

**Univerzita Karlova**

**1. lékařská fakulta**

**as. MUDr. Jan Bouček, Ph.D.**

**Habilitační práce**

**Praha 2016**

Habilitační práce

**Rozdíly v imunitní odpovědi u pacientů  
s dlaždicobuněčným karcinomem hlavy  
a krku v závislosti na etiologii**

as. MUDr. Jan Bouček, Ph.D.

**Klinika otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku  
1. LF UK a FN v Motole**

**Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i.**

**Praha 2016**

Úvodem bych rád poděkoval těm, kteří nejvíce ovlivnili můj dosavadní profesní život:

Prof. RNDr. Blanka Říhová, DrSc., která vedla jak mé první skutečné výzkumné krůčky, tak přede mnou otevřela vědecký svět oboru protinádorové imunologie.

Prof. MUDr. Jan Betka, DrSc., který byl mým učitelem - klinikem a umožnil mi poznat obor otorinolaryngologie v celé šíři a kráse. Zároveň mi byl vzorem a inspirací ve spojení skvělého odborníka a vlídného a lidského lékaře.

Dále bych rád poděkoval a v chronologickém pořadí jmenoval ty, se kterými jsem se v rámci profesní spolupráce setkal: prof. MUDr. Karel Smetana, DrSc., prof. MUDr. Jan Plzák, Ph.D., prof. MUDr. Tomáš Eckschlager, CSc., as.MUDr. Michal Zábrodský, prof. MUDr. Radek Špíšek, Ph.D., RNDr. Ruth Tachezy, Ph.D.

Práce by nevznikla bez podpory a nezměrné tolerance mé manželky Petry a dětí a bez celoživotně pevného a stabilního zázemí ze strany mých rodičů a sestry. Rád bych jim tímto poděkoval.

Jan Bouček

# Obsah

1. Úvod	2
2. Přehled současné problematiky	3
2.1.    Dlaždicobuněčné karcinomy hlavy a krku	3
2.1.1. Epidemiologie a rizikové faktory	3
2.1.2. Patogeneze	5
2.1.3. Diagnostika a klinická klasifikace	7
2.1.4. Terapeutické možnosti	12
2.2.    Imunitní systém	16
2.2.1. Mechanismy protinádorové ochrany	17
2.2.2. Působení imunitního systému ve prospěch nádorů	20
2.2.3. Principy nádorové imunoterapie	30
3. Cíle práce	36
4. Přehled metodiky	37
5. Souhrn výsledků	39
6. Diskuze	45
7. Závěr	49
8. Literatura	51
9. Příloha – soubor publikací autora k tématu habilitační práce	63

# 1. Úvod

Dlaždicobuněčné nádory hlavy a krku (**HNSCC** - Head and Neck Squamous Cell Carcinoma) patří k nejčastěji diagnostikovaným malignitám. Celosvětově jsou šestým nejfrekventovanějším zhoubným nádorovým onemocněním [1], což čítá více než 500 tisíc nemocných každý rok. Přibližně 3/5 pacientů v souvislosti s tímto onemocněním každoročně zemře [2]. Prognóza pacienta záleží zejména na stádiu, ve kterém byl nádor diagnostikován, na lokalitě a etiologii, samozřejmě se významně liší i geograficky dle dostupnosti a kvality léčby. V západních zemích je u pacientů diagnostikovaných ve stádiu I a II pravděpodobnost pětiletého přežití 70 – 90%, u stádií III a IV naopak nedosahuje ani 40% [3]. Léčebné výsledky se v posledních 20 - 30 letech mění velmi pozvolna. Zásadní změnu nepřinesly ani veškeré pokroky v chirurgické a onkologické léčbě, ani kombinace více terapeutických modalit. Pro zlepšení léčebných výsledků je nutné ještě detailnější porozumění biologii a molekulární patofyziologii nádorového onemocnění a pochopení vztahů s okolním stromatem a imunitním systémem. Nových poznatků o molekulárních mechanismech onkogeneze a o interakcích mezi imunitním systémem a nádorovým onemocněním stále přibývá. Jejich využití pro cílené terapeutické ovlivnění, optimálně na více úrovních, by mělo přinést očekávaný zlom do klinické praxe onkologie hlavy a krku.

## **2. Přehled současné problematiky**

### 2.1. Dlaždicobuněčné karcinomy hlavy a krku

Karcinomy hlavy a krku jsou zhoubné epitelální nádory postihující dutinu ústní, hltan, hrtan, nosní a paranazální dutiny, nosohltan, ucho, slinné žlázy a štítnou žlázu a zahrnují celou řadu histopatologických typů. Na sliznicích horních dýchacích a polykacích cest se nejčastěji setkáváme s dlaždicobuněčným karcinomem (HNSCC - Head and Neck Squamous Cell Carcinoma), zahrnujícím až 95% případů. Z klinického hlediska se jedná o lokálně agresivní nádory, metastazující lymfogenně do spádových krčních lymfatických uzlin, v závislosti na lokalitě diagnostikované většinou v pokročilejším stádiu.

#### 2.1.1. Epidemiologie a rizikové faktory

Incidence a primární lokalizace HNSCC se geograficky velmi liší, v závislosti na výskytu rizikových faktorů, kterými jsou kouření, konzumace alkoholu, HPV infekce, žvýkání tabáku, ale i etnické a genetické rozdílnosti v různých populacích. Stále platí, že největší výskyt HNSCC je u mužů v pátém a šestém decénium, ale postupně se zvyšuje i zastoupení žen (s rostoucím procentem kouřících žen). Pro některé lokalizace se nejvýznamnějším rizikovým faktorem stala infekce lidským papillomavirem (HPV), která zapříčiňuje narůstající procento pacientů s orofaryngeálním HNSCC v populaci zejména mladých nekuřáků, častěji mužů, bělochů [4].

Užívání tabáku (kouření i žvýkání) je stále považováno za hlavní rizikový faktor pro rozvoj HNSCC pro většinu lokalit. Jsou práce prokazující genetickou predispozici podmiňující větší vnímavost ke karcinogennímu působení tabáku [5]. Zároveň je prokázáno, že karcinogenní působení tabáku a alkoholu se vzájemně potencují. Opakovaná expozice sliznic horních dýchacích a polykacích cest k působení tabáku, alkoholu nebo kombinace obou faktorů, mohou vést ke vzniku vícečetných ložisek primárního nádoru nebo vzniku dalšího nádoru v jiné lokalitě. Tento fenomén je nazýván jako plošná kancerizace (field cancerization) [6, 7].

HPV je prokázaným rizikovým faktorem vzniku HNSCC v orofaryngu. Infekce lidským papillovirem je sexuálně přenosné onemocnění, postihující cervix, orofarynx, vulvu, konečník a penis. Více než 130 typů HPV se dle maligního potenciálu rozděluje na low- a high-risk typy, asi 15 z nich vykazuje onkogenní potenciál. Význam HPV pro anogenitální nádory byl znám již poměrně dlouho. Za objasnění významu HPV pro vznik karcinomu děložního hrdla získal německý virolog Harald zur Hausen v roce 2008 Nobelovu cenu za fyziologii a lékařství [8]. V onkologii hlavy a krku se ale souvislost prokazuje až v posledních přibližně 15 letech [9, 10]. U orofaryngeálních karcinomů dominuje HPV 16. U nádorů tonzil a kořene jazyka je hlavním etiologickým faktorem, přibližně 50% těchto nádorů je prokazatelně způsobeno přítomností HPV (literární údaje se pohybují v rozmezí od 10 do 90%, v závislosti na populaci) [11-13]. V Evropě je procento orofaryngeálních nádorů způsobených HPV nejvyšší ve Skandinávii (až 90%), naopak v zemích s vysokým zastoupením kuřáků v populaci, například v Itálii, je nižší než 20% [11]. HPV je zodpovědný za vznik onemocnění u mladších jedinců, častěji mužů, bělochů, klinicky zahrnuje nádory pokročilejších stádií, s menším primárním nádorem, ale větším metastatickým postižením krčních uzlin [4, 14]. Virus HPV využívá řady mechanismů, kterými je schopen se vyhnout pozornosti imunitního systému a vyvolat perzistující infekci, nezbytnou pro vznik nádorového onemocnění. HPV infikuje keratinocyty, které pouze minimálně exprimují virové proteiny a nedochází k rozpadu infikovaných buněk. HPV tedy neposkytuje imunitnímu systému hostitele tzv. signály nebezpečí, nutné k zahájení účinné imunitní odpovědi. Virus HPV se nešíří krví, do kontaktu s imunitním systémem se dostává pouze malé množství viru z napadených buněk. HPV dokáže také potlačit expresi MHC gp I. třídy nebo transportéru pro antigenní peptidy (TAP) [15].

