

Univerzita Karlova
3. lékařská fakulta



UNIVERZITA KARLOVA
3. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce

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*

MUDr. Tomáš Blažek

Praha 2024

Doktorské studijní programy v biomedicině

Universita Karlova

Obor: Preventivní medicína a epidemiologie

Předseda oborové rady: doc. MUDr. Jan Polák Ph.D. MBA

Školící pracoviště: 3.lékařská fakulta

Autor: MUDr. Tomáš Blažek

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

Oponenti: doc. MUDr. Milan Vošmik Ph.D.

doc. MUDr. Radek Lakomý Ph.D.

Obhajoba se bude konat na 3. LF UK Praha, Ruská 87, 100
00, Praha 10

S disertací je možno se seznámit na děkanátu 3.lékařské
fakulty Univerzity Karlovy

OBSAH

Seznam zkratk.....	1
Souhrn	2
Summary	4
1. Úvod	7
1.1 Terciární prevence nádorů hlavy a krku	8
1.2 Prognóza pacientů s HNSCC	9
1.3 Role imunitního systému v patogenezi HNSCC.....	10
1.4 Nádorové mikroprostředí	11
1.5 Imunitní komponenta v TME	12
2. Cíle studie	14
2.1 Literární přehled a metaanalýza.....	15
2.3 Prospektivní kohortová studie	18
2.3.1 Materiály a metody	18
2.3.2 Výsledky.....	21
2.3.3 Diskuse.....	23
3. Závěry	26
4. Seznam použité literatury.....	29
5. Seznam publikací doktoranda.....	33

SEZNAM ZKRATEK

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 Inverval)
CPS	kombinované pozitivní skóre (z angl. Combined Positivity Score)
CTLA-4	checkpoint (z angl. Cytotoxic T-lymphocyte Associated Protein 4)
DFS	přežití bez recidivy onemocnění (z angl. Disease-Free Survival)
DMFS	přežití bez vzdálených metastáz (z angl. Distant Metastatic-Free Survival)
DSS	nádorově specifické přežití (z angl. Disease-Specific Survival)
HNSCC	skvamózní karcinom hlavy a krku
HR	poměr rizik (z angl. Hazard Ratio), CHR – hrubý, aHR – adjustovaný
IC	imunitní buňky (z angl. Immune Cells)
LRFS	přežití bez lokoregionálního relapsu (z angl. Local Relapse-Free Survival)
NK	NK buňky – (z angl. Natural Killers)
OS	celkové přežití (z angl. Overall Survival)
PD-1	receptor programované smrti (z angl. Programmed death receptor 1)
PD-L1	ligand receptoru programované smrti
SCCA	nádorový marker – antigen skvamózních nádorových buněk
TC	nádorové buňky (z angl. Tumor Cells)
TIL	tumor infiltruující lymfocyty
TME	nádorové mikroprostředí (z angl. Tumor microenvironment)

SOUHRN

Incidence skvamózního karcinomu hlavy a krku (HNSCC) zaznamenává setrvale vzrůstající trend, navzdory známým rizikovým faktorům a primární prevenci tohoto onemocnění. Sekundární prevence je neúčinná, vzhledem k absenci screeningových programů. Terciární prevence je proto oblastí klinického a vědeckého zájmu. V této souvislosti se jeví žádoucí nalezení nových prognostických faktorů, které by mohly přispět ke zlepšení výsledků a cílů terciární prevence. Výzkum v oblasti imuno-onkologie a studium imunitních biomarkerů - ligandu receptoru programované smrti 1 (PD-L1) a tumor infiltrujících lymfocytů (TIL) v nádorovém mikroprostředí (TME) nabízí v tomto ohledu nové perspektivy.

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 pacienti ve věku 18 až 90 let s histologicky verifikovaným HNSCC, indikovaní k definitivní radioterapii nebo radiochemoterapii. 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 PD-L1, 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.

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 významná asociace mezi mírou přežití pacientů a $\geq 10\%$ rozdílem v expresi PD-L1 na imunitních a nádorových buňkách (vysoká exprese PD-L1_{ic}) jak v univariantní tak v multivariantní analýze. Současně byla také potvrzena silná asociace mezi OS a kompozitním biomarkerem vysoká exprese PD-L1_{ic} spolu s mediánem vyššího počtu CD8+ TIL nebo zvýšenou denzitou TIL > 30 %.

Sílu asociace demonstrovaly příslušná 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.

Výsledky této studie prokázaly silný prognostický potenciál imunitních biomarkerů (vysoké PD-L1_{IC} ve spojení se zvýšenou infiltrací a denzitou TIL) u pacientů s pokročilými HNSCC, podstupujících definitivní léčbu radioterapií nebo radiochemoterapií. Metodika hodnocení biomarkerů a použitá definice vysoké exprese PD-L1_{IC} 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 u HNSCC nachází své uplatnění v terciární prevenci pro stratifikaci pacientů do rizikových skupin dle prognózy přežití, čehož by mohlo být využito v optimalizaci dispenzárních protokolů a léčebných postupů.

