [31] suggested a potential benefit of checkpoint inhibitors in the treatment of head and neck tumors with a higher tumor mutation burden. To the best of our knowledge, this study is the first to report dose escalation in patients with advanced floor of the mouth tumors. Regular follow-up and exclusion of HPV-positive tumors ensured relevant data that generate consistent output. However, our study has some limitations. Firstly a low number of patients were enrolled. In addition, only patients with advanced stages of disease and persistence of tumor after EBRT were included in the study. Also, the short follow-up time does not allow an adequate evaluation of 5-year results. The other limitations are the retrospective nature of the study and the absence of a control arm. Our study supports further investigation of stereotactic boost dose escalation in patients with the floor of the mouth cancer. We hypothesize that a stereotactic boost may improve the therapeutic index in the floor of the

mouth tumors, and we are going to initiate a prospective dose-escalation phase I study.

## Conclusion

The combination of EBRT and stereotactic hypofractionated boost is a safe and effective option for dose escalation in patients with advanced floor of the mouth tumors who are ineligible for surgical treatment and require a non-invasive approach. This study demonstrated the feasibility of this combined radiotherapy regime with a moderate toxicity profile.

## Abbreviations

HART: Hyperfractionated accelerated radiotherapy; EBRT: External beam radiotherapy; CTCAE: Common terminology criteria for adverse events; LC: Local control; GTV: Gross tumor volume; HR: Hazard ratio; CI: Confidence interval; OAR: Organs at risk; TNM: Tumor, node, metastasis; CT: Computed tomography; DAHANCA: The Danish head and neck cancer; EORTC: European organisation for research and treatment cancer; RTOG: Radiation therapy oncology group; PTV: Plannig target volume; IMRT: Intensity modulated radiation therapy; SIB: Simultaneous integrated boost; LN: Lymph node; IGRT: Image guided radiation therapy; XST: Xsight spine tracking; PET: Positron emission tomography; PFS: Progression free survival; HPV: Human papilloma virus.

## Acknowledgements

Not applicable.

## Authors' contributions

TB: data analysis, manuscript writing; ZCZ: manuscript writing, data analysis TP: study design, manuscript writing; KR: participated in data analysis and wrote specific part of manuscript; PH: participated in data analysis and wrote specific part of manuscript; MF: participated in data analysis and wrote specific part of manuscript; JS: data collection; JC: participated in study design and coordination; RS: carried out a critical review of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

## Funding

This research was supported by Ministry of Health of the Czech Republic, Grant No. NV19-08-00383. All rights reserved. This research was supported by the SGS14/LF/2017-2018.

## Availability of supporting data

We will provide datasets that support the results of this article on request.

## Declarations

### Ethical approval and consent to participate

Patients agreed to participate in the study by signing informed consent. The study was ethically approved.

### Consent for publication

Publication has been approved by all co-authors and they agree with publication

### Competing interests

The authors have no conflicts of interest to declare that are relevant to the content of this article.

### Author details

<sup>1</sup>Department of Oncology, University Hospital Ostrava, Ostrava, Czech Republic. <sup>2</sup>Faculty of Medicine, University of Ostrava, Ostrava, Czech Republic. <sup>3</sup>Department of Pathology, University Hospital Ostrava, Ostrava, Czech Republic. <sup>4</sup>Department of Oral and Maxillofacial Surgery, University Hospital Ostrava, Ostrava, Czech Republic. <sup>5</sup>Department of Otorhinolaryngology, University Hospital Ostrava, Ostrava, Czech Republic. <sup>6</sup>3rd Faculty of Medicine, Charles

University Prague, Prague, Czech Republic. <sup>7</sup>Department of Oncology, University Hospital Královské Vinohrady Prague, Prague, Czech Republic. <sup>8</sup>Institute of Animal Physiology and Genetics, Czech Academy of Sciences, Brno, Czech Republic. <sup>9</sup>Faculty of Medicine, Palacký University Olomouc, Olomouc, Czech Republic.

Received: 2 March 2021 Accepted: 7 June 2021

Published online: 29 June 2021

## References

- Chen AY, Myers JN. Cancer of the oral cavity. *Dis Mon.* 2001;47(7):275–361.
- Saggi S, Badran KW, Han AY, Kuan EC, John MA. Clinicopathologic characteristic and survival outcomes in the floor of mouth squamous cell carcinoma: A population-based study. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2018;159(1):51–58.
- Ellis MA, Graboyes EM, Wahlquist AE, Neskey DM, Kaczmar JM, Schopper HK. Primary surgery vs radiotherapy for early oral cavity cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2018;158(4):649–59.
- Fujiwara R, Burtness B, Husain ZA, Judson BL, Bhatia A, Sasaki C. Treatment guidelines and patterns of care in oral cavity squamous cell carcinoma: primary surgical resection vs nonsurgical treatment. *Oral Oncol* 2017;71:129–137.
- Ellis MA, Graboyes EM, Wahlquist AE, Neskey DM, Kaczmar JM, Schopper HK, et al. Primary surgery vs radiotherapy for early stage oral cavity cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2018;158:649–59.
- Ow TJ, Myers JN. Current management of advanced resectable oral cavity squamous cell carcinoma. *Clin Exp Otorhinolaryngol.* 2011;4(1):1–10.
- Hosni A, Chiu K, Huang SH, Xu W, Huang J, Bayley A. Non-operative management for oral cavity carcinoma: definitive radiation therapy as a potential alternative treatment approach. *Radiother Oncol.* 2020;154:70–5.
- Yao M, et al. Intensity-modulated radiation therapy for head-and-neck squamous cell carcinoma—the University of Iowa experience. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2005;63(2):410–21.
- Robertson AG, et al. Early closure of a randomized trial: surgery and postoperative radiotherapy versus radiotherapy in the management of intra-oral tumors. *Clin Oncol.* 1998;10(3):155–60.
- Studer G, Luetolf UM, Glanzmann C. Locoregional failure analysis in head-and-neck cancer patients treated with IMRT. *Strahlenther Onkol.* 2007;183:417–23.
- Atwell D, Elks J, Cahill K, Hearn D. A review of modern radiation therapy dose escalation in locally advanced head and neck cancer. *Clin Oncol.* 2020;32(5):330–41.
- Studer G, et al. Osteoradionecrosis of the mandible. minimized risk profile following intensity-modulated radiation therapy (IMRT). *Strahlenther Onkol* 2006;182(5):283–288.
- Lozza L, et al. Analysis of risk factors for mandibular bone radionecrosis after exclusive low dose-rate brachytherapy for oral cancer. *Radiother Oncol.* 1997;44(2):143–7.
- Kovács G, Martinez-Monge R, Budrukkar A, Guinot J, Johansson B, Strnad V. GEC-ESTRO ACROP recommendations for head and neck brachytherapy in squamous cell carcinomas: 1st update—improvement by cross-sectional imaging-based treatment planning and stepping source technology. *Radiother Oncol.* 2017;122(2):248–54.
- Julianna R, Voichita Bar-Ad, Cognetti D, Curry J, et al. A systemic review of treating head and neck cancer: a reintroduction of brachytherapy with or without surgery. *J Contemp Brachytherapy* 2018;10,5:454–462.
- Zeno AR, Gouw MD, Matthew D, et al. Single-center prospective trial investigating the feasibility of serial FDG-PET guided adaptive radiation therapy for head and neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2020;108(4):960–8.
- Vempati P, Halthore A, Teckie S, et al. Phase I trial of dose-escalated stereotactic radiosurgery (SRS) boost for unfavourable locally advanced oropharyngeal cancer. *Radiat Oncol.* 2020;15:278–88.
- Chang BK, Timmerman RD. Stereotactic body radiation therapy: a comprehensive review. *Am J Clin Oncol.* 2007;30(6):637–44.
- Cvek J, Kubes J, Skacelikova E, Otahal B, Kominek P, Halamka M, Feltl D. Hyperfractionated accelerated radiotherapy with concomitant integrated boost of 70–75Gy in 5 weeks for advanced head and neck cancer. *Strahlenther Onkol.* 2012;188(8):666–70.
- Al-Mamgani A, Van Rooij P, Sewnaik A, Mehilal R, et al. Brachytherapy or stereotactic body radiotherapy boost for early-stage oropharyngeal cancer: comparable outcomes of two different approaches. *Oral Oncol.* 2013;49:1018–24.
- Strnad V. Treatment of oral cavity and oropharyngeal cancer. Indications, technical aspects, and results of interstitial brachytherapy. *Strahlenther Onkol* 2004;180(11):710–717.
- Dearnaley DP, et al. Interstitial irradiation for carcinoma of the tongue and floor of the mouth: Royal Marsden Hospital Experience 1970–1986. *Radiother Oncol.* 1991;21(3):183–92.
- Mohanti BK, Bansal M, Bahadur S, Shukla NK, Deo SV, Prabhakar R, Rath GK. Interstitial brachytherapy with or without external beam irradiation in head and neck cancer: Institute Rotary Cancer Hospital experience. *Clin Oncol (R Coll Radiol).* 2001;13(5):345–52.
- Sanguienti G, Rao N, Gunn B, et al. Predictors of PEG dependence after IMRT± chemotherapy for oropharyngeal cancer. *Radiother Oncol.* 2013;107:300–4.
- Feng FY, Kim HM, Lyden TH, et al. Intensity-modulated chemoradiotherapy aiming to reduce dysphagia in patients with oropharyngeal cancer: clinical and functional results. *J Clin Oncol.* 2010;28:2732–8.
- Foster CC, Melotek JM, Brisson RJ, Seiwert TY, Cohen EE, Stenson KM, et al. Definitive chemoradiation for locally-advanced oral cavity cancer: a 20-year experience. *Oral Oncol.* 2018;80:16–22.
- Yamazaki H, Ogita M, Himeki K, et al. Hypofractionated stereotactic radiotherapy using CyberKnife as a boost treatment for head and neck, a multi-institutional survey: impact of planning target volume. *Anticancer Res.* 2014;34:5755–60.
- Decroix Y, Ghossein NA. Experience of the Curie Institute in treatment of cancer of the mobile tongue: I. Treatment policies and result. *Cancer* 1981;47(3):496–502.
- Pernot M, et al. Evaluation of the importance of systematic neck dissection in carcinoma of the oral cavity treated by brachytherapy alone for the primary lesion (apropos of a series of 346 patients). *Bull Cancer Radiother.* 1995;82(3):311–7.
- Scher EF, Romesser PB, Chen C, Ho F, Wu Y, Sherman EJ, et al. Definitive chemoradiation for primary oral cavity carcinoma: a single institution experience. *Oral Oncol.* 2015;51:709–15.
- Eder T, Hess AK, Kunschak C, Stromberger K, Jöhrens K, Fleischer V, et al. Interference of tumour mutational burden with the outcome of patients with head and neck cancer treated with definitive chemoradiation: a multicentre retrospective study of the German Cancer Consortium Radiation Oncology Group. *Eur J Cancer.* 2019;116:67–76.

## Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



### 9.3 Příloha 3: Doplňkové tabulky

**Tabulka S1: Režimy radioterapie a radiochemoterapie**

Charakteristika		Počet pacientů (%)
<b>Režim radioterapie</b>		
<b>Normofrakcionace</b>	70 Gy ve 35 frakcích, 2 Gy/den během 7 týdnů + cisplatina	25 (45.5)
	70 Gy ve 35 frakcích, 2 Gy/den během 7 týdnů	5 (9.1)
<b>Hyperfrakcionace</b>	72.5 Gy v 50 frakcích, 1.45 Gy/frakci 2× denně v odstupu min. 6 hod. během 5 týdnů	5 (9.1)
<b>Dávková eskalace</b>	70 Gy ve 35 frakcích, 2 Gy/den během 7 týdnů + SBRT boost 10 Gy ve 2 frakcích *	7 (12.7)
	72.5 Gy v 50 frakcích, 1.45 Gy/frakci 2× denně v odstupu min. 6 hod. během 5 týdnů + SBRT boost 10 Gy ve 2 frakcích *	4 (7.3)
<b>Akcelerace</b>	55 Gy ve 20 frakcích, 2,75 Gy/den během 4 týdnů	1 (1.8)
	60Gy ve dvou kurzech – 30Gy v 10frakcích, 3Gy/den + 30Gy v 15 frakcích, 2Gy/den během 5 týdnů	8 (14.5)
<b>Režim chemoterapie</b>		
<b>Typ a dávka chemoterapie</b>	Cisplatina 100 mg/m <sup>2</sup> aplikovaná den 1, 22 a 43	13 (23.6)
	Cisplatina 40 mg/m <sup>2</sup> aplikovaná 1× týdně (6×)	12 (21.8)
	Bez chemoterapie	30 (54.6)
<b>Kumulativní dávka cisplatinu ≥ 200mg/m<sup>2</sup></b>	Ne	9 (16.4)
	Ano	16 (29.1)
	Bez chemoterapie	30 (54.5)

\*) Pouze pro pacienty s nádory spodiny dutiny ústní; SBRT = stereotaktická radioterapie;

**Tabulka S2: Harmonogram dispenzarizace**

Plán dispenzarizace	3.týden	12.týden	24.týden	9.měsíc	12.měsíc	18.měsíc	24.měsíc	30.měsíc	36.měsíc
ORL	•	•	•	•	•	•	•	•	•
Laboratorní testy	•	•	•	•	•	•	•	•	•
MR	-	○	○	○	○	○	○	○	○
PET/CT	-	•	•	-	-	-	-	-	-
CT	-	-	-	•	•	•	•	•	•

• – povinné vyšetření; ○ – fakultativní vyšetření; ORL – klinické nebo endoskopické vyšetření otorinolaryngologem nebo stomatochirurgem; Laboratorní testy – krevní obraz s diferenciálním rozpočtem, biochemie, SCCA marker, TSH, T3,T4; MR – magnetická resonance metodou volby v indikovaných případech, kdy CT nebo PET/CT neposkytují dostatečné informace; PET/CT – pozitronová emisní tomografie během prvních 6 měsíců ke zhodnocení dynamiky regrese tumoru po léčbě a odlišení postterapeutických změn od viabilní reziduální nádorové tkáně; CT – výpočetní tomografie, po 36 měsících sledování je vyšetření indikováno méně často v závislosti na charakteristice a rizikivosti nádorového onemocnění.

**Tabulka S3: Identifikace imunoreagencií**

Katalogová čísla a RRID (Research Resource Identifier project)	
<b>PDL-1</b>	[klon 22C3, DAKO M3653 (Agilent Cat# M3653, RRID : AB_2861298)]
<b>CD3</b>	[klon LN10, Leica NCL-LCD3-565, (Leica Biosystems) Cat# NCL-L-CD3-565 (také CD3-565-L-CE, RRID: AB_563541)]
<b>CD4</b>	[klon SP35, DCS CI851C003, (Thermo Fisher Scientific) Cat# MA5-16338, RRID: AB_2537857)]
<b>CD8</b>	[klon P17-V, DB Biotech M0755, (DB Biotech Cat# DB 085, RRID: AB_2315705)]
<b>CK</b>	[klon AE1/AE3, Zytomed MSK019, (Zytomed Systems Cat# MSG019 (také BMS006, MSK019-05, MSK019), RRID: AB_2864453)]

PDL-1 = ligand receptoru programované smrti 1; CD3 = marker T-lymfocytů; CD8 = cytotoxické T-lymfocyty; CD4 = pomocné T-lymfocyty (helpers); CK = marker cytokeratinu.

Tabulka S4: Míra přežití v závislosti na klinicko-patologických charakteristikách

Parametr		OS				DSS			DFS			DMFS			LRFS		
		Celkem pacientů	Počet pacientů	cHR	p	Počet pacientů	cHR	p	Počet pacientů	cHR	p	Počet pacientů	cHR	p	Počet pacientů	cHR	p
Pohlaví	Ženy	14	4	ref		3	ref		7	ref		2	ref		5	ref	
	Muži	41	17	1.92 (0.64–5.72)	0.245	12	1.83 (0.51–6.54)	0.351	15	0.79 (0.32–1.94)	0.602	8	2.02 (0.42–9.71)	0.382	11	0.80 (0.28–2.31)	0.682
Věk	<M	27	7	ref		4	ref		8	ref		4	ref		6	ref	
	≥M	28	14	2.27 (0.91–5.64)	0.078	11	3.18 (1.01–10.03)	0.049	14	1.85 (0.78–4.43)	0.165	6	1.65 (0.46–5.86)	0.439	10	1.86 (0.67–5.12)	0.231
CCI	<M	27	8	ref		6	ref		11	ref		4	ref		10	ref	
	≥M	28	13	2.06 (0.85–5.00)	0.108	9	1.92 (0.68–5.42)	0.217	11	1.15 (0.50–2.66)	0.739	6	2.05 (0.58–7.31)	0.267	6	0.64 (0.23–1.77)	0.390
BMI	<M	27	13	ref		9	ref		14	ref		6	ref		11	ref	
	≥M	28	8	0.55 (0.23–1.34)	0.188	6	0.60 (0.21–1.69)	0.334	8	0.43 (0.18–1.03)	0.058	4	0.48 (0.13–1.73)	0.261	5	0.38 (0.13–1.10)	0.076

Parametr		OS				DSS			DFS			DMFS			LRFS		
		Celkem pacientů	Počet pacientů	cHR	p	Počet pacientů	cHR	p	Počet pacientů	cHR	p	Počet pacientů	cHR	p	Počet pacientů	cHR	p
Abúzus alkoholu	Ne	25	7	ref		6	ref		8	ref		2	ref		7	ref	
	Ano	30	14	2.00 (0.81–4.96)	0.135	9	1.49 (0.53–4.19)	0.452	14	1.92 (0.79–4.63)	0.148	8	5.13 (1.07–24.59)	0.041	9	1.19 (0.44–3.21)	0.727
Kouření	Ne	11	4	ref		3	ref		3	ref		1	ref		3	ref	
	Ano*	44	17	1.00 (0.33–2.96)	0.994	12	0.93 (0.26–3.31)	0.915	19	1.70 (0.50–5.76)	0.392	9	2.24 (0.28–17.65)	0.445	13	1.11 (0.32–3.91)	0.868
Bakteriální infekce	Ne	12	1	ref		0	ref		1	ref		1	ref		0	ref	
	Ano	43	20	7.11 (0.95–53.13)	0.056	15	-		21	9.15 (1.22–68.71)	0.031	9	3.88 (0.48–31.17)	0.202	16	-	
Lokalita tumoru	HP	7	3	ref		2	ref		3	ref		2	ref		2	ref	
	OC	21	9	1.29 (0.35–4.81)	0.700	6	1.34 (0.27–6.69)	0.722	8	0.93 (0.25–3.53)	0.916	3	0.60 (0.10–3.63)	0.577	6	1.09 (0.22–5.42)	0.915
	OP	21	7	0.75 (0.19–)	0.676	5	0.83 (0.16–)	0.824	8	0.74 (0.19–)	0.651	3	0.36 (0.06–)	0.261	7	1.11 (0.23–)	0.900

Parametr		OS				DSS			DFS			DMFS			LRFS		
		Celkem pacientů	Počet pacientů	cHR	p	Počet pacientů	cHR	p	Počet pacientů	cHR	p	Počet pacientů	cHR	p	Počet pacientů	cHR	p
				2.91)			4.29)			2.78)			2.15)			5.33)	
	L	6	2	1.04 (0.17–6.26)	0.966	2	1.64 (0.23–11.77)	0.623	3	1.06 (0.21–5.28)	0.942	2	1.21 (0.17–8.63)	0.852	1	0.54 (0.05–5.97)	0.616
Stádium nemoci	≤3**	18	6	ref		5	ref		9	ref		6	ref		5	ref	
	4	37	15	1.56 (0.60–4.04)	0.364	10	1.24 (0.42–3.67)	0.692	13	0.86 (0.37–2.03)	0.736	4	0.43 (0.12–1.52)	0.187	11	1.24 (0.43–3.58)	0.69
Stádium nemoci	1	21	9	ref		6	ref		8	ref		3	ref		7	ref	
	2	24	9	0.80 (0.32–2.01)	0.631	7	0.92 (0.31–2.75)	0.883	10	0.96 (0.38–2.44)	0.930	4	1.00 (0.22–4.48)	0.998	8	0.93 (0.33–2.56)	0.881
	3	10	3	0.66 (0.18–2.44)	0.532	2	0.65 (0.13–3.23)	0.600	4	0.93 (0.28–3.11)	0.911	3	1.96 (0.39–9.77)	0.411	1	0.25 (0.03–2.06)	0.200
Metastatické postižení uzlin	Ne	17	7	ref		5	ref		8	ref		5	ref		5	ref	
	Ano	38	14	0.74 (0.30–)	0.510	10	0.74 (0.25–)	0.577	14	0.65 (0.27–)	0.341	5	0.30 (0.09–)	0.061	11	0.92 (0.32–)	0.871

Parametr		OS			DSS			DFS			DMFS			LRFS			
		Celkem pacientů	Počet pacientů	cHR	p	Počet pacientů	cHR	p	Počet pacientů	cHR	p	Počet pacientů	cHR	p	Počet pacientů	cHR	p
				1.83)			2.16)			1.57)			1.06)			2.64)	
HPV pozitivita	Ne	40	18	ref		12	ref		17	ref		7	ref		13	ref	
	Ano	15	3	0.31 (0.09–1.04)	0.058	3	0.46 (0.13–1.64)	0.233	5	0.53 (0.20–1.45)	0.219	3	0.69 (0.18–2.69)	0.590	3	0.46 (0.13–1.62)	0.229
CHT	Ne	25	12	ref		8	ref		11	ref		4	ref		7	ref	
	Ano	30	9	0.43 (0.18–1.04)	0.060	7	0.50 (0.18–1.39)	0.185	11	0.61 (0.26–1.43)	0.259	6	0.75 (0.21–2.75)	0.669	9	0.92 (0.34–2.48)	0.875
Dávka RT	<M	17	8	ref		6	ref		7	ref		3	ref		4	ref	
	≥M	38	13	0.55 (0.22–1.34)	0.186	9	0.50 (0.18–1.42)	0.194	15	0.74 (0.30–1.85)	0.521	7	0.62 (0.15–2.50)	0.503	12	1.28 (0.41–3.97)	0.669

\*) Pravidelný nebo bývalý kuřák; \*\*) Pouze jeden pacient ve stádiu I; M = medián (věk = 63 let; CCI = 5; BMI = 23.6 kg/m<sup>2</sup>; BED<sub>10</sub> = 80Gy; CCI = Charlson Comorbidity Index; BMI = Body Mass Index (M = medián; GGT = Gamma Glutamyl-Transferase; RT = radioterapie; Covid = Coronavirus; HPV = Human Papilloma Virus; CHT= chemoterapie; BED<sub>10</sub> = Biological Effective Dose; CI = interval spolehlivosti; ref = reference; OS = celkové přežití; DSS = nádorově specifické přežití; DFS = přežití bez známek recidivy onemocnění; DMFS = přežití bez vzdálených metastáz; LRFS = přežití bez lokoregionálního relapsu; p = p-hodnota; n.s. = nesignifikantní; HP = hypofarynx; OC = dutina ústní; OP = orofarynx; L = larynx.

