



Lékařská fakulta
Univerzity Palackého
v Olomouci



Vážený pan
Prof. MUDr. Jiří Mandřák, Ph.D.
Děkan
Lékařská fakulta v Hradci Králové
Univerzita Karlova

Věc: Oponentský posudek disertační práce MUDr. Pavla Vodárka

V Olomouci dne 27. 2. 2023

Spectabilis vážený pane děkane,

k oponentuře mi byla předložena disertační práce MUDr. Pavla Vodárka, studenta doktorského studijního programu Vnitřní nemoci, vypracovaná na IV. interní hematologické klinice FN a LF v Hradci Králové pod vedením školitele doc. MUDr. Davida Belady, Ph.D. na téma „Komplexní hodnocení imunitních defektů u nemocných s chronickou lymfocytární leukémií“.

Struktura práce je koncipována standardně, čítá 112 stran rozdělených mezi 11 kapitol, spis obsahuje 20 tabulek, 18 obrázků a uvedeno je 211 vhodně zvolených literárních odkazů.

Doktorand si ve své práci vytkl následujících cíle:

1. Analyzovat odlišnosti parametrů buněčné a humorální imunity mezi dosud neléčenými nemocnými s indolentní, k léčbě neindikované chronické lymfocytární leukémie (CLL), a progredující, k léčbě indikované CLL
2. Porovnat analyzované parametry nemocných s CLL se zdravými kontrolami



3. Posoudit změny vyšetřovaných parametrů u léčených pacientů vlivem 1. linie terapie pomocí chemoimunoterapie (CHIT)
4. Zhodnotit, zda zkoumané parametry imunitních funkcí nebo jejich změny po léčbě u pacientů s CLL mají souvislost s frekvencí infekčních komplikací
5. Popsat prognostický význam těchto parametrů a souvislost s běžně vyšetřovanými prognostickými ukazateli

Práce byla koncipována jako unicentrická observační studie, do které byli zařazeni pacienti s CLL sledovaní a případně léčení na IV. interní hematologické klinice Fakultní nemocnice v Hradci Králové od září 2013 do listopadu 2020. Celkem bylo zařazeno 129 pacientů, celkem 45 nemocných mělo v době zařazení neaktivní chorobu bez nutnosti zahájení terapie. 84 nemocných mělo v době zařazení aktivní onemocnění dle mezinárodních kritérií (iwCLL) s indikací k zahájení protinádorové léčby. Opakovaný odběr po léčbě proběhl u 58 sledovaných nemocných. Doktorand dále uvádí, že kontrolní skupinu pro vyšetření buněčných populací tvořilo 34 zdravých dárců krve odebraných na transfúzní stanici (medián věku 60 let; rozpětí 43-67), z nichž bylo 56 % mužů.

Jádrem metodiky komplexního hodnocení imunitních defektů u pacientů s CLL bylo měření absolutních a relativních počtů celkových T-ly, CD4+ T-ly, CD8+ T-ly, CD4+CD8+ T-ly, CD4-CD8- T-ly, celkových B-ly, klonálních B-ly, polyklonálních B-ly, T-reg, NK buněk a NKT buněk pomocí průtokové cytometrie. Dále byly v rámci CD4+ i CD8+ kompartmentu hodnoceny absolutní i relativní počty jednotlivých subpopulací, tedy naivních T-ly, TCM, TEM a TEMRA buněk. Sérové koncentrace IgG, podtříd IgG1-4, IgA, podtříd IgA1-2 a IgM pak byly změřeny imunonefelometricky pomocí komerčně dodávaného kitu. U všech pacientů byla provedena elektroforéza sérových bílkovin a v případě detekce vrcholu v y oblasti byla doplněna imunofixace k vyloučení přítomnosti případného paraproteinu. Doktorand dále u pacientů hodnotil zvyklá data vztahující se k základnímu onemocnění - krevní obraz a stádium dle Raie v době odběru krve, data o infekčních komplikacích,



mutační stav *IGHV*, přítomnost mutace genu *TP53* vedoucí k jeho dysfunkci (vyšetřováno Sangerovou sekvenací), data o chromozomálních aberacích (vyšetřováno stimulovaným karyotypem a fluorescenční in situ hybridizací [FISH]) a data o léčebné odpovědi. Dále bylo evidováno datum poslední kontroly, případně zahájení následující léčby a úmrtí. Na základě těchto dat pak byly vypočítány intervaly do zahájení jakékoliv protinádorové léčby léčby (TTFT) a délka celkového přežití (OS) u nemocných s neaktivní chorobou, kteří nebyli léčeni, a doba do zahájení další léčby (TTNT) a OS u nemocných s progredující chorobou, indikovaných k léčbě.

Statistická analýza byla provedena dle předem zvolené standardní metodiky, všechny hypotézy byly testovány na hladině významnosti 0,05.

Cíle, které si doktorand vytknul, byly v jeho práci splněny.

1. Doktorand potvrdil, že nemocní s progredující chorobou měli výrazně nižší koncentrace všech tříd i podtříd imunoglobulinů (Ig), než nemocní s neaktivní chorobou. Při studiu parametrů buněčné imunity zjistil, že progredující nemocní měli vyšší absolutní počet buněk ve všech hlavních populacích (CD4+ TCM, CD4+ TEM, CD8+ TCM, CD8+ TEM a CD8+ TEMRA) kromě polyklonálních B-ly, CD4+CD8+ T-ly, NK a NKT buněk.