SUMMARY

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 clinical outcomes and meet the goals of tertiary prevention is desirable. Research in immunooncology and the study of immune biomarkers - programmed death receptor ligand 1 (PD L1) and tumor infiltrating lymphocytes (TIL) in the tumor microenvironment (TME) offers new perspectives in this regard.

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, indicated for definitive radiotherapy and radiochemotherapy. Availability of biopsy samples of tumour tissue in paraffin blocks was required. Immunohistochemical analysis was used to evaluate both immune biomarkers in tumor tissue.

The primary endpoint of the study assessed the association between PD-L1 expression and tumor infiltrating lymphocytes (TIL) 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.

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 ≥ 10 % difference in PD-L1 expression on immune versus tumor cells (high PD-L1_{IC} 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_{IC} expression along with either median-higher CD8+ TIL count or increased TIL density ≥ 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.

The early results of this study demonstrated the strong prognostic potential of both immune biomarkers in patients with advanced HNSCC undergoing definitive radiotherapy and radiochemotherapy. The methodology used for biomarker assessment and definition of high PD-L1IC 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.

1. ÚVOD

Nádory hlavy a krku reprezentují významnou skupinu maligních onemocnění, jejichž incidence má celosvětově vzrůstající trend. Ačkoli byly rizikové faktory, spojené se vznikem těchto nádorů identifikovány a podrobně popsány, cíle primární prevence stále nejsou uspokojivě naplněny. Absence screeningových programů v kombinaci s mnohdy limitní kompliancí rizikových osob, jsou hlavními důvody selhání sekundární prevence. Často jsou proto diagnostikována pokročilá stádia onemocnění.

Terciární prevence se tak stává klíčovou oblastí klinického a vědeckého zájmu. Přestože radikální léčba pokročilých stádií 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.

1.1 Terciární prevence nádorů hlavy a krku

Vzhledem k neuspokojivým výsledkům a nenaplněným cílům primární a sekundární prevence nádorů hlavy a krku je v popředí zájmu terciární prevence onemocnění. Jejím cílem je snížení rizika recidivy onemocnění po radikální léčbě.

Současně také zahrnuje diagnostiku a léčbu recidiv nebo sekundárních malignit. 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. ⁽¹⁾ Právě včasná diagnostika recidivy nebo duplicity významně ovlivňuje možnosti další léčby i prognózu pacientů. 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. ⁽²⁾ V současnosti je proto v klinických studiích zkoumána účinnost nových tkáňových biomarkerů, asociovaných s nádorem v predikci prognózy onemocnění a možnosti jejich použití v terciární prevenci. ⁽³⁾

1.2 Prognóza pacientů s HNSCC

Výsledky radikální léčby se u pacientů s HNSCC liší v závislosti na přítomnosti kombinace několika faktorů, které mohou působit negativním či pozitivním 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 a parametrech přežití pacientů (celkového, nádorově specifického).^(4,5) Obecně je lze dělit na faktory související s charakteristikami pacienta a faktory vztahující se k parametrům nádorového onemocnění.

Aktuální vědecké poznatky v oblasti imunoonkologie však upozorňují na prognostický potenciál nových faktorů souvisejících s vlastnostmi nádorové tkáně, resp. nádorového mikroprostředí (TME). Funkční zapojení imunitních buněk a signálních molekul v TME a jejich interakce s nádorovými elementy mohou poskytnout další cenné informace o prognóze onemocnění.

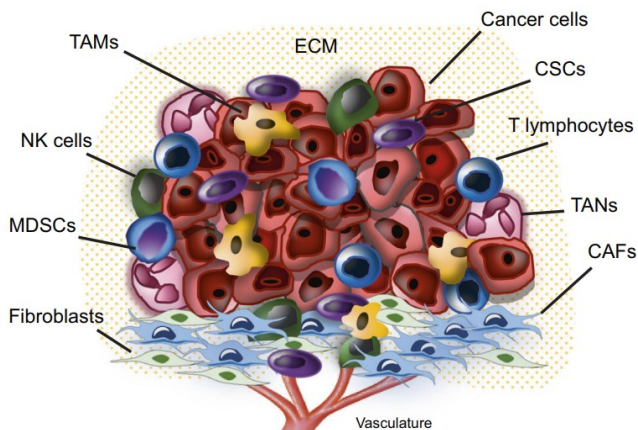
1.3 Role imunitního systému v patogenezi HNSCC

Výzkum nádorového mikroprostředí a jeho charakteristik zdůrazňuje 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.