Tabulka S5: Asociace mezi jednotlivými imunitními biomarkery a parametry přežití, univariální a multivariální analýza

Prognostický parametr		OS				DSS				DFS			DMFS			LRFS		
		Celkem pacientů	Počet pacientů	cHR	aHR	Počet pacientů	cHR	aHR	Počet pacientů	cHR	aHR	Počet pacientů	cHR	aHR	Počet pacientů	cHR	aHR	
PD-L1 na TC	Negativní	31	12	ref	ref	7	ref	ref	9	ref	ref	6	ref	ref	7	ref	ref	
	Pozitivní	22	9	1.30 (0.55–3.09)	1.49 (0.54–4.13)	8	1.97 (0.71–5.43)	<b>3.92</b> ( <b>1.04–14.75</b> )	13	<b>2.9</b> ( <b>1.23–6.84</b> )	<b>3.88</b> ( <b>1.42–10.59</b> )	4	1.15 (0.32–4.08)	1.49 (0.31–7.25)	9	2.27 (0.84–6.09)	2.70 (0.80–9.13)	
PD-L1 na IC	<M	26	14	ref	ref	9	ref	ref	13	ref	ref	6	ref	ref	10	ref	ref	
	≥M	27	7	<b>0.38</b> ( <b>0.15–0.95</b> )	0.44 (0.13–1.46)	6	0.52 (0.18–1.45)	0.83 (0.19–3.66)	9	0.47 (0.20–1.11)	0.90 (0.27–2.96)	4	0.43 (0.12–1.53)	0.28 (0.04–1.79)	6	0.45 (0.16–1.25)	1.34 (0.34–5.34)	
PD-L1 <sub>IC</sub>	Nízká	33	17	ref	ref	12	ref	ref	18	ref	ref	8	ref	ref	13	ref	ref	
	Vysoká	20	4	<b>0.26</b> ( <b>0.09–0.79</b> )	<b>0.17</b> ( <b>0.04–0.74</b> )	3	0.28 (0.08–1.01)	<b>0.17</b> ( <b>0.03–0.92</b> )	4	<b>0.22</b> ( <b>0.07–0.64</b> )	<b>0.22</b> ( <b>0.05–0.92</b> )	2	0.24 (0.05–1.16)	<b>0.11</b> ( <b>0.01–0.96</b> )	3	<b>0.26</b> ( <b>0.07–0.91</b> )	0.44 (0.08–2.44)	
CD4+ TIL	<M	25	14	ref	ref	11	ref	ref	14	ref	ref	7	ref	ref	11	ref	ref	
	≥M	27	7	0.45 (0.18–)	0.62 (0.19–)	4	0.33 (0.10–)	0.44 (0.10–)	8	<b>0.41</b> ( <b>0.17–</b> )	0.71 (0.22–)	3	0.30 (0.08–)	0.31 (0.04–)	5	0.37 (0.13–)	0.61 (0.15–)	

				1.11)	1.95)		1.03)	1.86)		<b>0.99)</b>	2.30)		1.16)	2.26)		1.07)	2.43)
<b>CD8+ TIL</b>	<b>&lt;M</b>	25	15	ref	ref	11	ref	ref	14	ref	ref	7	ref	ref	10	ref	ref
	<b>≥M</b>	27	6	<b>0.26</b> <b>(0.10–</b> <b>0.68)</b>	<b>0.32</b> <b>(0.11–</b> <b>0.95)</b>	4	<b>0.24</b> <b>(0.08–</b> <b>0.76)</b>	0.31 (0.08– 1.18)	8	<b>0.35</b> <b>(0.14–</b> <b>0.84)</b>	0.63 (0.22– 1.82)	3	<b>0.23</b> <b>(0.06–</b> <b>0.88)</b>	0.31 (0.05– 1.80)	6	0.42 (0.15– 1.15)	0.67 (0.19– 2.36)
<b>Denzita TIL</b>	<b>Snížená</b>	24	14	ref	ref	10	ref	ref	13	ref	ref	5	ref	ref	12	ref	ref
	<b>Zvýšená</b>	28	7	<b>0.30</b> <b>(0.12–</b> <b>0.76)</b>	0.38 (0.13– 1.14)	5	<b>0.30</b> <b>(0.10–</b> <b>0.91)</b>	0.36 (0.09– 1.40)	9	<b>0.37</b> <b>(0.16–</b> <b>0.89)</b>	0.51 (0.18– 1.49)	5	0.46 (0.13– 1.68)	0.52 (0.10– 2.67)	4	<b>0.21</b> <b>(0.07–</b> <b>0.65)</b>	0.27 (0.07– 1.01)

cHR = základní poměr rizik; aHR = adjustovaný poměr rizik (adjustace na kovariáty pohlaví, věku, abúzu alkoholu, kouření, HPV pozitivitu, stádu onemocnění, konkomitantní chemoterapii, bakteriální infekci během léčby a stav očkování proti covidu-19); CI = interval spolehlivosti; ref = reference; OS = celkové přežití; DSS = nádorově specifické přežití; DFS = přežití bez známek recidivy onemocnění; DMFS = přežití bez vzdálených metastáz; LRFS = přežití bez lokoregionálního relapsu; p = p-hodnota; M = medián (15 % pro PDL1 na IC; 32/mm<sup>2</sup> pro CD4+ TIL; 28/mm<sup>2</sup> pro CD8+ TIL); TC = nádorové buňky; IC = imunitní buňky; TIL = tumor infiltrující lymfocyty; PD-L1 = ligand receptoru programované smrti 1; denzita TIL = snížená <30 %, zvýšená >30 %; PD-L1 = ligand receptoru programované smrti 1; PD-L1<sub>IC</sub> = procentuální rozdíl mezi expresí PD-L1 na imunitních a nádorových buňkách – nízká < 10 %, vysoká > 10 %; n.s. = nesignifikantní; signifikantní výsledky jsou zvýrazněny tučně.



**Tabulka S6: Power test pro kombinaci interakce biomarkerů a parametru OS**

PD-L1 <sub>IC</sub>	TIL denzita	N	Událost	Pravděpodobnost události	aHR (95%CI)	SE	SD	N velikost vzorku	Síla testu
Nízká	Snížená	19	12		Ref				
Nízká	Zvýšená	13	5	0.53	0.52 (0.16–1.66)	0.31	1.75	32	27 %
Vysoká	Snížená	5	2	0.58	0.31 (0.04–2.18)	0.31	1.52	24	58 %
Vysoká	Zvýšená	15	2	0.41	<b>0.07 (0.01–0.46)</b>	0.07	0.41	34	<b>99 %</b>

aHR = adjustovaný poměr rizik (adjustace na kovariáty pohlaví, věku, abúzu alkoholu, kouření, HPV pozitivité, stádu onemocnění, konkomitantní chemoterapii, bakteriální infekci během léčby a stav očkování proti covidu-19); CI = interval spolehlivosti; ref = reference; OS = celkové přežití; N = počet; SE = standardní chyba; SD = směrodatná odchylka; TIL = tumor infiltrující lymfocyty; PD-L1 = ligand receptoru programované smrti 1; denzita TIL = snížená < 30 %, zvýšená > 30 %; PD-L1 = ligand receptoru programované smrti 1; PD-L1<sub>IC</sub> = procentuální rozdíl mezi expresí PD-L1 na imunitních a nádorových buněk – nízká < 10 %, vysoká > 10 %.

Tabulka S7: Asociace mezi interakcí imunitních biomarkerů a parametry přežití pacientů, univariátní a multivariátní analýza

		OS				DSS				DFS			DMFS			LRFS		
Prognostický faktor (1)	Prognostický faktor (2)	Celkem pacientů	Počet pacientů	cHR	aHR	Počet pacientů	cHR	aHR	Počet pacientů	cHR	aHR	Počet pacientů	cHR	aHR	Počet pacientů	cHR	aHR	
PD-L1 <sub>IC</sub>	CD8+ TILs																	
Nízká	<M	22	13	ref	ref	9	ref	ref	12	ref	ref	6	ref	ref	8	Ref	ref	
Nízká	≥M	10	4	0.53 (0.17–1.62)	0.57 (0.15–2.13)	3	0.58 (0.16–2.13)	0.61 (0.13–2.81)	6	0.98 (0.37–2.62)	1.39 (0.42–4.65)	2	0.44 (0.09–2.24)	0.66 (0.07–6.32)	5	1.32 (0.43–4.06)	1.67 (0.40–6.91)	
Vysoká	<M	3	2	0.70 (0.16–3.10)	0.37 (0.05–2.62)	2	0.98 (0.21–4.58)	0.40 (0.05–3.42)	2	0.82 (0.18–3.70)	0.98 (0.12–8.36)	1	0.61 (0.07–5.09)	0.23 (0.01–6.23)	2	1.49 (0.32–7.03)	2.58 (0.28–23.80)	
Vysoká	≥M	17	2	<b>0.12 (0.03–0.53)</b>	<b>0.08 (0.01–0.52)</b>	1	<b>0.09 (0.01–0.69)</b>	<b>0.05 (0.00–0.62)</b>	2	<b>0.11 (0.02–0.50)</b>	<b>0.15 (0.02–1.00)</b>	1	<b>0.10 (0.01–0.83)</b>	<b>0.05 (0.00–1.00)</b>	1	<b>0.10 (0.01–0.81)</b>	0.24 (0.02–2.91)	
PD-L1 <sub>IC</sub>	Denzita TIL																	
Nízká	Snížená	19	12	ref	ref	8	ref	ref	10	ref	ref	4	ref	ref	9	ref	ref	