Rutinní HPV detekce u nádorů orofaryngu je součástí moderních klinických doporučených postupů. Nejvyšší prognostická významnost byla prokázána pro detekci transkripčně aktivní virové infekce pomocí HPV mRNA (nejčastěji HPV16 E6 mRNA) [14]. Ke spolehlivé detekci HPV by mělo být kombinováno více metod. V současnosti je používána klasická PCR k detekci HPV DNA, RT-PCR kvantifikující virovou nálož nebo detekující transkripčně aktivní virovou infekci pomocí E6/E7 mRNA, typově specifická DNA in-situ hybridizace, detekce sérových protilátek proti virovým onkoproteinům E6/E7 nebo imunohistochemická detekce p16 (inhibitoru cyclin-dependentní kinázy p16ink4a, tumor supresorového proteinu). Jako standard pro určení podílu HPV na vzniku orofaryngeálního karcinomu je doporučována

imunohistochemická detekce p16 (velmi silně korelující s HPV statutem) v kombinaci s PCR detekcí HPV DNA a s mRNA E6 HPV16 [16]. Pacienti s HPV asociovaným nádorem mají lepší prognózu než pacienti, u kterých se na vzniku podílejí kouření a alkohol [17, 18]. Nicméně zatím není zřejmé, zda prokázání souvislosti vzniku nádoru s HPV by mohlo umožnit změnu typu léčby nebo snížení její intenzity. Tato otázka je nyní velmi pečlivě vědecky hodnocena, ale doposud není jednoznačně vyřešena. Se změnou klinických doporučení se čeká na výsledky prospektivních studií, které nyní probíhají a výsledky se očekávají v průběhu let 2018 -2022 (clinical trials: NCT01874171, NCT01855451, NCT02281955, NCT01969877) [19].

V různých zemích se mohou dále uplatňovat odlišné etiologické faktory, jako jsou další virové infekce (EBV), žvýkání betelu, expozice radiačnímu záření, nedostatek vitamínů, zubní problémy, charakter mikrobiomu ústní dutiny, imunosupresivní léčba a jiné faktory prostředí či pracovní expozice.

### 2.1.2. Patogeneze

Patogeneze HNSCC se významně liší v závislosti na etiologii, rozdíly jsou patrné v klinickém průběhu onemocnění. Rozdíly je možné detekovat i na úrovni genetických mutací a změn signálních drah. Velký posun znamenalo zavedení techniky sekvenace celého genomu, respektive všech exonů (whole-exome sequencing), první práce u HNSCC byla publikována v roce 2011 [20].

Expozice sliznic horních dýchacích a polykacích cest klasickým karcinogenům jako jsou kouření a alkohol vede k postupnému hromadění genetických změn. Změny se na sliznicích projevují jako jednotlivé stupně dysplazie a přechází přes stádium „*carcinoma in situ*“ až po invazivní karcinom [6]. Téměř vždy je mutován gen *TP53*, který kóduje p53 protein, onkosupresorový protein, někdy nazývaný i jako „strážce genomu“. Jeho množství se za fyziologických podmínek začíná zvyšovat v odpovědi na stresové stimuly nebo v případě poškození DNA. Nahromadění p53 vede k zastavení buněčného cyklu a umožní opravu DNA nebo spustí signální kaskády vedoucí k apoptóze. Většina mutací *TP53* je tzv. missence mutace, kdy vzniká stabilní protein, ale s poškozenou vazebnou strukturou. Vyšší výskyt mutací p53 způsobuje snížení celkového přežívání u pacientů s HNSCC a koreluje se zvýšeným výskytem loko-regionálních rekurencí a menší citlivostí na terapii [21, 22]. Druhá nejčastěji popisovaná

genetická změna u HPV negativních HNSCC je mutace tumor supresorového genu *CDKN2A* (gen pro inhibitor cyklin-dependentní kinázy 2A), který bývá zasažen u zhruba 10 – 12% nádorů. Alternativním sestřihem vznikají dva proteiny (p14ARF a p16INK4A) negativně ovlivňující funkci p53, zasahující do regulace buněčného cyklu a zvyšující růstový potenciál nádorových buněk.

Spektrum nacházených genetických změn je u HPV pozitivních nádorů naopak podstatně menší. U 6 až 21% HPV pozitivních HNSCC je detekována změna *PIK3CA* (katalytické podjednotky phosphatidylinositol 3-kinázy) [23]. *PIK3* je součástí signalizační dráhy aktivované vazbou ligandu na povrchový membránový receptor, například pro *EGFR* (receptor pro epidermální růstový faktor). Množství mutovaného *PI3K* přímo koreluje s vyšším stádiem HNSCC, potencuje buněčný růst a proliferaci a naopak inhibuje apoptózu. Další genetickou změnou nacházenou zejména v HPV pozitivních HNSCC je mutace *TRAF3* (TNF receptor-associated factor 3), který je součástí přirozené i adaptivní protivirové imunitní reakce (HPV, EBV, HIV) a jeho inaktivace vede ke zvýšení NF- $\kappa$ B signalizace a inhibici apoptózy. Poslední častou genetickou změnou u HPV pozitivních HNSCC je amplifikace genu *E2F1*, transkripčního faktoru aktivujícího buněčný cyklus.

Genetická podstata HPV pozitivních a negativních HNSCC se promítá do biologických a funkčních odlišností a spočívá zejména v zvýšené degradaci p53, inaktivaci dráhy pRb (retinoblastomový protein, významný onkosupresorový gen) a v upregulaci p16. U většiny HNSCC je prokázána nefunkčnost onkosupresorového proteinu p53 v druhém kontrolním bodu buněčného cyklu (ve fázi G2), molekulární podstata této poruchy se však liší. U HPV negativních HNSCC je téměř vždy podmíněna mutací genu, naopak u HPV pozitivních je protein p53 vázán virovým onkoproteinem E6 a tento komplex je následně degradován. Nedojde k zastavení buněčného cyklu v druhém kontrolním bodě, neproběhne oprava DNA a nemůže ani nedojít k aktivaci apoptózy spouštěné p53. Regulace buněčného cyklu v prvním kontrolním bodě (v přechodu mezi fází G1 a S) je naopak narušena prostřednictvím pRb a cyklinu D1. HPV asociované nádory orofaryngu vykazují aktivaci buněčného cyklu transkripčním faktorem E2F, který je za fyziologických podmínek vázán na pRb. Poté, kdy virový E7 onkoprotein vytvoří komplexy s níže fosforylovanou formou onkosupresorového proteinu pRb, dojde ke snížení hladiny pRb a jeho uvolnění z vazby na E2F. Uvolněný E2F aktivuje Cyklin E a *CDK2* (cyklin dependentní kinázu 2). Je tak umožněn přechod z G1 do S fáze buněčného cyklu. Zpětně dochází ke zvýšení exprese *CDKN2A* genu, který kóduje p16

a p14. Za normálních okolností p16 inhibuje cyklin D1 a CDK1/6 (které fyziologicky fosforylací pRb uvolňují E2F) a zablokuje buněčný cyklus. V případě HPV infikovaných buněk je ale pRb inaktivován v komplexu s E7 a nemůže již buněčný cyklus negativně ovlivňovat vazbou s E2F [6].

Dalším typickým znakem HNSCC je exprese receptorů pro růstové faktory. Až u 90% HNSCC je zvýšeně exprimován EGFR [24], jehož zastoupení přímo koreluje s větším množstvím lokálních rekurencí a horším celkovým přežitím pacientů [25]. Obdobě negativní korelace je nacházena u receptoru pro VEGF (vascular endothelial growth factor) [26], jenž stimuluje nádorovou neoangiogenezi a zvyšuje metastatický potenciál.

### 2.1.3. Diagnostika a klinická klasifikace

Diagnostika HNSCC je založena klinické manifestaci onemocnění. Na rozdíl od některých jiných malignit nejsou zatím dostupné spolehlivé nádorové markery, které by bylo možné využít k časnému odhalení nádoru. V klinické praxi jsou někdy analyzovány markery SCC (antigen dlaždicobuněčných karcinomů), CEA (carcinoembryonální antigen), Cyfra-21-1 a AAT (alfa-1-antitrypsin). Specificita a zejména senzitivita však velmi kolísají a neumožňují časný spolehlivý záchyt HNSCC. SCC je někdy využíván v rámci dispenzárních kontrol k monitoraci průběhu onemocnění a odpovědi na léčbu.