Imunitní elementy (T-lymfocyty, NK buňky a antigen prezentující buňky) v kombinaci s chemickými substancemi (interleukiny, cytokiny) a signálními molekulami vytváří komplexní interakce s nádorovými buňkami s cílem jejich eliminace. Teorie imunitního dohledu je někdy také nazývána teorií 3E, podle názvu jednotlivých fází imunitní odpovědi ve vztahu k nádorové transformaci a růstu. Jedná se o fáze eliminace, ekvilibria a úniku (escape).^(6,7) 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.

1.4 Nádorové mikroprostředí

Studium imunitních mechanismů v rámci patofyziologie nádorového růstu umožnilo definovat koncept nádorového mikroprostředí (TME).⁽⁸⁾ V uplynulých letech byl tento koncept předmětem preklinického i klinického výzkumu u řady maligních nádorů, včetně HNSCC. Výsledky výzkumu umožnily nahlížet na nádorové onemocnění kromě standardních histomorfologických parametrů také funkčně, v kontextu imunitních interakcí. Koncept TME je definován nádorovým parenchymem, podpůrným stroma s neimunitními buňkami a imunitní komponentou (Obrázek 1).⁽⁹⁾



Obrázek 1: Nádorového mikroprostředí (TME); ECM – extracelulární matrix; TAMs – makrofágy asociované s tumorem; NK cells – NK buňky; MDSCs – supersonové buňky myeloidní řady; Fibroblasts – fibroblasty; CAFs – s nádorem asociované fibroblasty; TANs – s nádorem asociované neutrofilie; T-lymphocytes – T – lymfocyty; CSCs – kmenová nádorové buňky; Cancer cells – nádorové buňky; Vasculature – cévní architektura nádorového mikroprostředí. (Elmusrati et al 2021)

1.5 Imunitní komponenta v 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.

Buněčnou složku imunitní komponenty reprezentuje populace leukocytů s rozdílnými funkcemi a morfologickými charakteristikami. Komplexní interakce mezi těmito 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. Klíčovou úlohu v protinádorové odpovědi zaujímají cytotoxické T-lymfocyty (CD8+). Jejich efekt je dále modulován pomocnými a regulačními lymfocyty (CD4+, FOXP3) a antigen prezentujícími buňkami.

Nebuněčná složka imunitní komponenty je definována skupinou molekul (cytokinů a inhibičních signálních molekul), které v TME zprostředkují komunikaci mezi elementy buněčné složky a podílí se na regulaci průběhu komplexních imunitních interakcí. Zvláštní význam mají inhibiční signální molekuly ze skupiny transmembránových proteinů, které vykazují vysokou afinitu receptorům tzv. kontrolním bodům (checkpointům). V procesu nádorového růstu jsou tyto signální molekuly využívány nádorovými elementy k úniku imunitnímu dohledu. ⁽¹⁰⁾ K nejvýznamnějším molekulám z této skupiny patří ligand a receptor programované smrti 1 (PD-L1, PD-1).

2 CÍLE STUDIE

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

Komplexní interakce mezi nádorovými buňkami (TC) a imunitními elementy (IC) v TME nabízejí nové perspektivy výzkumu, včetně hledání prognostických imunitních biomarkerů. (8, 11) Několik studií prokázalo asociaci mezi zvýšenou infiltrací TIL a příznivými výsledky radikální léčby. (12, 13) V rámci jednotlivých podtypů TIL byl demonstrován dominantní prognostický efekt u varianty CD8+ T-lymfocytů. Tato zjištění byla dále zkoumána a potvrzena v několika metaanalýzách. (14, 15)

Ve skupině inhibičních signálních molekul je nejvíce studován prognostický potenciál PD-L1 exprese. Tento ligand má vysokou vazebnou afinitou k receptoru programované smrti 1 (PD-1) exprimovanému na povrchu T-lymfocytů. Výsledek interakce PD-L1/PD-1 vede k inaktivaci buněk a imunosupresi. (16) Ačkoli byl mechanismus interakce PD-L1/PD-1 detailně popsán, prognostický potenciál exprese PD-L1 u HNSCC zůstává nejasný.

Výsledky klinických studií buď neprokázaly žádný vliv biomarkeru, nebo byly asociovány s horším přežitím. (17, 18, 19) Kromě toho dvě publikované metaanalýzy neprokázaly žádný prognostický potenciál PD-L1 exprese. (20, 21) Přesto výsledky tří studií naznačily potenciální prognostický efekt PD-L1 exprese, pokud byl tento biomarker hodnocen na imunitních buňkách. (22, 23, 24)

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 pacientů s HNSCC.