Nízká	Zvýšená	13	5	0.53 (0.18–1.50)	0.52 (0.16–1.66)	4	0.64 (0.19–2.14)	0.71 (0.17–2.91)	8	0.95 (0.37–2.41)	0.97 (0.33–2.83)	4	0.90 (0.22–3.66)	0.77 (0.12–4.95)	4	0.55 (0.16–1.81)	0.75 (0.22–2.62)
Vysoká	Snížená	5	2	0.53 (0.12–2.41)	0.31 (0.04–2.18)	2	0.80 (0.17–3.83)	0.70 (0.06–7.60)	3	0.85 (0.23–3.12)	1.58 (0.25–10.18)	1	0.62 (0.07–5.70)	0.29 (0.01–7.75)	3	0.93 (0.34–2.57)	4.49 (0.65–30.91)
Vysoká	Zvýšená	15	2	<b>0.12 (0.03–0.54)</b>	<b>0.07 (0.01–0.46)</b>	1	<b>0.09 (0.01–0.72)</b>	<b>0.05 (0.00–0.61)</b>	1	<b>0.06 (0.01–0.44)</b>	<b>0.04 (0.00–0.51)</b>	1	0.13 (0.01–1.17)	0.05 (0.00–1.11)	0	0.00 (0.00–0.00)	0.00 (0.00–0.00)

cHR = základní poměr rizik; aHR = adjustovaný poměr rizik (adjustace na kovariáty pohlaví, věku, abúzu alkoholu, kouření, HPV pozitivitu, stádu onemocnění, konkomitantní chemoterapii, bakteriální infekci během léčby a stavu očkování proti covidu-19); CI = interval spolehlivosti; ref = reference; OS = celkové přežití; DSS = nádorově specifické přežití; DFS = přežití bez známek recidivy onemocnění; DMFS = přežití bez vzdálených metastáz; LRFS = přežití bez lokoregionálního relapsu; p = p-hodnota; M = medián (28/mm<sup>2</sup> pro CD8+ TIL); TC = nádorové buňky; IC = imunitní buňky; TIL = tumor infiltrující lymfocyty; PD-L1 = ligand receptoru programované smrti 1; denzita TIL = snížená < 30 %, zvýšená > 30 %; PD-L1<sub>IC</sub> = procentuální rozdíl mezi expresí PD-L1 na imunitních a nádorových buňkách - nízká < 10 %, vysoká > 10 %; n.s. = nesignifikantní; signifikantní výsledky jsou zvýrazněny tučně

## 9.4 Příloha 4: Časný výsledek prospektivní studie – full text manuskriptu



### OPEN ACCESS

EDITED BY  
Omar Kujan,  
University of Western Australia, Australia

REVIEWED BY  
Mariana Palacon,  
São Paulo State University, Brazil  
Ming Zheng,  
Academy of Military Medical Sciences, China

\*CORRESPONDENCE  
Tomáš Blažek  
✉ tomas.blazek@fno.cz

<sup>†</sup>These authors have contributed equally to this work

RECEIVED 29 November 2023

ACCEPTED 18 March 2024

PUBLISHED 04 April 2024

### CITATION

Blažek T, Petráš M, Hurník P, Matoušek P, Knybel L, Čermáková ZZ, Štembírek J, Cvek J and Soumarová R (2024) High PD-L1 expression on immune cells along with increased density of tumor-infiltrating lymphocytes predicts a favorable survival outcome for patients with loco-regionally advanced head and neck cancer: early results from a prospective study. *Front. Oncol.* 14:1346793. doi: 10.3389/fonc.2024.1346793

### COPYRIGHT

© 2024 Blažek, Petráš, Hurník, Matoušek, Knybel, Čermáková, Štembírek, Cvek and Soumarová. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

# High PD-L1 expression on immune cells along with increased density of tumor-infiltrating lymphocytes predicts a favorable survival outcome for patients with loco-regionally advanced head and neck cancer: early results from a prospective study

Tomáš Blažek<sup>1,2,3\*†</sup>, Marek Petráš<sup>3†</sup>, Pavel Hurník<sup>2,4</sup>, Petr Matoušek<sup>2,5</sup>, Lukáš Knybel<sup>1,2</sup>, Zuzana Zdeňblová Čermáková<sup>1,2</sup>, Jan Štembírek<sup>2,6</sup>, Jakub Cvek<sup>1,2</sup> and Renata Soumarová<sup>3,7</sup>

<sup>1</sup>Department of Oncology, Ostrava University Hospital, Ostrava, Czechia, <sup>2</sup>Faculty of Medicine, University of Ostrava, Ostrava, Czechia, <sup>3</sup>Third Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czechia, <sup>4</sup>Department of Pathology, Ostrava University Hospital, Ostrava, Czechia, <sup>5</sup>Department of Otorhinolaryngology, Ostrava University Hospital, Ostrava, Czechia, <sup>6</sup>Department of Orofacial Surgery, Ostrava University Hospital, Ostrava, Czechia, <sup>7</sup>Department of Oncology, Královské Vinohrady University Hospital, Prague, Czechia

**Introduction:** In the era of personalized medicine and treatment optimization, use of immune biomarkers holds promise for estimating the prognosis of patients with head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) undergoing definitive treatment.

**Methods:** To evaluate the prognostic potential of immune biomarkers, we conducted a prospective monocentric cohort study with loco-regionally advanced HNSCC patients indicated for definitive radiotherapy/radiochemotherapy at the Department of Oncology, Ostrava University Hospital, Czech Republic, between June 2020 and August 2023. We focused on the expression of programmed death ligand 1 (PD-L1) and tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) relative to overall survival (OS) and specific survival rates. Associations between biomarkers and survival rates were assessed by crude and adjusted hazard ratios (cHR, aHR, respectively) obtained from Cox proportional hazards regression.

**Results:** Among a total of 55 patients within a median follow-up of 19.7 months, there were 21 (38.2%) all-cause deaths and 15 (27.3%) cancer-related deaths. An overall survival (OS) rate of 61.8% and a disease-specific survival (DSS) rate of

72.7% were recorded. A significant association between survival rates and a  $\geq 10\%$  difference in PD-L1 expression on immune versus tumor cells (high PD-L1<sub>IC</sub> expression) was documented regardless of the type of analysis (univariate or multivariate). In addition, a stronger association was confirmed for OS and the composite biomarker high PD-L1<sub>IC</sub> expression along with either median-higher CD8+ TIL count or increased TIL density  $\geq 30\%$ , as indicated by an aHR of 0.08 (95% CI, 0.01 to 0.52) and 0.07 (95% CI, 0.01 to 0.46), respectively. Similar results were demonstrated for other specific survival rates.

**Discussion:** The early outcomes of the present study suggest the utility of a strong prognostic factor involving a composite biomarker high PD-L1<sub>IC</sub> expression along with increased TIL density in HNSCC patients undergoing definitive radiotherapy and radiochemotherapy.

**Trial registration:** The study is registered with Clinicaltrials.gov. – NCT05941676

#### KEYWORDS

immune biomarkers, PD-L1 expression, tumor-infiltrating lymphocytes, prognosis, head and neck cancer

## 1 Introduction

Estimation of the prognosis of patients with head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) has become increasingly important in recent years. Particularly in the curative stages of the disease, an accurate assessment of a patient's prognosis can help optimize the treatment strategy and thus achieve a better balance between the ultimate therapeutic goal versus acceptable side effects and treatment toxicity. Therefore, the search for new prognostic markers is highly desirable. It is in this respect that research in the field of immuno-oncology offers new insights. Understanding the concept of the tumor immune microenvironment (TIME) and studying interactions between tumor cells (TCs) and immune cells (ICs) allows for new research perspectives including the search for prognostic immune biomarkers (1, 2). Of particular interest is the study of signaling inhibitory molecules expressed on the surface of both TCs and ICs that contribute to and modify these complex immune interactions (3, 4). This is especially important in HNSCC, which is considered a tumor with high immunogenic potential (5). The first biomarkers studied in TIME for their prognostic potential were tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) (6, 7). Several studies have demonstrated an association between high TIL infiltration and favorable treatment outcomes in HNSCC patients (8, 9). Among the different subtypes of TILs, CD8+ T-lymphocytes have been shown to have the dominant prognostic potential (10). Furthermore, these findings have been summarized and comprehensively analyzed in meta-analyses (11, 12).

In addition to TILs, an important role in TIME is played by a group of immunoreactive molecules that modulate the complex

immune interactions. These molecules represent signaling molecules expressed on TCs and ICs that generally have immunosuppressive activity. The most studied molecule is programmed death ligand 1 (PD-L1).

Its main activity is interaction with the programmed death receptor-1 (PD-1) located on CD8+ T-lymphocytes, leading to cell inactivation and immunosuppression (13). Although the mechanism of PD-L1/PD-1 interaction is well understood, the prognostic potential of PD-L1 expression in HNSCC remains unclear.

Several studies have evaluated the association between PD-L1 expression and survival in HNSCC patients undergoing definitive treatment. The results either showed no effect of the biomarker or were associated with worse treatment outcomes (14–16). In addition, two previous meta-analyses did not demonstrate a prognostic effect, while another meta-analysis found PD-L1 expression to be a marker of poor prognosis in an Asian population (17–19). Furthermore, several studies have not demonstrated the feasibility of using the combined positive score (CPS) in PD-L1 assessment to estimate the prognosis of HNSCC patients (20–22). However, another three studies reported that PD-L1 expression appears to have a prognostic potential, particularly when assessing its expression on immune cells (23–25). A recent meta-analysis reported similar results (26).

Given the current findings, we designed a prospective cohort study to assess the association of survival rates and biomarkers, including PD-L1 expression and TIL density, in HNSCC patients indicated for definitive radiotherapy and/or radiochemotherapy. The early outcomes of our study focused not only on the individual biomarkers but, also, on their combination. Moreover, we

attempted to define the cutoff value for higher or increased levels of biomarkers suitable for everyday clinical practice.

## 2 Materials and methods

### 2.1 Study design and participants

The ONKOL-01-Head and Neck Study was conducted as a monocentric prospective cohort study at the Department of Oncology of Ostrava University Hospital between June 2020 and August 2023.

The study aimed to assess prognostic factors for patients with head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) including human papillomavirus (HPV)-positive carcinomas indicated for definitive radiotherapy and/or radiochemotherapy. The inclusion criteria encompassed adults aged 18 to 90 with histologically verified HNSCC in the oral cavity, nasal cavity, oropharynx, larynx, or hypopharynx.

Patients diagnosed with non-metastatic clinical stages of disease (I-IVb) were eligible for participation provided their paraffin-embedded tumor tissue samples from the biopsy were available.

Patients with histological types other than HNSCC (such as nasopharyngeal, salivary gland, thyroid, mucosal melanoma, skin carcinomas, lymphomas, and occult primary tumors), as well as those with distant metastases, synchronous malignancies, recurrent disease or a history of prior radiotherapy or chemotherapy, were excluded. The initial diagnostic protocol included a comprehensive otorhinolaryngological examination. Computed tomography (CT) and/or magnetic resonance imaging (MRI) of the neck was conducted to determine the disease stage, which followed the American Joint Committee on Cancer TNM staging system, version 8 (27).

Prior to participation, informed consent was obtained from each patient. The study adhered to the ethical guidelines outlined in the Declaration of Helsinki and received approval from the Ethics Committee of Ostrava University Hospital.