Klinická manifestace HNSCC se významně liší v závislosti na lokalizaci, pro nádory lokalizované v dutině ústní je typická bolestivost, v pozdějších stádiích doprovázená polykacími obtížemi, varovným příznakem může být i krvácení. Nádory lokalizované v orofaryngu se mohou projevovat bolestivostí, pocitem cizího tělesa v krku, později také polykacími obtížemi i krvácením. Hypofaryngeální lokalizace je naopak typická dlouhým bezpříznakovým průběhem a relativně pozdním nástupem polykacích obtíží a bolesti, tedy i diagnostikování onemocnění v pozdějších stádiích. Často je prvním příznakem metastatické postižení krčních lymfatických uzlin. Nádory hrtanu jsou ve většině případů diagnostikovány časně, protože i malé tumory lokalizované v oblasti glottis způsobí dysfonické obtíže. Ke klinickému obrazu pokročilejších stádií patří dýchací obtíže a polykací obtíže. Nádory nosních a vedlejších nosních dutin se nejčastěji projevují jednostrannou zhoršenou nosní průchodností, krvácením, později i defigurací obličeje či změnou hybnosti či polohy oka (exoftalmus). Nazofaryngeální karcinomy se nejčastěji projeví metastatickým postižením, lokálně mohou způsobovat

nosní neprůchodnost, krvácení a chronickou sekretorickou otitidu. Nádory ucha se manifestují zalehnutím či zhoršením sluchu, krvácením ze zvukovodu, bolestí, v pozdějších stádiích i zhoršením funkce lícního nervu či poruchou rovnováhy. U slinných žláz je naopak typické nahmatání rostoucího útvaru v parenchymu žlázy nebo objevení se zevně patrného tumoru, u maligních nádorů pak doprovázené i bolestivostí či zhoršením funkce lícního nervu.

Pro nalezení a zobrazení primárního nádoru v oblasti hlavy a krku jsou používány různé endoskopické metody, které nám umožní vyšetřit i lokality vzdálené přímému pohledu zraku. Využívány jsou metody přímé i nepřímé endoskopie, pomocí rigidních i flexibilních endoskopů, obraz je možné i zaznamenat pro následující prezentaci, prohlédnutí či porovnání změn v čase. Velmi efektivní metodou, která významně posunula možnosti endoskopické diagnostiky na sliznicích dýchacích i polykacích cest je metoda NBI (Narrow Band Imaging), která umožňuje kombinovat výhody konvenční zvětšovací endoskopie s možností úpravy, processingu sledovaného obrazu. V zásadě jde o klasický RGB videosystém, rozdílná je ale možnost použití optických filtrů, které propustí pouze přesně spektrálně charakterizované světelné svazky. Nejčastěji jde o svazky vlnových délek 400- 430 nm (středová délka 415 nm), které se odrážejí v povrchové slizniční vrstvě, a svazky vlnových délek 525- 555 nm (centrovaných na 540 nm), které pronikají hlouběji do podslizničních vrstev. Princip NBI je založen na rozličeném průniku světla různých vlnových délek do tkání. Světlo výše definovaných vlnových délek je v odpovídající hloubce odráženo/pohlcováno vaskulárními strukturami, jejich architektura je typická jako pro zdravou sliznici, tak pro sliznici s dysplazií lehkého až těžkého stupně a infiltrativně rostoucího karcinomu. V současné době je dostupná celá řada klinických prací, které korelují NBI obraz s histopatologickou povahou léze [27]. NBI je využívána nejen k diagnostice primárního nádoru, ale i ke sledování pacientů po léčbě [28]. Odlišení poléčebných, zejména postradiačních změn bylo před začátkem používání NBI velmi složité a většinou se neobešlo bez nutnosti zátěže pacienta diagnostickým výkonem v celkové anestézii.

Ve většině lokalit HNSCC vykazuje značný metastatický potenciál, i přes palpačně a sonograficky negativní nálezy může být až u 30 % pacientů nalezeno mikrometastatické postižení lymfatických uzlin. Výjimku tvoří nádory glottis, kde je velmi chudá lymfatická drenáž a nádory této lokality metastazují až v pozdních stádiích.

Anatomická a klinická klasifikace oblastí na krku se liší, v klinické praxi se nyní ustálilo rozdělení do šesti, resp. sedmi oblastí [29]. Nádory dutiny ústní metastazují typicky do oblastí I, II a III, nádory orofaryngu postihují obvykle oblasti II, III a IV, nádory supraglotis a hypofaryngu do oblastí III, IV a V, subglotické nádory mohou postihovat i oblasti VI.

Klinické vyšetření sliznic horních dýchacích a polykacích cest a palpační vyšetření krčních oblastí musí být vždy doplněno ještě některou ze zobrazovacích metod.

Sonografické vyšetření je optimální vyšetřovací metodou krčních lymfatických uzlin, je většinou snadno dostupné a finančně nenáročné, je možné i využít sonografické kontroly pro punkci tenkou jehlou ze suspektního ložiska. Ovšem velmi limitní význam má sonografické vyšetření pro zobrazení hlubších struktur hlavy a krku, tedy primárního nádoru.

Druhou zobrazovací metodou v pořadí je CT (computer tomography), v dnešní době taktéž velmi dobře dostupné vyšetření, které při aplikaci kontrastní látky umožní přesné zobrazení jak krčních uzlin, tak primárního nádoru. Zároveň velmi přesně zobrazí i vztah tumoru ke strukturám kostním a chrupavčítým, resp. poškození jejich kontinuity. Omezený význam má CT vyšetření pro vyšetření nádorů v oblasti kořene jazyka (zde má větší výtěžnost vyšetření magnetickou rezonancí) a výsledek může být ovlivněn i artefakty ze zubních výplní.

Nukleární magnetická rezonance (MRI) je zobrazovací metoda s největší přesností zobrazení měkkých tkání. Její použití je vhodné zejména u nádorů kořene jazyka, při nemožnosti vyhodnotit CT vyšetření ovlivněné artefakty ze zubních výplní a při zobrazení nádorů nosních a paranazálních dutin a nosohltanu. Umožní rozlišení nádorové tkáně a retence hlenu a přesně zobrazí vztah nádorů k okolním strukturám - nitrolebí a očnici.

Poslední v standardně využívané zobrazovací metodou je pozitronová emisní tomografie (PET), v současnosti nejčastěji kombinovanou s CT vyšetřením, ale již i s MRI vyšetřením. Hlavní význam má při pátrání po ložisku primárního nádoru při metastatickém postižení krčních uzlin, kdy klinické i endoskopické vyšetření neodhalí ložisko primárního nádoru. Dle aktuálních doporučení by v takové situaci mělo PET/CT vyšetření předcházet panendoskopickému vyšetření v celkové anestézii. Druhá oblast, kdy PET/CT (PET/MRI) hraje nezastupitelnou úlohu, je vyloučení vzdálených metastáz u agresivně se chovajících nádorů nebo u recidiv.

Klinická klasifikace HNSCC se řídí TNM klasifikací (aktuálně platné 7. vydání z roku 2010)[30], které v sobě zahrnuje informaci o velikosti primárního nádoru, regionálním metastatickém postižení i vzdáleném metastatickém postižení. Hodnocení regionálních i vzdálených metastáz platí shodně pro všechny lokality v oblasti hlavy a krku, hodnocení T stádia se v detailech liší, ale je možné obecné shrnutí, které je uvedeno v tabulkách 1 a 2. Hodnoty T, N a M jsou ještě obvykle doplněny o stupeň diferenciacie nádoru, grading (G).