2.1 Literární přehled a metaanalýza

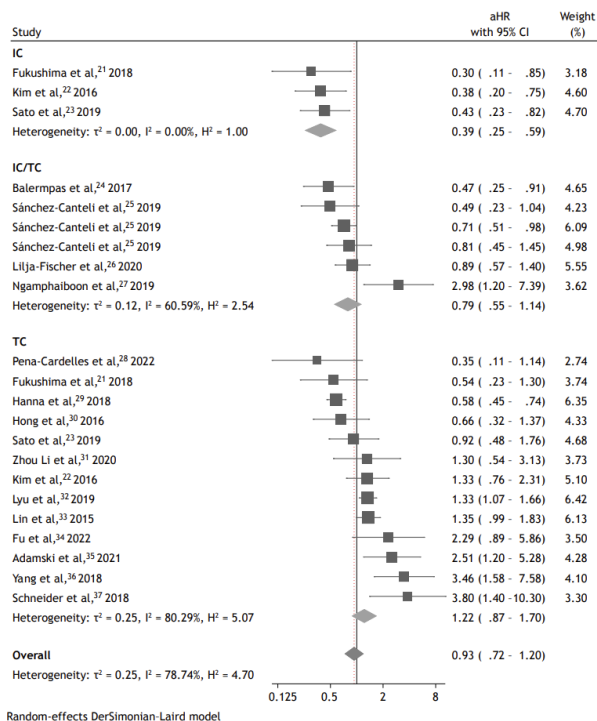
V databázích *MEDLINE*, *Embase*, *PQSciTech* a *HCAPlus* byly systematicky vyhledávány kohortové studie hodnotící prognostický efekt PD-L1 exprese u pacientů s HNSCC v kurativním stadiu onemocnění. Rešerše se soustředila na studie publikované výhradně v angličtině v období od 1. 1. 2010 do 6. 1. 2023.

Kritéria pro zařazení studií zahrnovala: kohortové studie s pacienty s kurativním stádiem onemocnění, 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.

Z celkového počtu 3 825 nalezených publikací splnilo kritéria pro zařazení 17 kohortových studií. Primární cílem studie bylo najít vztah mezi expresí PD-L1 a celkovým přežitím (OS). Pozornost byla věnována typu exprese PD-L1, tj. expresi na nádorových (TC) či imunitních buňkách (IC), případně na obou typech buněk.

Výsledky analýzy prokázaly statisticky významnou asociaci mezi vysokou expresí PD-L1 na imunitních buňkách a 61% snížením rizika úmrtí, jak dokladoval $aHR = 0,39$ (95% CI: 0,25 až 0,59). Navíc pro asociaci nebyl zjištěn vliv lokality nádoru nebo typu primární léčebné modality (tj. operace vs. radioterapie nebo radiochemoterapie). Obrázek 2 zobrazuje stromový graf s prokázanou asociací mezi PD-L1 exprese na IC a OS.

Výsledky metaanalýzy poskytly nový pohled na hodnocení a interpretaci PD-L1 exprese v nádorové tkáni u pacientů s HNSCC. Studie byla publikována v *JAMA Network Open – Oncology*. (25)



Obrázek 2: Stromový graf znázorňující asociaci mezi PD-L1 expresí a celkovým přežitím u pacientů s HNSCC; Výsledky jsou prezentovány z modelu náhodných efektů, včetně τ^2 (rozptyl heterogenity), I^2 (index inkonzistence), H^2 (statistika H) a hodnoty P . aHR, 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.

2.3 Prospektivní kohortová studie

„ONKOL-01-Head and Neck Study“ je monocentrická prospektivní kohortová studie hodnotící prognostický potenciál PD-L1 exprese a TIL u HNSCC pacientů léčených kurativní radioterapií nebo radiochemoterapií. Studie byla zahájena v červnu 2020 na Onkologické klinice FN Ostrava-Poruba. Je registrována v databázi *ClinicalTrials.gov* pod registračním číslem NCT05941676 a byla podpořena institucionálním grantem FN Ostrava – RVO-FNOs/2021.

Primární 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).

2.3.1 Materiály a metody

Do studie byli zařazováni pacienti ve věku 18 až 90 let s histologicky verifikovaným HNSCC, v lokalitách - dutina ústní, orofarynx, larynx a hypofarynx, bez přítomnosti distantních metastáz, indikovaní k definitivní radioterapii nebo radiochemoterapii, s dostupností bioptických vzorků nádorové tkáně.