### 2.2 Treatment and follow-up

Patients in the study were selected for definitive radiotherapy and/or radiochemotherapy. The intensity-modulated radiotherapy (IMRT) technique, utilizing 4-MV and 6-MV energy X-rays, was employed. The standard radiotherapy protocol comprised 70 Gy over 7 weeks, with a daily dose of 2.0 Gy/fraction, either as a stand-alone treatment or in combination with cisplatin chemotherapy.

Concurrent chemotherapy was administered on a weekly or triweekly basis, following guideline recommendations, with cumulative doses exceeding 200 mg/m<sup>2</sup> (28). Patients deemed unsuitable for chemoradiation were directed towards either hyperfractionated RT or accelerated RT (29, 30). Within a subgroup of patients with advanced oral cavity tumors, a dose

escalation regimen employing CyberKnife stereotactic radiotherapy (SRT) was implemented (31).

The post-treatment follow-up protocol encompassed otorhinolaryngology and/or orofacial surgery examinations, endoscopic evaluations, laboratory tests including SCC-antigen tumor markers, positron emission tomography (PET/CT) as well as CT and/or MRI scans. Patients had follow-up appointments every 1 to 3 months during the initial 2 years, followed by intervals of 3 to 6 months thereafter. PET/CT scans, utilized to assess tumor response, were scheduled 12 weeks after treatment completion, with a subsequent scan after another 12 weeks. In instances of complete remission, CT or MRI scans were scheduled at 3- to 6-month intervals. In cases where disease progression or recurrence was evident, a combination of repeat examinations (PET/CT or CT and MRI) alongside endoscopic and/or invasive diagnostic procedures was performed. Information on the follow-up schedule is provided in [Supplementary Table S1](#).

### 2.3 Immunohistochemical analysis

Immunohistochemical (IHC) staining was employed to assess immune biomarkers in pretreatment tissue samples that were formalin-fixed and paraffin-embedded. Tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) were categorized based on the surface expression of CD3, CD4, and CD8. The expression of PD-L1 was evaluated on the membranes of both tumor and immune cells. Sections measuring 4 μm in thickness were extracted from representative paraffin blocks onto electrostatic glass slides. Immunohistochemistry was conducted using a customized protocol on a Ventana Benchmark Ultra instrument <sup>(Roche Diagnostics, Switzerland)</sup> employing an ultraView Universal DAB Detection Kit <sup>(Roche Diagnostics, Switzerland)</sup> after prior revitalization in CCI buffer.

Specific antibodies were utilized for the detection of particular markers: PD-L1 (clone 22C3, DAKO M3653, dilution 1:50, incubation 40 minutes), CD3 (clone LN10, Leica NCL-LCD3-565, dilution 1:100, incubation 60 minutes), CD4 (clone SP35, DCS CI851C003, dilution 1:50, incubation 32 minutes), CD8 (clone P17-V, DB Biotech M0755, dilution 1:200, incubation 60 minutes). The cytokeratin marker (CK) was detected with clone AE1/AE3, Zytomed MSK019 (dilution 1:200, incubation 24 min) and was used to differentiate the epithelial component of the tumor parenchyma from the stroma.

Histopathological analysis was performed using an Olympus BX45 optical microscope <sup>(Boston Industries Inc., Boston)</sup>, aided by an optical measuring grid allowing the assessment of 1 mm<sup>2</sup> under observation at a total magnification of 100× (objective 10×, eyepiece 10×). As part of the immunohistochemical analysis, the count of positive elements per 1 mm<sup>2</sup> within tumor tissue (parenchyma) was conducted for CD3, CD4, and CD8 antibodies. Median values were employed as TIL cutoff points to distinguish high versus low infiltration.

Moreover, TIL density within the examined tumor region was semiquantitatively assessed by calculating the proportion of area



occupied by mononuclear (CD3+) cell infiltrates to the entire parenchymal area (% TIL area occupied by mononuclear cells in tumor parenchyma).

This assessment classified TIL densities as either decreased (<30%) or increased ( $\geq$ 30%) infiltration (32, 33), PD-L1 expression was individually evaluated in tumor parenchyma for both tumor cells (TCs) and immune cells (ICs), with positivity >1% indicated by the percentage intensity of ligand expression (34). Immune cells included intraparenchymal T-lymphocytes, macrophages, and dendritic cells that infiltrated tumor cell nests. In addition, PD-L1 expression on immune cells was assessed by the percentage difference in expression between ICs and TCs. A difference of  $\geq$ 10% was categorized as high PD-L1 expression on immune cells (PD-L1<sub>IC</sub>).

## 2.4 Statistical analysis

The study aimed to investigate the potential association between the survival of HNSCC patients and PD-L1 expression on both TCs and ICs, taking into account the presence of TIL infiltration. The primary endpoint was overall survival (OS), calculated from the commencement of radiotherapy to the date of death from any cause or the last follow-up visit. Secondary endpoints included disease-specific survival (DSS), locoregional-free survival (LRFS), disease-free survival (DFS), and distant metastatic-free survival (DMFS).

Disease-specific survival was censored from the initiation of radiotherapy to the date of cancer-related death or the last follow-up visit. Patients dying from causes unrelated to HNSCC were censored at their time of death. Locoregional-free survival was defined by radiological and/or pathological evidence of tumor recurrence or progression at the primary site or in the regional nodal area detected after the initiation of radiotherapy. The parameters DFS and DMFS were used to record any form of recurrence or the detection of distant tumor metastasis, measured from the initiation of radiotherapy to the date of recurrence detection. Patients without tumor recurrence were censored at the time of their last follow-up contact.

Categorical demographic and disease variables were presented as proportions, while continuous variables were transformed into binary form based on the median values within the study population. Categorical variables underwent assessment using Fisher's exact test or the  $\chi^2$  test. Cox proportional hazards regression was employed for both univariate and multivariate analyses, with adjustments made for covariates including sex, age, alcohol abuse, smoking status, HPV positivity, stage, concomitant chemotherapy, COVID vaccination status, and bacterial infection. The outcomes were expressed by crude (cHR) or adjusted hazard ratio (aHR). The power of the test was estimated based on a binary covariate in a Cox proportional hazards model considering the hazard ratio, sample size, overall probability of failure, and a default significance level  $\alpha = 0.05$ .

All tests were two-tailed, with a level of significance set at 0.05. Statistical tests and analyses were conducted using Prism 9 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) and STATA version 17 software (StataCorp, College Station, TX, USA).

## 2.5 Resource identification initiative

Catalog numbers and RRID:

PDL-1 [clone 22C3, DAKO M3653 (Agilent Cat# M3653, RRID : AB\_2861298)].

CD3 [clone LN10, Leica NCL-LCD3-565, (Leica Biosystems Cat# NCL-L-CD3-565 (also CD3-565-L-CE, RRID : AB\_563541)].

CD4 [clone SP35, DCS CI851C003, (Thermo Fisher Scientific Cat# MA5-16338, RRID : AB\_2537857)].

CD8 [clone P17-V, DB Biotech M0755, (DB Biotech Cat# DB 085, RRID : AB\_2315705)].

CK [clone AE1/AE3, Zytomed MSK019, (Zytomed Systems Cat# MSG019 (also BMS006, MSK019-05, MSK019), RRID : AB\_2864453)].

## 3 Results

A total of 55 patients diagnosed with localized and locoregionally advanced HNSCC, who were candidates for definitive radiotherapy and/or radiochemotherapy, were enrolled in the study from June 1, 2020, to August 9, 2022. The median age was 63 years (IQR: 58–71), with a higher proportion of male patients, 41 (74.5%). The predominant primary tumor sites included the oral cavity, 21 (38.2%) and oropharynx, 21 (38.2%), followed by hypopharynx, 7 (12.7%), and larynx, 6 (10.9%). Among the 21 oropharyngeal carcinomas, 15 (71.4%) were HPV-positive. Stage IV was the most common, represented by 37 (67.2%) patients, followed by stage III in 17 (31.0%) patients including one patient in stage I. The detailed clinicopathological characteristics of the cohort and tumor and treatment characteristics are provided in [Table 1](#) and [Supplementary Table S2](#). The median follow-up time for overall survival (OS) and disease-specific survival (DSS) was 19.7 months (IQR: 10.1–25.1 months). Other specific survival rates were followed for shorter durations, ranging from 11.8 to 15.2 months.

Immunohistochemical analyses of pretreatment tumor tissue samples for the presence of TIL and PD-L1 expression were performed in 52 and 53 patients, respectively. In the remaining patients, the analysis could not be performed due to damage and degradation of the tissue sample. The median CD8+ TIL and CD4+ TIL counts were 28 and 32/mm<sup>2</sup>, respectively. Out of the 53 patient tissue samples evaluated for PD-L1 expression, it was present in 22 (41.5%) patients on tumor cells, and expression was higher than the

TABLE 1 Patient and tumor characteristics.

Characteristic		No. of patients (%)	p
Sex	Female	14 (25.5)	<0.0001
	Male	41 (74.5)	
Age	< M	27 (49)	n.s.
	≥ M	28 (51)	
CCI	< M	27 (49)	n.s.
	≥ M	28 (51)	
BMI	< M	27 (49)	n.s.
	≥ M	28 (51)	
Alcohol abuse	No	25 (45.5)	n.s.
	Yes	30 (54.5)	
Smoking	No	11 (20)	<0.0001
	Yes*	44 (80)	
Bacterial infection	No	12 (21.8)	<0.0001
	Yes	43 (78.2)	
COVID vaccination	No	23 (41.8)	n.s.
	Yes	32 (58.2)	
Tumor site	Oropharynx	21 (38.2)	0.0001
	Oral cavity	21 (38.2)	
	Hypopharynx	7 (12.7)	
	Larynx	6 (10.9)	
Stage of disease	≤3**	18 (32.7)	0.0003
	4	37 (67.3)	
Tumor grade	1	21 (38.2)	0.0117
	2	24 (43.6)	
	3	10 (18.2)	
HPV positivity	No	40 (72.7)	<0.0001
	Yes	15 (27.3)	
Concomitant CHT	No	25 (45.5)	n.s.
	Yes	30 (54.5)	
BED <sub>10</sub>	< M	38 (69)	<0.0001
	≥ M	17 (31)	

\*) Regular or former smoker; \*\*) Only one patient in stage 1; M = median (age = 63 years; CCI = 5; BMI = 23.6 kg/m<sup>2</sup>; BED<sub>10</sub> = 80 Gy); CCI, Charlson Comorbidity Index; BMI, Body Mass Index; COVID, Coronavirus Disease; HPV, human papillomavirus; CHT, chemotherapy; BED<sub>10</sub>, Biological Effective Dose; p, p-value; n.s., not significant.

median of 15% on immune cells in 52 (98%) patients. A TIL density of ≥30% assessed as increased infiltration was observed in 28 (53.8%) patients (Figures 1A, B). Moreover, high PD-L1<sub>IC</sub> expression was documented in 20 (37.7%) patients (Figure 1C).