Přestože je TNM klasifikace nejrozšířenějším a nejpoužívanějším klasifikačním systémem, není její prognostická spolehlivost dostatečná. Jako prognosticky významné se ukázaly nepříznivé histologické znaky, které jsou: a) pozitivní resekcí okraje, b) extrakapsulární šíření u metastáz do lymfatických uzlin, c) vícečetné pozitivní lymfatické uzliny, d) angioinvasze, lymfangioinvasze a perineurální šíření. Snahou lékařů a vědců je vytvořit klasifikační schéma s vyšší prognostickou spolehlivostí. Pro HPV pozitivní nádory orofaryngu byla O'Sullivanem a spol.[31] navržena nová klasifikace ICON-S (The International Collaboration on Oropharyngeal cancer Network for Staging). ICON-S se stala základem pro úpravu TNM klasifikace, jejíž 8. vydání bude platné od 1.1.2017. U některých typů nádorů, nejdále je výzkum u kolorektálního karcinomu, je stanovována prognóza onemocnění pomocí infiltrace nádoru imunokompetentními buňkami. Tento systém je nazýván Immunoscore a u kolorektálního karcinomu je jeho prognostická spolehlivost lepší, než u klasické TNM klasifikace [32]. Vychází ze znalostí, že vznik a nádorový růst jsou velmi silně ovlivněny imunitním systémem jedince. Infiltrace imunokompetentních buněk v tkáni nádoru může naznačovat, jak silná je obranná reakce organismu vůči nádoru. Tento předpoklad byl již pro některé malignity potvrzen velmi silnou korelací mezi množstvím imunitních buněk v nádoru a klinickým vývojem onemocnění. Vysoká lymfocytární infiltrace koreluje s lepší prognózou u celé řady nádorů, včetně kolorektálního karcinomu, kde vyšší zastoupení  $CD3^+ CD8^+$  cytotoxických T lymfocytů a paměťových T buněk ( $CD45RO^+$ ) koreluje s delším obdobím bez onemocnění (disease-free survival, DFS) i s celkovým přežíváním (overall survival, OS) pacientů po chirurgické resekcí nádoru. Immunoscore je stanoveno jako poměr  $CD3/CD8$  lymfocytů nebo  $CD3/CD45RO^+$  lymfocytů nebo  $CD8/CD45RO^+$  jak v tkáni nádoru, tak i při invazivním okraji nádoru [33].

**Tabulka 1 TNM klasifikace (upraveno dle [19, 30])**

<b>T stádium</b>	
Tx	Primární nádor nemohl být hodnocen
T0	Primární nádor není přítomen
Tis	Karcinom <i>in situ</i>
T1	Nádor je menší než 2 cm v největším rozměru
T2	Nádor je veliký mezi 2 a 4 cm v největším rozměru
T3	Nádor je větší než 4 cm v největším rozměru
T4a	Lokálně středně pokročilý nádor - Vrstvá do okolních struktur
T4b	Lokálně velmi pokročilý nádor - Vrstvá do vzdálenějších nebo důležitých struktur

**Tabulka 2 – TNM klasifikace (upraveno dle [19, 30])**

<b>N stádium</b>	
Nx	Postižení regionálních lymfatických uzlin nemohlo být zhodnoceno
N0	Bez postižení regionálních lymfatických uzlin
N1	Metastatické postižení jedné stejnostranné regionální lymfatické uzliny, která není větší než 3 cm v největším rozměru
N2	
- N2a	Metastatické postižení jedné stejnostranné regionální lymfatické uzliny, která je větší než 3 cm, ale ne větší než 6 cm v největším rozměru
- N2b	Metastatické postižení ve více stejnostranných regionálních lymfatických uzlinách, kdy žádná není větší než 6 cm v největším rozměru
- N2c	Metastatické postižení oboustranných nebo druhostranných regionálních lymfatických uzlin, kdy žádná není větší než 6 cm v největším rozměru
N3	Metastatické postižení regionálních lymfatických uzlin, větší než 6 cm v největším rozměru

**Tabulka 3 - TNM klasifikace (upraveno dle [19, 30])**

<b>M stádium</b>	
M0	Bez vzdálené metastázy
M1	Vzdálené metastatické postižení

**Tabulka 4 - TNM klasifikace (upraveno dle [19, 30])**

<b>G stádium</b>	
Gx	Stupeň diferenciacce nemohl být stanoven
G1	Dobře diferencovaný nádor
G2	Středně dobře diferencovaný nádor
G3	Nízce diferencovaný nádor
G4	Nediferencovaný nádor

#### 2.1.4. Terapeutické možnosti

Terapeutické možnosti HNSCC se liší v závislosti na lokalizaci a stádiu nádoru. Zobecnit lze pouze, že pro časná stádia onemocnění (I a II) je zpravidla volena pouze jedna léčebná modalita (chirurgie či radioterapie), s výjimkou nádorů hrtanu je preferována většinou léčba chirurgická. U pokročilých stádií nádorů (III a IV) jsou kombinovány léčebné metody dvě, kdy většinou je tou první léčba chirurgická. Chirurgie samotná nebo v kombinaci s radioterapií doposud skýtá největší šanci na vyléčení onemocnění. Primárně onkologická léčba je indikována u pacientů, kteří nejsou způsobilí podstoupit perioperační zátěž, operaci si nepřejí nebo rozsah onemocnění přesahuje možnosti chirurgického odstranění s pooperačně akceptovatelnou kvalitou života. Zároveň je možné nabídnout primárně onkologickou léčbu pacientovi v případě nádorů hrtanu, kdy skýtá větší šance na zachování funkce hrtanu při srovnatelných šancích na vyléčení. U pacientů s HPV pozitivními nádory orofaryngu, které obvykle velmi dobře odpovídají na léčbu, jsou publikované výsledky chirurgické i primárně onkologické léčby srovnatelné [34, 35]. Primární onkologická léčba je dále indikována u nádorů nosohltanu, kde léčebné i funkční výsledky jsou významně lepší.

#### Chirurgická léčba

Moderní onkologická chirurgie se snaží o vyléčení onemocnění se zachováním akceptovatelné kvality života. Cílem je úplné odstranění nádoru i s bezpečným okrajem zdravé tkáně, tedy dodržení maximální šance na vyléčení onemocnění, ale se zachováním funkce operovaného orgánu. Rozsah resekce je vždy posuzován v kontextu kvality života po operaci, někdy tato rozvaha vede k upřednostnění primární onkologické léčby. Pro většinu stádií je ale operační léčba metodou první volby. Chirurgická léčba ve většině případů kombinuje operační výkon s odstraněním primárního nádoru a výkon na krčních lymfatických uzlinách, tedy bloková krční disekce. U pokročilých onemocnění je někdy rozsáhlá resekční fáze následovaná fází rekonstrukční s přenesením tkáně z jiného, donorského, místa, ať již jako lalok stopkatý (se zachovalým, nepřerušným cévním zásobením) nebo jako lalok volný, kdy je nutné provedení cévní anastomózy. Ve shodě se snahou o zachování funkce orgánu jsou využívány moderní chirurgické technologie, ať již šetrné způsoby ošetření tkání (např. harmonický skalpel) nebo operace prováděné plně endoskopicky, využívající laser nebo

technologie robotické chirurgie. Operatér využívá pohledu endokamery a jednotlivé kroky provádí pomocí instrumentária umístěného na robotických ramenech. Cílem všech těchto postupů je zvýšit přesnost operace, snížit na minimum poškození zdravých tkání, urychlit hojení, zkrátit dobu rehabilitace a zachovat funkční stav.

Jak již bylo zmíněno, operační výkon na krčních lymfatických uzlinách je velmi často nedílnou součástí operace. Blokované krční disekce (ND, neck dissection) jsou klasifikovány podle rozsahu (radikální, rozšířená radikální, modifikovaná a selektivní ND) a podle indikace (terapeutické či elektivní). Radikální ND označuje situaci, při které byly odstraněny oblasti I – V a součástí resekce bylo i odstranění musculus sternocleidomastoideus (SCM), vena jugularis interna (IJV) a nervus accessorius (CN XI). Rozšířená radikální ND zahrnuje ještě odstranění nervus hypoglossus (CN XII). Modifikovaná ND znamená odstranění lymfatických uzlin z oblastí I až V, ale zachování některé z nelymfatických struktur (rozlišujeme typ I – CN XI, typ II – CN XI a IJV, typ III – CN XI, IJV, SCM). Selektivní ND kombinuje zachování alespoň jedné z oblastí krčních uzlin a zachování nelymfatických struktur [29, 36]. Ve většině případů je blokovaná disekce prováděna jen na postižené straně, ale u některých lokalizací, kde je lymfatická drenáž na obě strany, je nutné provést oboustrannou blokovanou krční disekce (například u nádorů kořene jazyka, měkkého patra, spodiny ústní, supraglotických nádorů či preepiglotického lože).

## Radioterapie

Ještě více se technický pokrok promítnul do možností moderní radioterapie.

Urychlovače záření v kombinaci s přesným počítačovým zobrazením a plánováním umožní precizní definování cílového pole, dávky (obvykle 66-74 Gy, resp. 50-60 Gy) a její rozdělení do jednotlivých frakcí (obvykle 5 frakcí týdně, celkem 6 týdnů). Technika IMRT (intensity-modulated radiation therapy) je dnes považovaná za standard.