Přítomnost imunitních biomarkerů byla hodnocena v nádorové tkáni imunohistochemickou analýzou. Tumor infiltrující lymfocyty byly hodnoceny v nádorovém parenchymu počtem pozitivních elementů na 1 mm², určeným pozitivitou protilátek pro CD3, CD4 a CD8. Mediány počtu elementů byly použity jako mezní hodnoty pro rozlišení mezi nízkou a vysokou infiltrací TIL. Dále byl hodnocena denzita TIL semikvantitativním výpočtem (% plochy TIL obsazené CD3+ mononukleárními buňkami v nádorovém parenchymu). Tento způsob hodnocení klasifikoval denzitu TIL infiltrace jako sníženou (< 30 %), nebo zvýšenou (≥ 30 %).^(26, 27) Pozitivita exprese PD-L1, vyjádřená > 1% intenzitou exprese ligandu byla hodnocena v nádorovém parenchymu samostatně na nádorových buňkách (TC) a imunitních buňkách (IC).⁽²⁸⁾ Procentuální rozdíl exprese PD-L1 na IC ve vztahu k TC ≥ 10 % byl klasifikován jako vysoká exprese PD-L1 na imunitních buňkách (PD-L1_c)

Pacienti, 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).

U pacientů s kontraindikací k léčbě standardním protokolem byl preferován hyperfrakcionovaný, nebo akcelerovaný režim radioterapie. ^(29, 30) Skupina pacientů s nádory spodiny dutiny ústní byla léčena dávkově eskalovaným režimem, kombinujícím standardní protokol se se stereotaktickým boostem na přístroji CyberKnife. ⁽³¹⁾

Dispenzarizace pacientů po dokončení léčby probíhala dle standardních doporučení ve spolupráci Onkologické, Otolaryngologické a Stomatologické kliniky FN Ostrava.

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). Kategoriální proměnné byly vyhodnoceny pomocí Fisherova exaktního testu, nebo χ^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, konkomitanti chemoterapii, status očkování proti covidu-19 a bakteriální infekci během léčby. Výsledky byly vyjádřeny pomocí hrubého (cHR), nebo adjustovaného poměru rizik (aHR).

2.3.2 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. 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 %). Z 21 orofaryngeálních karcinomů bylo 15 (71,4 %) HPV pozitivních.

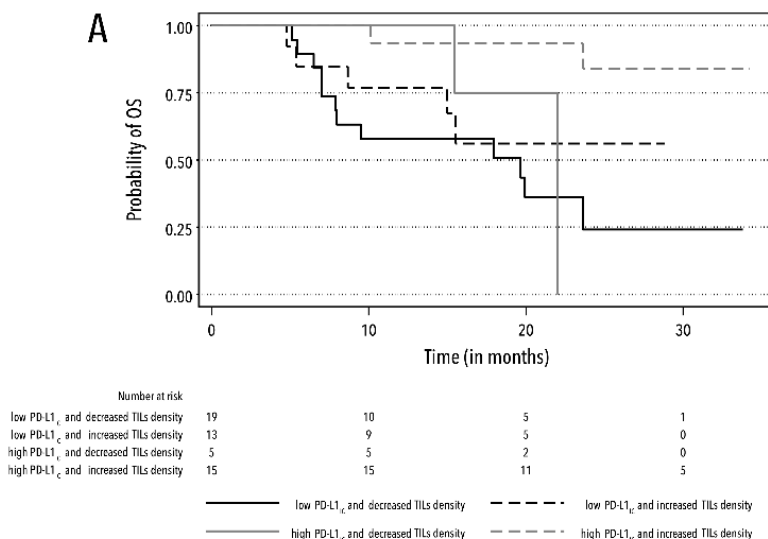
Nejvíce zastoupené bylo klinické stadium IV s 37 (67,2 %) pacienty, následované stádiem III u 17 (31,0 %) pacientů. Celkem 20 (37,78 %) pacientů splnilo kritérium vysoké exprese PD-L1_{IC} a 28 (53,8 %) pacientů vykazovalo vysokou denzitu TIL \geq 30% v nádorovém parenchymu.

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. U 13 (23,6 %) pacientů došlo k lokoregionální recidivě onemocnění a u 10 (18,2 %) pacientů byla diagnostikována metastatická progresse nemoci. Celkem 15 (27,3 %) pacientů zemřelo na následky nádorového onemocnění.

Výsledky univariantní analýzy neprokázaly žádnou významnou asociaci mezi OS nebo DSS a demografickými nebo standardními klinicko-patologickými charakteristikami. Přežití pacientů navíc nebylo ovlivněno podáním konkomitantní chemoterapie ani vyšší aplikované dávky záření při různých frakcionačních režimech radioterapie. Pacienti s vysokou expresí PD-L1 na TC měli kratší DSS a přežití bez známek recidivy (DFS). Naopak vysoká infiltrace CD8+ TIL byla asociována s významným prodloužením OS.

Tento efekt se potvrdil také v multivariantní analýze společně s významným prodloužením OS a DSS u pacientů s vysokou expresí PD-L1_{IC}, definovanou rozdílem hladin IC vůči TC ≥ 10 %. Analýza interakce obou biomarkerů demonstrovala silný efekt této kombinace. Pacienti s vysokou expresí PD-L1_{IC} a vysokou infiltrací CD8+ TIL (určenou hodnotami nad mediánem) nebo zvýšenou densitou TIL vykazovali významné prodloužení parametrů OS a DSS. Adjustované poměry rizik (aHR) pro vysokou expresi PD-L1_{IC} v kombinaci s vysokou CD8+ 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.