A total of 21 (38.2%) patient deaths during a median follow-up of 19.7 months accounted for 61.8% of OS and 72.7% of DSS. Out of

the 55 patients, 3 (5.5%) had local recurrence, 13 (23.6%) had locoregional recurrence, 10 (18.2%) patients experienced distant metastatic progression and 15 (27.3%) patients died of cancer.

Univariate analysis did not show any association of overall or specific survivals with demographic and standard clinicopathological disease characteristics (Supplementary Table S3). Moreover, patient survival rates were not linked to the use of concomitant chemotherapy or various radiotherapy regimens and the biologically effective doses delivered.

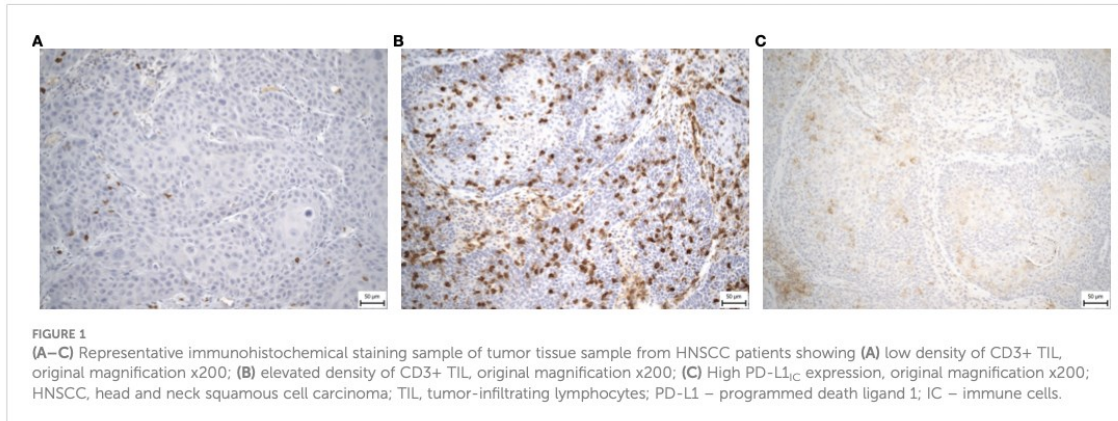
The association between the OS rate and PD-L1 expression on ICs, CD8+ TIL infiltration, or increased TIL density, revealed through univariate analysis, was not confirmed by multivariate analysis, except for the relationship between OS and CD8+ TIL (Table 2; Supplementary Table S4). Conversely, specific DFS and DSS rates were shortened in patients with PD-L1 expression on TCs, as demonstrated by the respective aHR or cHR. Single factor-related survival rates were demonstrated for high PD-L1<sub>IC</sub> expression - except for DMFS - regardless of type of analysis (univariate or multivariate).

The interaction of high PD-L1<sub>IC</sub> expression, either with median-higher CD8+ TIL infiltration or increased TIL density, exhibited a similar prolonged effect on survival rates. The aHR for high PD-L1<sub>IC</sub> expression and higher CD8+ TIL infiltration was 0.08 (95% CI: 0.01–0.52) for OS and 0.05 (95% CI: 0.00–0.61) for DSS. Similarly, the aHR for high PD-L1<sub>IC</sub> expression and increased TIL density achieved 0.07 (95% CI: 0.01–0.46) for OS and 0.05 (95% CI: 0.00–0.61) for DSS with the power test of > 90% (Supplementary Table S5). The outcomes of univariate and multivariate analyses for other specific survival rates are reported in Table 3 (Supplementary Table S6). Furthermore, these findings were supported by Kaplan-Meier curves for OS, DSS, and DFS survival rates (Figures 2, 3).

## 4 Discussion

This is a unique prospective study that aimed to assess the prognostic impact of immune biomarkers, including TIL and PD-L1 expression, alone or in combination, in HNSCC patients with loco-regionally advanced tumors undergoing definitive radiotherapy and/or radiochemotherapy. Both biomarkers demonstrated a potential prognostic effect on OS, DSS, and DFS, as supported by their respective hazard ratios. When evaluating the impact of a single biomarker, high CD8+ lymphocyte infiltration was associated with favorable outcomes in terms of OS, DFS, and DSS. Previous studies and meta-analyses have reported comparable results (11, 12). This effect may be explained by the activity of CD8+ lymphocytes in recognizing and destroying tumor cells, making them key elements of the anti-tumor immune response. Increased TIL density exhibited a prognostic effect on survival rates similar to high levels of CD8+ TIL as per the study median. The advantage of TIL density over CD8+ TIL consisted of the pre-defined cutoff value of elevated or high levels for each patient. In addition, TIL density takes into account other cell subtypes (CD4+, FOXP3)





besides CD8+, thus providing a more comprehensive description of the conditions and immune interactions in the tumor microenvironment that contribute to the overall results. These conditions were extensively studied in preclinical research which provided a description of the complex modulation of the CD8+ anti-tumor response involving the immunosuppressive activity of

CD4+ and FOXP3 lymphocytes (35). Thus, in the context of these findings, TIL density reflects the overall anti-tumor immune activity more accurately than a single immune biomarker (CD8+ lymphocyte level).

Conversely, no favorable effect of PD-L1 expression on ICs or TCs alone was observed, except for a shortened DSS and DFS in

**TABLE 2** Association of single prognostic factors and outcome survivals, multivariate analysis.

Prognostic factors		Total patients	OS			DSS			DFS		
			No. of patients	aHR (95% CI)	p	No. of patients	aHR (95% CI)	p	No. of patients	aHR (95% CI)	p
PD-L1 on TCs	Negative	31	12	ref		7	ref		9	ref	
	Positive	22	9	1.49 (0.54–4.13)	n.s.	8	3.92 (1.04–14.75)	<b>0.043</b>	13	3.88 (1.42–10.59)	<b>0.008</b>
PD-L1 on ICs	<M	26	14	ref		9	ref		13	ref	
	≥M	27	7	0.44 (0.13–1.46)	n.s.	6	0.83 (0.19–3.66)	n.s.	9	0.90 (0.27–2.96)	n.s.
PD-L1 <sub>IC</sub>	Low	33	17	ref		12	ref		18	ref	
	High	20	4	0.17 (0.04–0.74)	<b>0.018</b>	3	0.17 (0.03–0.92)	<b>0.039</b>	4	0.22 (0.05–0.92)	<b>0.038</b>
CD4+ TILs	<M	25	14	ref		11	ref		14	ref	
	≥M	27	7	0.62 (0.19–1.95)	n.s.	4	0.44 (0.10–1.86)	n.s.	8	0.71 (0.22–2.30)	n.s.
CD8+ TILs	<M	25	15	ref		11	ref		14	ref	
	≥M	27	6	0.32 (0.11–0.95)	<b>0.041</b>	4	0.31 (0.08–1.18)	n.s.	8	0.63 (0.22–1.82)	n.s.
TIL density	Decreased	24	14	ref		10	ref		13	ref	
	Increased	28	7	0.38 (0.13–1.14)	n.s.	5	0.36 (0.09–1.40)	n.s.	9	0.51 (0.18–1.49)	n.s.

aHR, adjusted hazard ratio (adjustment for the covariates of sex, age, alcohol abuse, smoking status, HPV positivity, stage, concomitant chemotherapy, COVID vaccination status, and bacterial infection); CI, confidence interval; ref, reference; OS, Overall Survival; DSS, Disease-Specific Survival; DFS, Disease-Free Survival; p, p-value; M, median (15% for PD-L1 on ICs; 32/mm<sup>2</sup> for CD4+ TIL; 28/mm<sup>2</sup> for CD8+ TIL); TCs, tumor cells; ICs, immune cells; TIL, tumor-infiltrating lymphocytes; TIL density, Decreased <30%, Increased ≥ 30%; PD-L1, programmed death ligand 1; PD-L1<sub>IC</sub>, percentage difference between PD-L1 expression of immune cells and tumor cells - Low <10%, High ≥ 10%; n.s., not significant. Significant results are highlighted in bold.

TABLE 3 Association of interaction of prognostic factors and outcome survivals, multivariate analysis.

Prognostic factor (1)	Prognostic factor (2)	Total patients	OS			DSS			DFS		
			No. of patients	aHR (95% CI)	p	No. of patients	aHR (95% CI)	p	No. of patients	aHR (95% CI)	p
PD-L1 <sub>IC</sub>	CD8+ TILs										
Low	<M	22	13	ref		9	ref		12	ref	
Low	≥M	10	4	0.57 (0.15–2.13)	n.s.	3	0.61 (0.13–2.81)	n.s.	6	1.39 (0.42–4.65)	n.s.
High	<M	3	2	0.37 (0.05–2.62)	n.s.	2	0.40 (0.05–3.42)	n.s.	2	0.98 (0.12–8.36)	n.s.
High	≥M	17	2	0.08 (0.01–0.52)	<b>0.008</b>	1	0.05 (0.00–0.62)	<b>0.020</b>	2	0.15 (0.02–1.00)	<b>0.050</b>
PD-L1 <sub>IC</sub>	TIL density										
Low	Decreased	19	12	ref		8	ref		10	ref	
Low	Increased	13	5	0.52 (0.16–1.66)	n.s.	4	0.71 (0.17–2.91)	n.s.	8	0.97 (0.33–2.83)	n.s.
High	Decreased	5	2	0.31 (0.04–2.18)	n.s.	2	0.70 (0.06–7.60)	n.s.	3	1.58 (0.25–10.18)	n.s.
High	Increased	15	2	0.07 (0.01–0.46)	<b>0.006</b>	1	0.05 (0.00–0.61)	<b>0.020</b>	1	0.04 (0.00–0.51)	<b>0.013</b>

aHR, adjusted hazard ratio (adjustment for the covariates of sex, age, alcohol abuse, smoking status, HPV positivity, stage, concomitant chemotherapy, COVID vaccination status, and bacterial infection); CI, confidence interval; ref, reference; OS, Overall Survival; DSS, Disease-Specific Survival; DFS, Disease-Free Survival; p, p-value; M, median (28/mm<sup>2</sup> for CD8+ TIL); TCs, tumor cells; TIL, tumor-infiltrating lymphocytes; TIL density, Decreased <30%, Increased ≥ 30%; PD-L1, programmed death ligand 1; PD-L1<sub>IC</sub>, percentage difference between PD-L1 expression of immune cells and tumor cells - Low <10%, High ≥ 10%; n.s., not significant. Significant results are highlighted in bold.