Umožňuje v třidimenzionálním plánu definování adekvátní dávky pro oblast primárního nádoru a přilehlé tkáně a naopak snížení dávky, kterou jsou zasaženy slinné žlázy, temporální lalok, sluchový či zrakový aparát. Existuje řada strategií frakcionace celkové dávky, její zvýšení (boost) na konci ozařovacího plánu, kombinace s indukční nebo častěji s konkomitantní chemoterapií. Radioterapie je vždy indikovaná u nádorů v pokročilejších stádiích (III a IV stádium, T3 nebo T4, resp. N<sup>+</sup>) a při nalezení nepříznivých histologických znaků. Primární radioterapie či chemoterapie je indikovaná

v případě klinického stavu pacienta, který znemožňuje výkon v celkové anestézii. A dále v situacích, kdy velikost či rozšíření onemocnění přesahuje možnosti chirurgické léčby, v případě odmítnutí chirurgické léčby pacientem nebo v některých lokalizacích, kde primární radio- či chemoradioterapie skýtají srovnatelné či lepší šance na vyléčení (nádory glotis, nosohltanu, HPV pozitivní nádory orofaryngu). Dle rozsahu zasažených lokalit je radioterapie směřována a dávkována na primární nádor i lymfatické uzliny na krku, někdy i oboustranně. Interval mezi chirurgickou a adjuvantní radiační léčbou by měl být co nejkratší a neměl by přesáhnout 6 týdnů [19].

### Chemoterapie

Chemoterapie je v rámci léčby HNSCC třetí modalitou, volba je vždy závislá na stavu pacienta (performance status) a na cíli léčby. Jako samostatná léčebná modalita má své místo pouze v paliativním režimu. Nejčastější je použití v konkomitantním režimu u lokálně pokročilých HNSCC, kdy je stále za standard považována kombinace cisplatinu a radioterapie. Pro konkomitantní režimy může být dále použita kombinace cisplatinu s 5-fluorouracilem (5-FU) nebo s paclitaxelem. Na základě klinických studií testujících použití neoadjuvantní léčby, indukční chemoterapie, kdy docházelo ke zvyšování toxicity léčby, bez vlivu na prodloužení celkového přežívání pacientů, není tento postup doporučován [37-39]. Pokud nádor není operabilní a jsou vyčerpány možnosti radioterapie, jsou využívány nejčastěji chemoterapeutické režimy kombinující cisplatinu nebo carboplatinu s 5-FU nebo s docetaxelem, jako monoterapie (s paliativním záměrem) jsou pak využívány režimy s cisplatinou, carboplatinou, docetaxelem, paclitaxelem, 5-FU či metotrexátem [19].

V situaci, kdy onemocnění přesahuje možnosti léčby vedoucí k vyléčení nebo alespoň zpomalení průběhu nebo dochází k progresi onemocnění i přes léčbu, je u pacienta indikována podpůrná léčba (best supportive care). Základem je efektivní tlumení bolestí, zajištění dostatečné hydratace a alimentace a zajištění průchodnosti dýchacích cest. Rozhodnutí o jednotlivých krocích musí být činěno ve shodě s přáním pacienta, neboť často ovlivňují kvalitu života (tracheostomie). Nutná je i komunikace s okolím pacienta, šetrným způsobem vysvětlit další předpokládaný průběh onemocnění a možná úskalí další péče.

## Biologická léčba

V návaznosti na pokroky v molekulární biologii a genetice jde i rozvoj biologické léčby. Využívány jsou přístupy ovlivňující či blokující některou ze specifických signalizačních či metabolických drah, které jsou významné pro rozvoj konkrétního typu nádoru. V některých onkologických indikacích biologická léčba přinesla zásadní posun v terapeutických výsledcích a jsou dnes již standardem léčby (anti-CD20, anti-HER-2/Neu). V oblasti HNSCC je nejvýznamnějším zástupcem cetuximab, monoklonální protilátka proti receptoru pro epidermální růstový faktor (EGFR, endothelial growth factor receptor). Velká očekávání přinesla studie Bonnera [40], kdy kombinace cetuximabu a radioterapie významně zlepšovala loko-regionální kontrolu onemocnění a prodlužovala čas do progresu onemocnění. V horizontu 5 let sledování bylo potvrzeno i prodloužení celkového přežití pacientů [41]. Naopak kombinace cetuximabu s konkomitantní chemoradioterapií (cisplatina + radioterapie) vedlo ke zvýšení nežádoucích účinků, častějšímu přerušování léčby, ale ne k celkovému přežití. Jediná podskupina, která z přidání cetuximabu částečně profitovala, byli pacienti s HPV pozitivním nádorem, u kterých došlo k prodloužení období do progresu onemocnění. Míra exprese EGFR na nádorových buňkách nebyla prognostickým faktorem léčebné odpovědi [42]. Žádný přímý vztah mezi HPV a mírou nežádoucích účinků při léčbě kombinující RT a cetuximab nebyl prokázán, procento výskytu mukozitid a nutnost zavedení nazogastrické sondy byla shodná ve skupinách s p16 pozitivními i negativními nádory [43]. Jako zatím jediný pozitivní prognostický faktor odpovědi na léčbu s cetuximabem je akneiformní vyrážka (acneiform rash).

Druhou možností biologické léčby u HNSCC je monoklonální protilátka proti vaskulárnímu endoteliálnímu růstovému faktoru (VEGF, vascularized endothelial growth factor), bevacizumab, ovlivňující nádorovou tvorbu cév. Zvýšené hladiny VEGF jsou asociované s horším celkovým přežitím u pacientů s HNSCC [44] a zatím slibných výsledků je dosahováno při kombinaci bevacizumabu s cetuximabem [45].

Přes veškeré dílčí úspěchy a naděje, nepřinesla zatím biologická léčba do oblasti onkologie HNSCC očekávaný průlom, který by významně posouval terapeutické výsledky a zlepšoval prognózu nemocných. Z doposud publikovaných výsledků se jako nejnadějnější nyní jeví možnost imuno-onkoterapie, resp. ovlivnění klíčových bodů regulace imunitní odpovědi – „immune checkpoints“, viz. kapitola 2.2.3.5.

## 2.2. Imunitní systém

Základním posláním imunitního systému je rozlišit struktury pro daný organismus vlastní a cizí [46], v modernější podobě signál nebezpečí [47]. Struktury, které imunitní systém rozpoznává, se nazývají antigeny. Antigeny, které imunitní systém rozpozná jako vlastní, jsou tolerovány, není proti nim směřována žádná obranná reakce. Naopak antigeny, které imunitní systém rozpozná jako cizí, vyvolají kaskádu reakcí, která má za cíl strukturu nesoucí antigen zničit a odstranit z organismu. Imunitní systém se tak musí naučit rozpoznat nejen bakteriální, virové či parazitární antigeny, ale musí být schopen odhalit i buňky, které byly původně organismu vlastní a vlivem genetických či molekulárních změn se staly potenciálně nebezpečné. Hypotézu imunitního dohledu poprvé vyslovil Paul Ehrlich a v roce 1957 jasně popsal Sir MacFarlane Burnet a nazval ji „immunosurveillance“ [48]. Na základě nových poznatků byla následně tato teorie přeformulována na hypotézu imunoeditace, sestávající ze tří stádií: eliminace, equilibrium a escape, tedy teorie 3E [49]. Tento systém musí být zároveň i velmi přesně regulován tak, aby nedošlo příliš silnou obrannou reakcí k poškození samotného organismu.

Problematika protinádorové imunity stojí na dvou principiálních otázkách:

- 1) jak může imunitní systém nádor rozpoznat
- 2) jaké mechanismy využívají nádorové buňky k obraně před imunitním systémem

Imunitní systém rozeznává nádorové buňky dvěma způsoby:

- a) pomocí nádorově specifických antigenů (**TSA**, jsou exprimované pouze na nádorových buňkách), které jsou produktem mutovaných genů [50] (například fúzní protein Bcr-Abl anebo antigeny související s patogenezí nádoru, například virovou infekcí - antigeny lidského papillomaviru (HPV), který se kauzálně podílí na vzniku karcinomu čípku i karcinomů v oblasti orofaryngu, nebo jaderné antigeny viru Epstein-Barrové (EBNA-1) exprimované Burkittovým či Hodgkinovým lymfomem a nasofaryngeálním karcinomem [51, 52].
- b) pomocí s nádorem asociovaných antigenů (**TAA**, které jsou exprimovány na buňkách nádorových i zdravých, ale v rozdílné míře) [53]. Příkladem mohou být melanomové antigeny Mage-1 či Melan-A, které jsou normálně přítomné na melanocytech, ale

mnohem silněji exprimovány na buňkách melanomu nebo EGFR, který je zastoupen na zdravých epitelálních buňkách, ale jeho exprese na nádorových keratinocytech se řádově liší.