Podobně aHR pro vysokou expresi PD-L1_{IC} v kombinaci se zvýšenou denzitou 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 % Tato zjištění byla podpořena Kaplan-Meierovými křivkami (Obrázek 3).



Obrázek 3: Kaplan-Meierovy křivky pro míru OS v závislosti na kombinaci vysoké a nízké PD-L1_{IC} exprese a snížené a zvýšené denzity TIL

2.3.3 Diskuse

Výsledky studie zodpověděly otázku formulované studijními cíli, a prokázaly prognostický efekt obou biomarkerů ve vztahu k primárnímu i sekundárním cílům studie.

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 ve srovnání s předchozími publikovanými retrospektivními studiemi zabývajícími se podobnou problematikou.

Při samostatném hodnocení efektu biomarkerů byla vysoká infiltrace CD8⁺ TIL asociována s lepším celkovým i nádorově specifickým přežitím pacientů. Výsledky tak nepřímo odrážejí cytotoxickou aktivitu CD8⁺ TIL a jejich klíčovou roli v protinádorové imunitní odpovědi. Podobný prognostický vliv na parametry přežití byl prokázán i v případě zvýšené denzity TIL. Tento způsob hodnocení se zdá být přesnější pro odhadovat prognostického potenciálu TIL. Definované mezní hodnoty pro zvýšenou a sníženou denzitu TIL a zohlednění ostatních fenotypů TIL (CD4⁺ a FOXP3) vedle CD8⁺ lymfocytů, poskytuje ucelený obraz o podmínkách v nádorovém mikroprostředí, včetně vzájemných interakcí mezi elementy, které přispívají k celkovým výsledkům.

V případě biomarkeru PD-L1 byla ve studii exprese samostatně na nádorových buňkách (TC) asociována s horší prognózou, tzn. kratším DSS a DFS, podobně jako v jiných studiích.^(20, 32)

Tyto výsledky tak potvrzují teoretické předpoklady o patofyziologickém mechanismu působení exprese PD-L1, kterou nádorové buňky využívají k úniku před imunitním dohledem. ⁽³³⁾ 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_{IC}, definované rozdílem jeho expresí IC a TC $\geq 10\%$. Pacienti s vysokou exprese PD-L1_{IC}, dosáhli významně vyšší míry přežití, včetně OS, DSS, DFS a LRFS. Výsledky tak navazují na předchozí publikované studie ^(22, 23, 24) zabývající se touto problematikou a potvrzují prognostický potenciál exprese PD-L1 na imunitních buňkách, resp. vysoké exprese PD-L1_{IC}. 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.

Klíčovým výstupem studie je zdůraznění role 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, anamnéze kouření, abúzu alkoholu, režimu radioterapie nebo použití konkomitantní chemoterapie.

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. Předpokládáme, že námi navržené prediktory přežití budou stabilní i po delší dobu sledování, i kdyby se jejich prognostický potenciál mohl časem snižovat.

3. ZÁVĚRY

Cíle této studie byly naplněny a podařilo se definovat nové prognostické faktory u pacientů s HNSCC, podstupujících definitivní radioterapii nebo radiochemoterapii. Kombinace imunitních biomarkerů, vysoké exprese PD-L1 na IC a zvýšené denzity TIL se potvrdila jako silný prognostický faktor pro celkové i nádorově specifické přežití. Dříve publikované studie 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 zdůraznily význam metodiky hodnocení obou biomarkerů, především hodnocení denzity TIL a rozdílu expresí PD-L1 na imunitních a nádorových buňkách.

Hodnocení exprese PD-L1 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.

Vzhledem k funkčním charakteristikám a zapojení obou biomarkerů v nádorovém mikroprostředí je optimální hodnotit jejich interakce, tzn. kombinaci obou biomarkerů (PD-L1_{IC} + denzita TIL). Tento způsob hodnocení poskytuje nejpřesnější výsledky. Metodika hodnocení, použitá v naší 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.

Výsledky studie poskytují nový náhled na možnosti terciární prevence HNSCC. Vyšetření imunoprofilu nádoru 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.

4. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Ng SP, Pollard C, Kamal M, Ayoub Z, Garden AS, Bahig H, Gunn GB, Frank SJ, Skinner HD, Phan J, et al. Risk of second primary malignancies in head and neck cancer patients treated with definitive radiotherapy. *npj Precis Onc* (2019) 3:22. doi: 10.1038/s41698-019-0097-y
2. Simo R, Homer J, Clarke P, Mackenzie K, Paleri V, Pracy P, Roland N. Follow-up after treatment for head and neck cancer: United Kingdom National Multidisciplinary Guidelines. *J Laryngol Otol* (2016) 130:S208–S211. doi: 10.1017/S0022215116000645
3. Nguyen N, Bellile E, Thomas D, McHugh J, Rozek L, Virani S, Peterson L, Carey TE, Walline H, Moyer J, et al. Tumor infiltrating lymphocytes and survival in patients with head and neck squamous cell carcinoma: Tumor infiltrating lymphocytes. *Head Neck* (2016) 38:1074–1084. doi: 10.1002/hed.24406
4. Dittberner A, Friedl B, Wittig A, Buentzel J, Kaftan H, Boeger D, Mueller AH, Schultze-Mosgau S, Schlattmann P, Ernst T, 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 (Basel)* (2020) 12:3418. doi: 10.3390/cancers12113418
5. Cadoni G, Giralidi L, Petrelli L, Pandolfini M, Giuliani M, Paludetti G, Pastorino R, Leoncini E, Arzani D, Almadori G, et al. Prognostic factors in head and neck cancer: a 10-year retrospective analysis in a single-institution in Italy. *Acta Otorhinolaryngol Ital* (2017) 37:458–466. doi: 10.14639/0392-100X-1246
6. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The Three Es of Cancer Immunoediting. *Annu Rev Immunol* (2004) 22:329–360. doi: 10.1146/annurev.immunol.22.012703.104803
7. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The Immunobiology of Cancer Immunosurveillance and Immunoediting. *Immunity* (2004) 21:137–148. doi: 10.1016/j.immuni.2004.07.017
8. Balkwill FR, Capasso M, Hagemann T. The tumor microenvironment at a glance. *Journal of Cell Science* (2012) 125:5591–5596. doi: 10.1242/jcs.116392
9. 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

10. He X, Xu C. Immune checkpoint signaling and cancer immunotherapy. *Cell Res* (2020) 30:660–669. doi: 10.1038/s41422-020-0343-4
11. Binnewies M, Roberts EW, Kersten K, Chan V, Fearon DF, Merad M, Coussens LM, Gabrilovich DI, Ostrand-Rosenberg S, Hedrick CC, et al. Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. *Nat Med* (2018) 24:541–550. doi: 10.1038/s41591-018-0014-x
12. Ward MJ, Thirdborough SM, Mellows T, Riley C, Harris S, Suchak K, Webb A, Hampton C, Patel NN, Randall CJ, 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
13. 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
14. Borsetto D, Tomasoni M, Payne K, Polesel J, Deganello A, Bossi P, Tysome JR, Masterson L, Tirelli G, Tofanelli M, 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
15. 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
16. Alsaab HO, Sau S, Alzhrani R, Tatiparti K, Bhise K, Kashaw SK, Iyer AK. 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
17. Lin Y-M, Sung W-W, Hsieh M-J, Tsai S-C, Lai H-W, Yang S-M, Shen K-H, Chen M-K, Lee H, Yeh K-T, 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
18. Adamski ŁJ, Starzyńska A, Adamska P, Kunc M, Sakowicz-Burkiewicz M, Marvaso G, Alterio D, Korwat A, Jereczek-Fossa BA, Pęksa R. 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

19. 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
20. 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 Oncology* (2018) 86:81–90. doi: 10.1016/j.oraloncology.2018.09.016
21. Troiano G, Caponio VCA, Zhurakivska K, Arena C, Pannone G, Mascitti M, Santarelli A, Lo Muzio L. 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 Proliferation* (2019) 52:e12537. doi: 10.1111/cpr.12537
22. Fukushima Y, Someya M, Nakata K, Hori M, Kitagawa M, Hasegawa T, Tsuchiya T, Gocho T, Ikeda H, Hirohashi Y, et al. Influence of PD-L1 expression in immune cells on the response to radiation therapy in patients with oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Radiotherapy and Oncology* (2018) 129:409–414. doi: 10.1016/j.radonc.2018.08.023
23. Kim HR, Ha S-J, Hong MH, Heo SJ, Koh YW, Choi EC, Kim EK, Pyo KH, Jung I, Seo D, 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
24. Sato F, Ono T, Kawahara A, Kawaguchi T, Tanaka H, Shimamatsu K, Kakuma T, Akiba J, Umeno H, Yano H. Prognostic impact of p16 and PD-L1 expression in patients with oropharyngeal squamous cell carcinoma receiving a definitive treatment. *J Clin Pathol* (2019) 72:542–549. doi: 10.1136/jclinpath-2019-205818
25. 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
26. Spector ME, Bellile E, Amlani L, Zarins K, Smith J, Brenner JC, Rozek L, Nguyen A, Thomas D, McHugh JB, 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