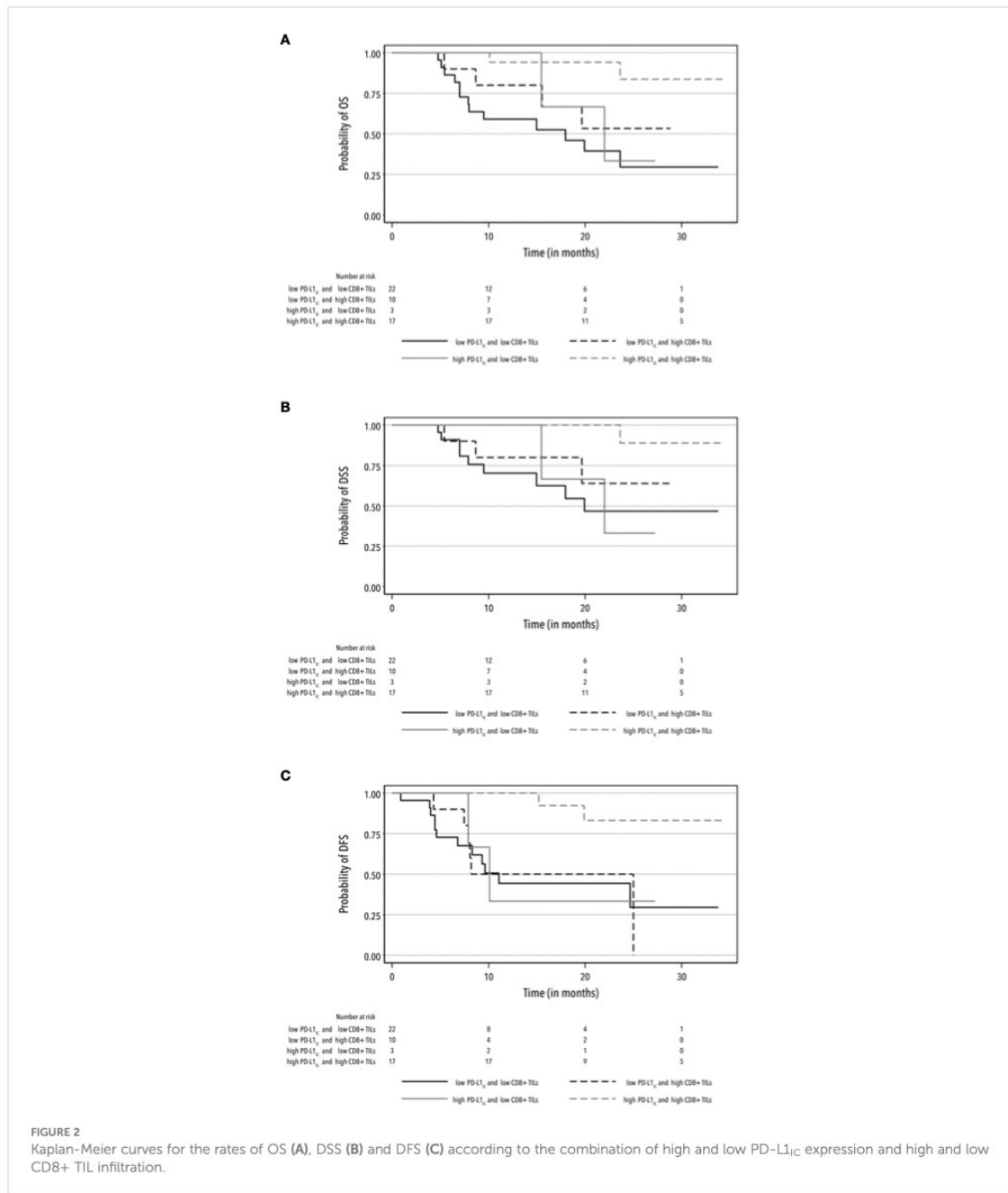
patients with high expression on TCs. Which corresponds to the primary pathophysiological mechanism of action of PD-L1 expression that cancer cells use to escape immune surveillance (36). As both PD-L1 expressions on ICs and TCs were determined in the same tissue section sample, we applied the criterion of higher expression on ICs compared to TCs, defined by a difference of ≥10%. The higher expression of PD-L1 on ICs increased the survival rates including OS, DSS, DFS, and LRFS, proving itself as a potentially new prognostic factor. Moreover, this approach eliminates the currently varying cutoff values of PD-L1 expression positivity (23–25).

In addition, the interaction of both the above biomarkers resulted in a strong prognostic effect. The survival rates of patients with high PD-L1<sub>IC</sub> expression, along with median-higher CD8+ infiltration or increased TIL density, were significantly prolonged compared to those not meeting both criteria. This effect was evident in all investigated survival rates except for DMFS. This specific survival rate was likely insufficiently supported by the low number of patients with metastatic findings within our study follow-up.

Furthermore, a heightened PD-L1 expression on ICs relative to TCs, along with increased TIL density, is likely to play a role in

modulating the complex immune interactions, thereby enhancing the T-cell-mediated antitumor effect. These are complex mechanisms, but probably involve the activity of antigen-presenting cells that stimulate the CD8+ cytotoxic response by inhibiting CD4+ and FOXP3 activity through PD-L1 expression (35). From this perspective, our findings suggest that the prognostic potential of immune biomarkers should only be assessed with careful consideration of their potential integration within the complex immune interactions to avoid drawing erroneous conclusions.

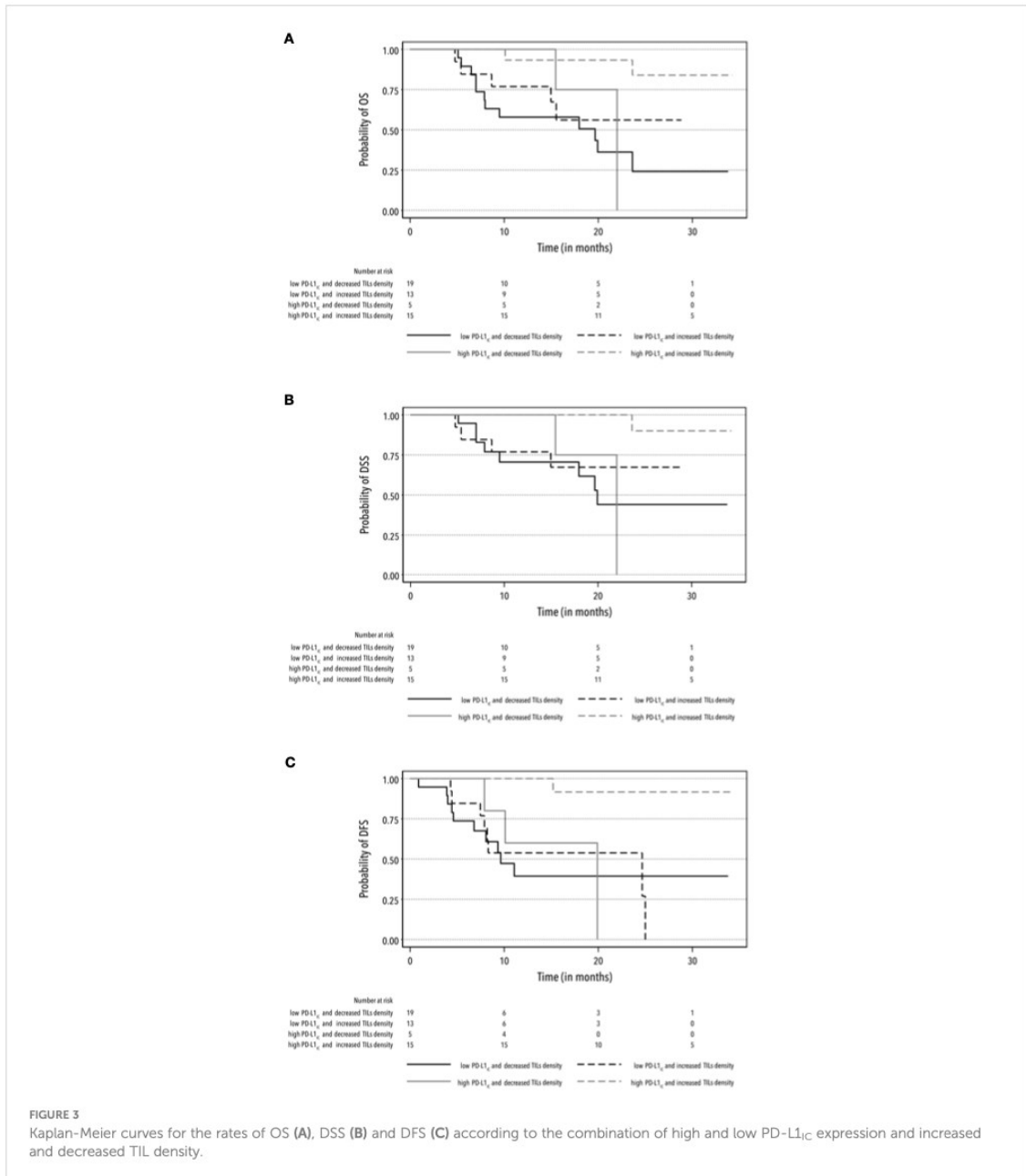
The most important finding of the present study is that the interaction of both the above biomarkers consistently shown to be strong prognostic factors independent of standard clinicopathological characteristics (sex, age, tumor stage, grade, HPV positivity), smoking history, alcohol abuse, radiotherapy regimen, or use of concomitant chemotherapy. The fact that no association between disease stage and survival rates was identified is likely due to the majority of patients being in advanced stages III or IV. Furthermore, our findings were consistent with the outcomes of previous studies demonstrating an association between PD-L1 expression on ICs and favorable OS (23–25). Nevertheless, none of those studies evaluated biomarker



interactions; hence, their outcomes suggested slightly shorter survival rates compared to ours.

The limitations of the present study include the small number of patients enrolled and follow-up duration. We do not believe that the sample size could have influenced the final result, as the estimated power of the test exceeded 90% and, consequently, we anticipate the

reproducibility of our findings. Since the median follow-up time was approximately two years, it remains uncertain whether additional follow-up time could affect these early survival outcomes. We believe that our proposed predictors could remain stable over a longer follow-up period even if their prognostic potential might decrease over time.



## 5 Conclusion

The outcomes of this study support the use of high PD-L1 expression on ICs in conjunction with increased TIL density as

prognostic markers of the survival rates of HNSCC patients undergoing definitive radiotherapy and/or radiochemotherapy. Moreover, the applied definition of high expression of PD-L1<sub>IC</sub> and increased TIL density could be implemented in common



clinical practice. In future studies, it may be interesting to explore different combinations of biomarkers, including PD-1, based on the patterns observed in our study.

## Data availability statement

The original contributions presented in the study are included in the article/Supplementary Material. Further inquiries can be directed to the corresponding author.

## Ethics statement

The studies involving humans were approved by The Ethics Committee of University Hospital Ostrava (protocol code 829/2020). The studies were conducted in accordance with the local legislation and institutional requirements. The participants provided their written informed consent to participate in this study. Written informed consent was obtained from the individual(s) for the publication of any potentially identifiable images or data included in this article.

## Author contributions

TB: Conceptualization, Data curation, Methodology, Project administration, Resources, Validation, Writing – original draft. MP: Conceptualization, Formal analysis, Methodology, Writing – original draft. PH: Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Methodology, Writing – review & editing. PM: Investigation, Writing – review & editing. LK: Investigation, Writing – review & editing. ZC: Investigation, Writing – review &

editing. JŠ: Funding acquisition, Investigation, Writing – review & editing. JC: Project administration, Writing – review & editing. RS: Conceptualization, Supervision, Writing – review & editing.