### 2.2.1. Mechanismy protinádorové ochrany

Na mechanismech protinádorové obrany se podílí všechny hlavní složky imunitního systému, jak nespecifické – makrofágy, dendritické buňky, NK a NKT buňky, tak i antigenně specifické – protilátky, T lymfocyty [54].

#### **Nespecifické mechanismy**

##### Makrofágy

Makrofágy jsou nejdůležitější složkou nespecifické imunitní odpovědi, kdy v tkáních fagocytují části buněk či celé buňky, které rozpoznají jako cizí. Jako antigen prezentující buňky takto pohlcené antigeny poté zpracují a vystaví na svém povrchu. Charakter dále se vyvíjející reakce ovlivňují typem produkovaných cytokinů. Makrofágy typu M1 (vznikají klasickou aktivací zejména pod vlivem interferonu-gama, IFN- $\gamma$ ) produkují zejména interleukin 12 (IL-12) a aktivně fagocytují buněčný detritus v místě probíhající imunitní reakce. IL-12 působí prozánětlivě a stimuluje i obranou funkci dalších imunokompetentních buněk, zejména NK buněk a T lymfocytů. Naopak makrofágy typu M2 (vznikají alternativní aktivací pod vlivem IL-4 a IL-13) mají spíše protizánětlivé působení, stimuluji hojivé procesy a regeneraci tkání. Typickým produktem M2 jsou IL-10 a transformační růstový faktor beta (TGF- $\beta$ ).

##### Dendritické buňky

Dendritické buňky (dendritic cells, DC) jsou hlavní profesionální antigen prezentující buňky (APC), tedy buňky, které zpracují antigenní materiál a poté jednotlivé antigeny vystaví na svém povrchu ve vazbě na MHC gp molekuly. Jako nematurované cirkulují v periferní krvi a vycestovávají do tkání, po aktivaci migrují do lymfatických uzlin, kde vyžívají. Zde je mohou rozpoznat T lymfocyty a po získání ko-stimulačních signálů zahájit imunitní reakci. Dendritické buňky tvoří propojení mezi vrozenou a adaptivní složkou imunitního systému. Rozdělují se na myeloidní (mDC) a plazmacytoidní (pDC), odlišují se exprimovanými znaky a produkují odlišné cytokiny. Myeloidní

dendritické buňky jsou nejčastěji detekovány jako  $CD45^+LIN^-HLA-DRC^+D14^-CD11c^+$  a vyznačují se produkcí IL-12. Naopak plazmacytoidní dendritické buňky jsou detekovány jako  $CD45^+LIN^-HLA-DR^+CD14^-CD123^+$  a typická je pro ně produkce IFN- $\gamma$ .

#### NK buňky

Přírození zabíječi (natural killers, NK) jsou lymfocyty, které velmi rychle aktivují své cytotoxické mechanismy, po nalezení buňky s malým zastoupením molekul MHC gp I. třídy na povrchu nebo po navázání svých aktivačních molekul na příslušnou strukturu, například receptoru CD-16 na Fc část opsonizační protilátky, která na poškozenou nebo změněnou cílovou buňku upozornila.

### **Specifické mechanismy**

#### Protilátky

Protilátky cirkulují v oběhu i vycestovávají do tkání a svou variabilní částí se váží na cílové antigeny. Po navázání mohou v dané buňce spustit apoptotickou kaskádu, aktivovat komplement nebo ji mohou označit (opsonizovat) pro další hráče imunitního systému, zejména fagocytující makrofágy či pro NK buňky. Tento proces se nazývá na protilátkách závislá buněčně mediovaná cytotoxicita (Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity, ADCC). Protilátky jsou vytvářeny plazmatickými buňkami poté, kdy získají specifický signál z Th buněk. Th lymfocyty musí před tím rozpoznat cílový antigen prezentovaný na profesionálních APC, kterými jsou DC a makrofágy.

#### Th lymfocyty

Pomocné lymfocyty ( $CD4^+$  lymfocyty, Th) rozpoznávají peptidy v komplexu s MHC gp II. třídy APC, což vede k jejich aktivaci. Aktivované Th lymfocyty vyžívají v Th1 nebo Th2 lymfocyty. Th1 lymfocyty interagují s makrofágy a stimulují odpověď zejména proti intracelulárním patogenům, Th2 lymfocyty naopak spolupracují s B lymfocyty a stimulují humorální odpověď.

#### Tc lymfocyty

Aktivované cytotoxické T lymfocyty ( $CD8^+$  lymfocyty, Tc) jsou nejdůležitější zbraní imunitního systému v protinádorové obraně. Velmi rychle a efektivně rozeznávají a

likvidují buňky nesoucí na svém povrchu antigen, který odpovídá struktuře jejich antigenně specifického T buněčného receptoru (TCR) [55]. Na začátku aktivačního procesu T lymfocytů je však dendritická buňka, profesionální APC. Ta musí pohltit a zpracovat antigen a jeho peptidy vystavit v komplexu s MHC I. nebo II. třídy na svém povrchu. V lymfatické uzlině musí nejprve prekurzorový (nezralý) T lymfocyt nalézt APC nesoucí na svém povrchu komplex MHC gp I. třídy s antigenem odpovídajícím TCR nezralého Tc lymfocyta. Reakci mezi APC a prekurzorovým Tc lymfocytem („priming“) musí ještě podpořit příslušné adhezivní a kostimulační molekuly (např. CD28/CD80, ICOS / ICOS-1) a Th1 lymfocyty produkcí IL2. Pokud k tomu dojde, pak se prekurzorový lymfocyt aktivuje a začne proliferovat a diferencovat v klon zralých efektorových lymfocytů. Ty pak cirkulují v krevním oběhu a v tkáních mohou nalézat své cílové struktury. Při jejich nalezení mohou zralé Tc lymfocyty aktivovat cytotoxické mechanismy po stimulaci pouze jedním signálem, bez nutnosti kostimulačního signálu přes CD28. Pokud při primingu nedojde k dostatečné kostimulaci (což je většinou problém selhání imunitního systému u řady nádorů), dojde k utlumení reakce a stav končí apoptózou nebo anergií.

Aktivované Tc lymfocyty mohou využívat různých mechanismů k likvidaci cílových buněk. Po navázání na cílovou buňku mohou uvolnit granzymy a perforiny, které naruší membránu cílové buňky a aktivují dráhy vedoucí k apoptóze. Apoptózu mohou aktivovat i kontaktem proteinu Fas-L (Fas ligand) s receptorem Fas, který je exprimován na celé řadě buněk. Tento kontakt vede k velmi rychlé aktivaci apoptózy. A v neposlední řadě produkují Tc lymfocyty i řadu cytokinů (např. tumor necrosis factor beta, TNF-  $\beta$ ), které mohou aktivovat apoptotickou smrt buňky.

Apoptóza v.s. imunogenní buněčná smrt

Pro pochopení základních principů protinádorové imunologie je nutné rozlišit dva základní způsoby buněčné smrti. Apoptóza je různými signály spuštěná fyziologická buněčná smrt, kdy apoptotické signalizační kaskády vedou k rozložení buňky vlastními mechanismy. Výsledným produktem jsou apoptotická tělíška, která nevyvolávají žádnou odezvu imunitního systému. Oproti tomu byla teprve nedávno popsána a definována imunogenní buněčná smrt (ICD, Immunogenic Cell Death), kdy stresu vystavené buňky exprimují na svém povrchu molekulu kalretikulinu (calreticulin, CRL,

protein z endoplazmatického retikula). Do svého okolí uvolní ATP a HMGB-1 (High-mobility Group Box 1) a některé další signální molekuly, nazývané alarminy. Vazbou CRL na povrchový receptor CD91 (scavengerový receptor používaný fagocytujícími buňkami) na povrchu nezralých dendritických buněk je iniciována fagocytóza. Nezralé DC poté pod vlivem komplexního cytokinového prostředí a HMGB1 vyžívají a stávají se zralými DC, schopnými optimálně prezentovat nádorové antigeny. Mezi stresové faktory, které vyvolávají ICD patří radiční záření, některá cytostatika, zejména antracykliny, UV záření či vysoký hydrostatický tlak [56]. V případě protinádorové imunologie pouze ICD umožní navození účinné odpovědi, rozpoznávající antigeny z pohlcených nádorových buněk [57-59].