2. Při srovnání analyzovaných parametrů nemocných s CLL se zdravými kontrolami nenalezl doktorand statisticky významně odlišný medián poměrů CD4+:CD8+ T-ly zdravých kontrol od nemocných s neaktivní chorobou, a ani od nemocných s progredující chorobou. Dále popsal, že absolutní počty hlavních buněčných populací (s výjimkou CD4+CD8+ T-ly a polyklonálních B-ly) byly u nemocných s neaktivní chorobou naopak statisticky významně vyšší než u kontrol. Co se týče funkčních subpopulací, měli nemocní s neaktivní chorobou ve srovnání s kontrolami statisticky významně vyšší relativní počet CD4+ TCM a absolutní počty CD4+ TCM, CD8+ TCM a CD8+ TEMRA. Obdobné, nicméně ještě výraznější byly popsány rozdíly mezi nemocnými s progredující chorobou a kontrolami.

3. Při srovnání hodnot Ig před a po léčbě (CHIT) doktorand uvádí, že jedinou statisticky významnou změnou byl vzestup hladiny IgA. Při bližší analýze pak našel statisticky



významné změny pouze ve skupině léčené režimem FCR (vzestupu IgA, IgG2, IgA1). Změny po režimu BR a chlorambucilových režimech nedosáhly statistické významnosti. Z pohledu změn všech hodnocených buněčných populací jejich absolutní počty statisticky významně poklesly, a kromě CD4+ TEM a CD8+ TEM byl pokles hodnot po léčbě dokonce pod úroveň pozorovanou u nemocných s neaktivní chorobou. Relativní zastoupení funkčních subpopulací se změnilo ve prospěch TEM buněk na úkor naivních a TCM buněk v CD4+ i CD8+ kompartmentu.

4. Doktorand nenalezl mezi nemocnými s a bez infekce statisticky významný rozdíl v koncentracích Ig, a to jak u skupiny nemocných s neaktivní, ta i progredující chorobou. Pacienti s neaktivní chorobou, kteří prodělali infekci, měli statisticky významně vyšší absolutní počet klonálních B-ly, vyšší relativní počet klonálních B-ly, nižší relativní počet polyklonálních B-ly, NK buněk a CD4+ T-ly. U nemocných s progredující chorobou s infekcemi a bez infekcí v anamnéze byly nalezeno pouze nižší zastoupení naivních CD4+ T-ly a vyšší absolutní počet CD8+ TEM.

5. Z hlediska souvislosti hladin imunoglobulinů a vybraných prognostických ukazatelů byli zvláště hodnoceni pacienti s neaktivní chorobou (zde výrazné rozdíly nalezeny nebyly) a nemocní s progredující CLL. U této podskupiny doktorand zjistil, že pacienti s nemutovanými *IGHV* mají vyšší koncentrace IgG, IgM a IgG1. Dále našel vyšší koncentrace IgA a IgA1 u pacientů s mutací genu *TP53* a / nebo delecí 17p. Pacienti s progredující CLL a přítomnou delecí 17p a / nebo delecí 11q měli vyšší koncentrace IgG, IgM, IgG1 a IgG3. V další části práce pak doktorand obdobně popsal rozdíly v zastoupení zkoumaných buněčných populací u obou skupin pacientů.

V kapitole diskuze pak doktorand své výsledky porovnává s údaji světového písemnictví, jednotlivé nálezy a jejich význam fundovaně komentuje, upozorňuje na důležitě, nové či dokonce prioritní pozorování svého výzkumu (vzestup IgA po CHIT). Doktorand upozorňuje na to, že na řadu otázek je třeba ještě dále hledat odpovědi, formuluje některé hypotézy pro další výzkum a je si zároveň vědom limitů analýzy svého souboru. To vše



dokladuje jeho detailní a dlouhodobé studium této problematiky a jeho neoddiskutovatelné znalosti v oblasti imunitních poruch spojených s CLL.

Pokud výše uvedené shrnu, pak:

- a. Je předložená práce zvolena na důležité a aktuální téma, které bude jistě předmětem dalšího vědeckého studia i v éře cílené léčby CLL režimy bez použití chemoterapie
- b. zvolené metody zpracování disertace jsou na velmi dobré úrovni, data jsou shrnuta do tabulek a grafů s adekvátní statistickou analýzou
- c. výsledky disertace přinášejí nové, v některých ohledech dosud nepublikované poznatky, studovaná problematika má význam pro rozvoj vědního oboru, a i do budoucna má ambici být přínosem pro aplikaci do rutinní klinické praxe
- d. vytčené cíle práce byly splněny
- e. k předložené práci mám následující dotazy:

Které zde uvedené parametry bude užitečné sledovat v klinické praxi v éře cílené léčby inhibitory buněčných drah?

Dnes se diskutuje otázka účelnosti kombinace těchto inhibitorů s monoklonálními protilátkami (nejčastěji anti-CD20). Jaký je Váš pohled, zejména pokud se jedná o aspekt ovlivnění parametrů imunitních funkcí protilátkami?

Předložený spis splňuje nároky kladené na disertační práci, doktorand má předpoklady k samostatné tvůrčí a vědecké činnosti, a proto doporučuji předloženou disertační práci jako podklad k obhajobě podle paragrafu 47 VŠ zákona 111/98 Sb.

S kolegiálním pozdravem,

Prof. MUDr. Tomáš Papajík, CSc.

Hemato-onkologická klinika FNOL a LF UP v Olomouci