## Funding

The author(s) declare financial support was received for the research, authorship, and/or publication of this article. Institutional Support to Ostrava University Hospitalgrant RVO-FNOs/2021.

## Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

## Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

## Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2024.1346793/full#supplementary-material>

## References

- Balkwill FR, Capasso M, Hagemann T. The tumor microenvironment at a glance. *J Cell Sci.* (2012) 125:5591–6. doi: 10.1242/jcs.116392
- Binnewies M, Roberts EW, Kersten K, Chan V, Fearon DF, Merad M, et al. Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. *Nat Med.* (2018) 24:541–50. doi: 10.1038/s41591-018-0014-x
- Hadrup S, Donia M, Thor Straten P. Effector CD4 and CD8 T cells and their role in the tumor microenvironment. *Cancer Microenviron.* (2013) 6:123–33. doi: 10.1007/s12307-012-0127-6
- Angell H, Galon J. From the immune contexture to the Immunoscore: the role of prognostic and predictive immune markers in cancer. *Curr Opin Immunol.* (2013) 25:261–7. doi: 10.1016/j.coi.2013.03.004
- Curry JM, Sprandio J, Cognetti D, Luginbuhl A, Bar-ad V, Pribitkin E, et al. Tumor microenvironment in head and neck squamous cell carcinoma. *Semin Oncol.* (2014) 41:217–34. doi: 10.1053/j.seminoncol.2014.03.003
- Uppaluri R, Dunn GP, Lewis JS. Focus on TILs: prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in head and neck cancers. *Cancer Immun.* (2008) 8:16.
- Gooden MJM, De Bock GH, Leffers N, Daemen T, Nijman HW. The prognostic influence of tumour-infiltrating lymphocytes in cancer: a systematic review with meta-analysis. *Br J Cancer.* (2011) 105:93–103. doi: 10.1038/bjc.2011.189
- Ward MJ, Thirdborough SM, Mellows T, Riley C, Harris S, Suchak K, et al. Tumour-infiltrating lymphocytes predict for outcome in HPV-positive oropharyngeal cancer. *Br J Cancer.* (2014) 110:489–500. doi: 10.1038/bjc.2013.639
- Shang B, Liu Y, Jiang S, Liu Y. Prognostic value of tumor-infiltrating FoxP3+ regulatory T cells in cancers: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep.* (2015) 5:15179. doi: 10.1038/srep15179
- Nguyen N, Bellile E, Thomas D, McHugh J, Rozek L, Virani S, et al. Tumor infiltrating lymphocytes and survival in patients with head and neck squamous cell carcinoma: Tumor infiltrating lymphocytes. *Head Neck.* (2016) 38:1074–84. doi: 10.1002/hed.24406
- Borsetto D, Tomasoni M, Payne K, Polesel J, Deganello A, Bossi P, et al. Prognostic significance of CD4+ and CD8+ Tumor-infiltrating lymphocytes in head and neck squamous cell carcinoma: A meta-analysis. *Cancers.* (2021) 13:781. doi: 10.3390/cancers13040781
- De Ruiter EJ, Ooft ML, Devriese LA, Willems SM. The prognostic role of tumor infiltrating T-lymphocytes in squamous cell carcinoma of the head and neck: A systematic review and meta-analysis. *Oncol Immunology.* (2017) 6:e1356148. doi: 10.1080/2162402X.2017.1356148
- Alsaab HO, Sau S, Alzhrani R, Tatiparti K, Bhise K, Kashaw SK, et al. PD-1 and PD-L1 checkpoint signaling inhibition for cancer immunotherapy: mechanism, combinations, and clinical outcome. *Front Pharmacol.* (2017) 8:561. doi: 10.3389/fphar.2017.00561
- Lin Y-M, Sung W-W, Hsieh M-J, Tsai S-C, Lai H-W, Yang S-M, et al. High PD-L1 expression correlates with metastasis and poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. *PLoS One.* (2015) 10:e0142656. doi: 10.1371/journal.pone.0142656

15. Adamski EJ, Starzyńska A, Adamska P, Kunc M, Sakowicz-Burkiewicz M, Marvaso G, et al. High PD-L1 expression on tumor cells indicates worse overall survival in advanced oral squamous cell carcinomas of the tongue and the floor of the mouth but not in other oral compartments. *Biomedicines*. (2021) 9:1132. doi: 10.3390/biomedicines9091132
16. Yang F, Zeng Z, Li J, Zheng Y, Wei F, Ren X. PD-1/PD-L1 axis, rather than high-mobility group alarmins or CD8+ Tumor-infiltrating lymphocytes, is associated with survival in head and neck squamous cell carcinoma patients who received surgical resection. *Front Oncol*. (2018) 8:604. doi: 10.3389/fonc.2018.00604
17. Yang W, Wong MCM, Thomson PJ, Li K-Y, Su Y. The prognostic role of PD-L1 expression for survival in head and neck squamous cell carcinoma: A systematic review and meta-analysis. *Oral Oncol*. (2018) 86:81–90. doi: 10.1016/j.oraloncology.2018.09.016
18. Troiano G, Caponio VCA, Zhurakivska K, Arena C, Pannone G, Mascitti M, et al. High PD-L1 expression in the tumour cells did not correlate with poor prognosis of patients suffering for oral squamous cells carcinoma: A meta-analysis of the literature. *Cell Prolif*. (2019) 52:e12537. doi: 10.1111/cpr.12537
19. Li J, Wang P, Xu Y. Prognostic value of programmed cell death ligand 1 expression in patients with head and neck cancer: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. (2017) 12:e0179536. doi: 10.1371/journal.pone.0179536
20. Wusiman D, Guo L, Huang Z, Li Z, Liu S, Ying J, et al. The clinicopathological significance of PD-L1 expression assessed by the combined positive score (CPS) in head and neck squamous cell carcinoma. *Pathol Res Pract*. (2022) 236:153934. doi: 10.1016/j.prp.2022.153934
21. Lilja-Fischer JK, Eriksen JG, Georgsen JB, Vo TT, Larsen SR, Cheng J, et al. Prognostic impact of PD-L1 in oropharyngeal cancer after primary curative radiotherapy and relation to HPV and tobacco smoking. *Acta Oncol*. (2020) 59:666–72. doi: 10.1080/0284186X.2020.1729407
22. Sanchez-Canteli M, Granda-Díaz R, Del Río-Ibáñez N, Allonca E, López-Alvarez F, Agorreta J, et al. PD-L1 expression correlates with tumor-infiltrating lymphocytes and better prognosis in patients with HPV-negative head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer Immunol Immunother*. (2020) 69:2089–100. doi: 10.1007/s00262-020-02604-w
23. Fukushima Y, Someya M, Nakata K, Hori M, Kitagawa M, Hasegawa T, et al. Influence of PD-L1 expression in immune cells on the response to radiation therapy in patients with oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Radiother Oncol*. (2018) 129:409–14. doi: 10.1016/j.radonc.2018.08.023
24. Kim HR, Ha S-J, Hong MH, Heo SJ, Koh YW, Choi EC, et al. PD-L1 expression on immune cells, but not on tumor cells, is a favorable prognostic factor for head and neck cancer patients. *Sci Rep*. (2016) 6:36956. doi: 10.1038/srep36956
25. Sato F, Ono T, Kawahara A, Kawaguchi T, Tanaka H, Shimamatsu K, et al. Prognostic impact of p16 and PD-L1 expression in patients with oropharyngeal squamous cell carcinoma receiving a definitive treatment. *J Clin Pathol*. (2019) 72:542–9. doi: 10.1136/jclinpath-2019-205818
26. Blažek T, Petráš M, Knybel L, Cvek J, Soumarová R. Programmed cell death ligand 1 expression on immune cells and survival in patients with nonmetastatic head and neck cancer: A systematic review and meta-analysis. *JAMA Netw Open*. (2023) 6:e236324. doi: 10.1001/jamanetworkopen.2023.6324
27. Amin MB, Greene FL, Edge SB, Compton CC, Gershenwald JE, Brookland RK, et al. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more “personalized” approach to cancer staging. *CA A Cancer J Clin*. (2017) 67:93–9. doi: 10.3322/caac.21388
28. Hughes RT, Porosnicu M, Levine BJ, Lycan TW, Shenker RF, Frizzell BA, et al. Chemoradiotherapy with high-dose cisplatin compared with weekly cisplatin for locally advanced head and neck squamous cell carcinoma. *J Med Imag Rad Onc*. (2021) 65:796–805. doi: 10.1111/1754-9485.13292
29. Cvek J, Kubes J, Skacelikova E, Otahal B, Komek P, Halamka M, et al. Hyperfractionated accelerated radiotherapy with concomitant integrated boost of 70–75 Gy in 5 weeks for advanced head and neck cancer: A phase I dose escalation study. *Strahlenther Onkol*. (2012) 188:666–70. doi: 10.1007/s00066-012-0128-x
30. Lacas B, Bourhis J, Overgaard J, Zhang Q, Grégoire V, Nankivell M, et al. Role of radiotherapy fractionation in head and neck cancers (MARCH): an updated meta-analysis. *Lancet Oncol*. (2017) 18:1221–37. doi: 10.1016/S1470-2045(17)30458-8
31. Blažek T, Zdeňková Čermáková Z, Knybel L, Hurník P, Štembirek J, Resová K, et al. Dose escalation in advanced floor of the mouth cancer: a pilot study using a combination of IMRT and stereotactic boost. *Radiat Oncol*. (2021) 16:122. doi: 10.1186/s13014-021-01842-1
32. Spector ME, Bellile E, Amlani L, Zarins K, Smith J, Brenner JC, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in head and neck squamous cell carcinoma. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg*. (2019) 145:1012. doi: 10.1001/jamaoto.2019.2427
33. Hendry S, Salgado R, Gevaert T, Russell PA, John T, Thapa B, et al. Assessing tumor-infiltrating lymphocytes in solid tumors: A practical review for pathologists and proposal for a standardized method from the international immuno-oncology biomarkers working group: part 2: TILs in melanoma, gastrointestinal tract carcinomas, non-small cell lung carcinoma and mesothelioma, endometrial and ovarian carcinomas, squamous cell carcinoma of the head and neck, genitourinary carcinomas, and primary brain tumors. *Adv Anat Pathol*. (2017) 24:311–35. doi: 10.1097/PAP.0000000000000161
34. Ono T, Azuma K, Kawahara A, Kakuma T, Sato F, Akiba J, et al. Predictive value of CD8 / FOXP3 ratio combined with PD-L1 expression for radiosensitivity in patients with squamous cell carcinoma of the larynx receiving definitive radiation therapy. *Head Neck*. (2020) 42:3518–30. doi: 10.1002/hed.26416
35. Elmusrati A, Wang J, Wang C-Y. Tumor microenvironment and immune evasion in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Oral Sci*. (2021) 13:24. doi: 10.1038/s41368-021-00131-7
36. Peltanova B, Raudenska M, Masarik M. Effect of tumor microenvironment on pathogenesis of the head and neck squamous cell carcinoma: a systematic review. *Mol Cancer*. (2019) 18:63. doi: 10.1186/s12943-019-0983-5