### 2.2.2. Mechanismy využívané nádorem k úniku před imunitním systémem

Jak bylo přehledně uvedeno výše, imunitní systém zdravého jedince disponuje celou řadou mechanismů, kterými za fyziologických podmínek dokáže nádorové bujení rozpoznat a zastavit. Rozvoj nádorového onemocnění je pak umožněn pouze za předpokladu, že tyto mechanismy selžou, respektive nádorová buňka najde mechanismy, jak jim uniknout. V první fázi kontaktu imunitního systému s nádorem dochází k odstranění nádorových a potenciálně nádorových buněk – eliminaci. V druhé fázi se pak růst nádoru a obranné mechanismy imunitního systému vyrovnávají a tuto fázi nazýváme rovnováhou – equilibrium. Ve třetí fázi (escape) nádor nalezne vhodné únikové mechanismy, vymaní se z dohledu imunitního systému a začne růst. Časové hledisko se u jednotlivých typů nádorů významně liší, na základě některých prací se odhaduje, že fáze rovnováhy může trvat i desítky let. Schopnost nádoru vymanit se z kontroly imunitního systému patří dle dnešních definicí k základním znakům nádoru [60, 61]. Zde jsou uvedeny základní mechanismy umožňující únik nádoru z kontroly imunitního systému:

#### Pasivní obrana

- Ztráta antigenů

Selekční tlak prostředí nutí nádorové buňky měnit své obranné strategie a proto je nádor heterogenní kombinací různých populací buněk. Ty se liší i množstvím jednotlivých exprimovaných antigenů, jak TAA, tak i TSA.

- Snížená exprese MHC gp I. třídy

Nádorové buňky na svém povrchu snižují množství exprimovaných MHC glykoproteinů, které jsou v případě I. třídy rozpoznávány CD8<sup>+</sup> Tc lymfocyty a v případě II. třídy CD4<sup>+</sup> Th lymfocyty. Pro rozpoznání nádorové buňky T lymfocyty je exprese MHC gp a rozpoznání antigenu na MHC gp navázaného nezbytné. Současně některé nádorové buňky pod vlivem selekčního tlaku prostředí tvoří méně proteinových komponent transportérů, které se podílejí na zpracování antigenů a jejich vystavení na povrchovém MHC gp.

### Aktivní obrana

- Aktivace signálu / zablokování signálu

Imunitní obrana je velmi přísně regulovaný systém. Pro aktivaci T lymfocytů je nutné setkání TCR (T cell receptor) naivní T buňky s MHC molekulou na APC (dendritická buňka, makrofág, B lymfocyt), což je nazýváno prvním signálem. Poté mohou nastat dva odlišné děje.

- Dojde k druhému, tzv. kostimulačnímu signálu, tedy k vazbě molekuly (nejčastěji například CD28) na povrchu T lymfocytu na molekuly skupiny B7, tedy CD80 či CD86 na povrchu APC a T lymfocyt je plně aktivován a pod vlivem cytokinů, zejména IL-2, prolifерuje a vzniká klon efektorových, aktivovaných T lymfocytů. Tento děj vzniká nejčastěji v lymfatických uzlinách a aktivované T buňky se vrací na „místo určení“, tedy do nádorového mikroprostředí. Po setkání se svým jedinečným cílovým antigenem již CD8<sup>+</sup> buňky nepotřebují kostimulační signál a rovnou mohou buňku likvidovat. Imunitní systém je vybaven schopností si uchovat část z aktivovaných T lymfocytů jako takzvané paměťové buňky, které se při dalším setkáním s antigenem rychle aktivují a nemusí projít procesem prezentace přes APC.
- Krom aktivčních signálů může naivní T lymfocyt po kontaktu TCR s MHC gp APC získat i inhibiční signál. Fyziologicky brání přehnaným imunitním reakcím poškozujícím okolní tkáň a autoimunitním reakcím. Na povrchu T lymfocytů je v různých fázích přítomna celá řada inhibičních molekul, které po navázání ligandu zastaví aktivaci T buňky, zablokují T buňku (anertní stav) nebo spustí apoptotické kaskády a T buňky zlikvidují.

Za fyziologických podmínek zásadně důležité regulační inhibiční molekuly (nazývané immune checkpoints) mohou být využívány nádorovým onemocněním k utlumení protinádorové imunitní odpovědi. Těmi nejznámějšími jsou: CTLA-4, PD-1, B7-1, Tim-3, BTLA, VISTA, LAG-3.

- CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4)

Jedná se pravděpodobně o nejsilnější regulační molekulu, která soutěží o vazbu s aktivační molekulou CD28, ovlivňuje tedy počáteční aktivaci T lymfocytů. Zastoupení na povrchu T buněk se začíná zvyšovat za 2 až 3 dny po aktivaci a díky své vyšší afinitě k CD80 a CD86 dokáže vytlačit z vazby stimulační molekuly a ukončit aktivační mechanismy T lymfocytů. Brání tak vzniku přehnaně silné imunitní odpovědi a autoimunitní reakci. CTLA-4 je exprimována i na regulačních T lymfocytech (Treg), kde naopak zvyšuje aktivitu Treg, zvyšuje jejich počet a podporuje jejich regulační působení [62]. Je známo, že Treg v mikroprostředí HNSCC exprimují CTLA-4 ve vysoké míře [63].

- PD-1 / PD-L1

PD-1 (Programmed cell death protein 1) receptor je v současné době asi nejnadějnější cílová molekula pro imuno-onkologickou terapii. Zastoupení transmembránového receptoru se mění v závislosti na aktivaci a funkčním stavu T i B lymfocytů, NK buněk či dendritických buněk. Na rozdíl od CTLA-4, která brání aktivaci, exprese PD-1 molekuly blokuje již aktivně působící buňku a zvýšené zastoupení je spojováno se stavem vyčerpanosti (exhausted) T lymfocytů, například u chronických virových infekcí [64]. Tento regulační mechanismus brání organismus před autoimunitní reakcí. Přírodním ligandem jsou molekuly PD-L1 a PD-L2, které exprimuje celá řada hematopoetických a imunitních buněk. Vazba ligandu na receptor PD-1 se uplatňuje v regulaci imunitní odpovědi. Zároveň ale celá řada nádorových buněk na svém povrchu nefyziologicky exprimuje PD-L1. Po navázání PD-L1 ligandu na povrchu nádorové buňky na receptor PD-1 na povrchu aktivovaného T lymfocytu dojde k zablokování imunitní odpovědi, snížení proliferace, snížení produkce cytokinů a T buňka se dostává do stavu nečinnosti, vyčerpanosti (exhausted). Zablokování této vazby monoklonálními protilátkami proti PD-1 nebo PD-L1 vede k opětovné aktivaci T lymfocytu umožňující proliferaci i cytokinovou produkci. Dosavadní klinické i experimentální práce prokazují, že PD-1 / PD-L1 inhibiční dráha je zapojena u celé řady nádorových

onemocnění. Je prokázáno, že zvýšená exprese PD-L1 na povrchu nádorových buněk koreluje s horší prognózou některých malignit [65, 66]. Anti-PD-1 protilátky změnilы pohled na možnosti imunoterapie v onkologii a u některých nádorových onemocnění vedly k dlouhodobé stabilizaci onemocnění i velmi pokročilých stádií [67, 68]. Anti-PD1 terapie však selhává u části nemocných a jasné prediktivní faktory odpovědi nejsou v současné době známy. Významný podíl na celkovém vyladění imunitního systému a tedy i na charakteru odpovědi na terapii inhibitory „immune checkpoints“ má složení střevní mikroflóry – střevní mikrobiom. Je prokázáno, že zastoupení, resp. absence některých typů bakterií velmi významně ovlivňuje léčebnou odpověď. Přítomnost kmenů jako *Bifidobacterium* nebo *Bacteroides spp.* ve střevním mikrobiomu může zlepšit či obnovit terapeutickou odpověď [69, 70].

Podrobněji viz. kapitola 2.2.3 – Principy nádorové imunoterapie

- Tim-3

Další velmi důležitou a zajímavou regulační molekulou je Tim-3 (T-cell immunoglobulin and mucine protein 3), zejména ve vztahu k nádorům hlavy a krku. Nejčastěji je za vazebný ligand Tim-3 považován galectin-9, některé práce to ale zpochybňují [71]. Význam Tim-3 byl prokázán zejména u chronických infekcí (hepatitida, HIV) [72] a v protinádorové imunitní odpovědi. Tim-3 je považován za regulátor imunitní odpovědi v nádorových a chronickou virovou infekcí změněných tkáních a ovlivňuje délku a sílu reakce Th1 a CD8<sup>+</sup> T lymfocytů [73]. U nádorů hlavy a krku bylo prokázáno, že Tim-3 je exprimována T lymfocyty hojně infiltrujícími pouze nádorovou tkáň, nikoliv v periferní krvi a teprve double pozitivní populace CD8<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>Tim-3<sup>+</sup> buněk vykazuje sníženou aktivitu (měřeno jako produkce IFN- $\gamma$ ) [74]. Právě probíhá hodnocení prognostického významu těchto podskupin z pro pacienty s HNSCC. Molekula Tim-3 by mohla být i velmi perspektivní pro možnou immuno-onkoterapii nádorů hlavy a krku.