27. Hendry S, Salgado R, Gevaert T, Russell PA, John T, Thapa B, Christie M, van de Vijver K, Estrada MV, Gonzalez-Ericsson PI, et al. Assessing Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Solid Tumors: A Practical Review for Pathologists and Proposal for a Standardized Method from the International Immunology 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) 24:311–335. doi: 10.1097/PAP.000000000000161
28. Ono T, Azuma K, Kawahara A, Kakuma T, Sato F, Akiba J, Tanaka N, Abe T, Chitose S, Umeno H. 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) 42:3518–3530. doi: 10.1002/hed.26416
29. Cvek J, Kubes J, Skacelikova E, Otahal B, Kominek P, Halamka M, Fekl D. 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) 188:666–670. doi: 10.1007/s00066-012-0128-x
30. Lacas B, Bourhis J, Overgaard J, Zhang Q, Grégoire V, Nankivell M, Zackrisson B, Szutkowski Z, Suwiński R, Poulsen M, et al. Role of radiotherapy fractionation in head and neck cancers (MARCH): an updated meta-analysis. *Lancet Oncol* (2017) 18:1221–1237. doi: 10.1016/S1470-2045(17)30458-8
31. Blažek T, Zdeňblová Čermáková Z, Knybel L, Hurník P, Štembírek J, Resová K, Paračková T, Formánek M, Cvek J, Soumarová R. 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. 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
33. 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

5. SEZNAM PUBLIKACÍ DOKTORANDA

Publikace *in extenso*, které jsou podkladem disertace

a) s IF

1. 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. (IF – 3,5)

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. (IF – 13,3)

3. 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. (IF – 3,6)

Publikace *in extenso* bez vztahu k tématu disertace

a) s IF

1. Knybel L, Cvek J, Blazek T. *et al.* Prostate deformation during hypofractionated radiotherapy: an analysis of implanted fiducial marker displacement. *Radiat Oncol* 2021;16:235. (IF – 3,6)

2. Cvek J, Knybel L, Reguli S, Lipina R, Hanzlíková P, Silhan P, Resova K, Blazek T, Palicka M, Feltl D. Stereotactic radiotherapy for spinal hemangioblastoma – disease control and volume analysis in long-term follow up. *Rep Pract Oncol Rdiother* (2022) 27:134-141.

3. Zděblová Čermáková Z, Hurník P, Konvalinka D, et al. HPV and RAD51 as Prognostic Factors for Survival in Inoperable Oral and Oropharyngeal Cancer in Patients Unfit for Chemotherapy Treated with Hyperfractionated Radiotherapy. *Medicina (Mex)* 2023; 59: 361. (IF – 2,4)

4. Hurník P, Režnarová J, Chyra Z, et al. Enhancing oral squamous cell carcinoma prediction: the prognostic power of the worst pattern of invasion and the limited impact of molecular resection margins. *Front Oncol* 2023; 13: 1287650. (IF – 3,5)

5. Dolezel M, Slavik M, Blazek T et al. FMISO-Based Adaptive Radiotherapy in Head and Neck Cancer. *JPM* (2022) 12:1245. (IF – 3,0)

b) bez IF

1. Soumarová R, Kubecová M a kolektiv. *Onkologie: Učební text pro studenty 3. LF UK*. 2. zcela přepracované vydání, Praha Univerzita Karlova, 3. lékařská fakulta, Radioterapeutická a onkologická klinika 3. LF a FNKV 2019. 208 s. – vybrané kapitoly

2. Blažek T. Radioterapie mozkových metastáz v éře cílené terapie a imunoterapie. *Onkol Revue* 2020;7(Spec. vyd.):1–6.

3. Blažek T. Studie LATITUDE a současné perspektivy v léčbě metastazujícího, hormonálně senzitivního karcinomu prostaty. *Onkol Revue* 2020;7(1):1–5.

4. Blažek T, Jackaninová J, Soumarová R. Možnosti systémové terapie nádorů hlavy a krku. *Onkologická revue* 2021; 8 (3) : 1-8

5. Blažek T, Soumarová R. Nové možnosti léčby uroteliálního karcinomu močového měchýře v éře imunoterapie. *Onkol Revue* 2021;8(5):1–7

6. Cvek J, Halámka M. *Onkologie pro neoncology: pro pregraduální studium a praktické lékaře*. 1.vydání. Praha: Grada Publishing. (2023) – vybrané kapitoly v knize

7. Čelakovský P, Matoušek P. *Epistaxe*. 1. vydání. Chrobok V, editor. Havlíčkův Brod: Tobiáš. (2023). – vybraná kapitola v knize
8. Ptašínský M, Ostárek T, Kuldan R, Blažek T. Rare finding of primary adenocarcinoma of the urinary bladder. *Urolog pro Praxi* (2024) 25:49–51.