- LAG-3

LAG-3 (Lymphocyte-activation gene 3) je regulační molekula exprimovaná na povrchu aktivovaných CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> lymfocytů, vázající se na molekuly MHC gp I. a II. třídy. LAG-3 se také podílí na zvyšování supresivního působení Treg [75] a to jak přímým kontaktním působením přes MHC gp molekuly, tak i stimulací produkce IL-10. V klinických studiích blokace LAG-3 zvyšuje efekt anti-PD-1 terapie [76].

### Produkty nádorů potlačující protinádorovou imunitní reakci

Jiným mechanismem ovlivňujícím imunitní systém a jeho schopnost zabránit vzniku, resp. růstu nádoru je produkce cytokinů a jiných molekul, které negativně ovlivňují imunitní buňky a utlumí imunitní odpověď. Může dokonce vzniknout situace, kdy nádor ovlivní buňky, resp. využije buňky imunitního systému ve svůj prospěch.

Mezi nejdůležitější patří IDO, adenosin, IL-10, TGF- $\beta$ , Fas / Fas-L a buněčné populace Treg, M2, MDSC:

- IDO (Indolamin 2,3-dioxygenase)

Tento enzym často produkovaný v nádorovém mikroprostředí jak samotnými nádorovými buňkami, tak buňkami imunitního systému (Treg či M2 makrofágy), rozkládá esenciální aminokyselinu L-tryptofan, nezbytnou pro efektivní T buněčnou odpověď [77]. IDO zároveň může působit jako atraktant pro MDSC (myeloid-derived suppressor cells) a tím opět zvyšovat imunosupresivnost mikroprostředí [78]. U některých nádorů (např. melanom, kolorektální karcinom, ovariální karcinom) je prokázána korelace IDO s negativní prognózou onemocnění [79-81].

- Adenosin

Adenosin je označován za klíčový autokrinní a parakrinní faktor nádorového mikroprostředí. Jeho koncentrace v tkáních se může rychle měnit v reakci na stresové stimuly, jako jsou hypoxie, trauma, zánět. Zvýšení adenosinu slouží fyziologicky k ochraně buněk a tkání proti přehnané imunitní reakci a poškození a podporuje hojivé procesy. Pokud není hladina dobře regulována, může docházet k fibrotickým změnám tkáně a v případě nádorového mikroprostředí k imunosupresivnímu působení a umožnění nádorového růstu [82]. Adenosin se váže na G-proteinové receptory A1, A2A, A2B a A3, které spouští MAPK kinázovou kaskádu. V nádorovém mikroprostředí je koncentrace adenosinu zvyšována působením ektoenzymů CD39 a CD73 (ectonucleotidases), které metabolizují ATP a ADP na AMP a adenosin (ATP – adenosin trifosfát, ADP – adenosin difosfát, AMP – adenosin monofosfát). Z mikroprostředí je adenosin odstraňován enzymem adenosin deaminázou. Produkce adenosinu je jedním z hlavních mechanismů působení Treg, které na svém povrchu nesou jak CD39, tak i CD73 molekulu [83]. Kromě přímého imunosupresivního

působení ovlivňuje v nádorovém mikroprostředí adenosin i diferenciaci makrofágů směrem k M2 typu [82].

- IL-10

Interleukin 10 je cytokin s velmi širokým spektrem účinků, obecně působí protizánětlivě, brání tak nežádoucímu poškození vlastních tkání přehnanou imunitní reakcí a vzniku autoimunit. Je produkován celou řadou imunitních buněk, včetně Treg a M2. IL-10 v nádorovém mikroprostředí, společně s TGF- $\beta$ , přímo inhibuje protinádorové imunitní reakce.

- TGF- $\beta$

Transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) je druhým typickým cytokinem, který se v hojné míře vyskytuje v nádorovém mikroprostředí a podílí se na negativní regulaci imunitní odpovědi. Za fyziologických podmínek vyvolává zastavení proliferace a spouští apoptózu. Nádorové buňky však mají schopnost využít TGF- $\beta$  ve svůj prospěch, jak negativním ovlivněním imunitní odpovědi, tak zvýšením procenta buněk podléhajících EMT (epiteliálně-mesenchymální transformaci). V průběhu EMT nádorové epiteliální buňky získávají některé vlastnosti buněk mezenchymálních (například ztráta mezibuněčných vazebných molekul, jako e-cadherin). Dojde tím ke zvýšení jejich migračních schopností a tedy i metastatického potenciálu [84, 85]. TGF- $\beta$  je produkován a zároveň zpětně vazebně stimuluje diferenciaci a expanzi Treg, což jsou dva související mechanismy, negativně ovlivňující efektivní protinádorovou odpověď a umožňující růst nádoru [85].

- Regulační T lymfocyty (Treg)

Subpopulace T lymfocytů, která potlačuje aktivaci a proliferaci efektorových T buněk je známa jako regulační T lymfocyty (Treg). Dlouho nebyly známy znaky, které by regulační / inhibiční T lymfocyty jasně definovaly, proto se názory na existenci skupiny regulačních buněk v minulosti dosti střídaly. Teprve na sklonku minulého století se skupině Sakaguchiho podařilo nalézt znaky, které fenotypově definovaly regulační T lymfocyty a regulace imunitní odpovědi se dostala na výsluní zájmu imunologů [86-89]. Nejvíce poznatků je v dnešní době o podskupinách CD4<sup>+</sup> T lymfocytů, ale jsou popsány i CD8<sup>+</sup> buňky s regulační funkcí [90-94].

Treg jsou součástí normálně fungujícího imunitního systému, kdy mají zásadní roli při navození tolerance vůči vlastním antigenům. Absence Treg vede k těžkým autoimunitním onemocněním. Na straně druhé zvýšený počet či působení Treg negativně ovlivňuje protinádorovou imunitní reakci a může se podílet na vzniku a rozvoji nádorového onemocnění. Korelace Treg u některých typů malignit byla popsána jak v periferní krvi pacientů, tak zejména pro jejich akumulaci v nádorovém mikroprostředí [95-97]. Platí to i pro dlaždicobuněčné karcinomy v oblasti hlavy a krku (HNSCC) [98-101].

Jsou popisovány tři základní typy lidských regulačních  $CD4^+$  T buněk. První skupina je definována jako  $CD4^+CD25^+IL-10^+Foxp3^{low}$  buňky a označuje se jako regulační buňky 1. typu. Jejich aktivace probíhá při setkání s antigenem a je závislá na IL-10 [102].

Druhou skupinu tvoří přirozeně vznikající regulační T lymfocyty ( $CD4^+CD25^{high}Foxp3^+$  T cells (nTreg), které vyžívají ve specializovaném mikroprostředí thymu a mají schopnost inhibovat jak  $CD4^+$  tak i  $CD8^+$  T buňky. Mohou působit jak přímým kontaktem, tak i prostřednictvím solubilních cytokinů (IL-10, TGF- $\beta$ , IL-35). Pro efektivní působení Treg je nutný mezibuněčný kontakt či alespoň přiblížení k cílové buňce. Působení prostřednictvím solubilních cytokinů se uplatňuje parakrině či v okamžiku mezibuněčného kontaktu [88, 103]. Třetí skupinu tvoří Th3 lymfocyty, které jsou antigen-specifické a produkují ve vysokých koncentracích cytokiny s imunosupresivním efektem (TGF- $\beta$  a IL-10) [104].

Vyžívání regulačních T lymfocytů v thymu i jejich setrvávání v periferní cirkulaci je závislé na IL-2, samy o sobě však nejsou schopné IL-2 produkovat. Receptor pro IL-2 se skládá z tří částí: alfa podjednotky (IL-2R $\alpha$ , neboli CD25), která podmiňuje vysokou afinitu vazby cytokinu na receptor, beta podjednotky (IL-2R $\beta$ , neboli CD122) a společné podjednotky gama ( $\gamma$ c neboli CD132). Vazbou IL-2 na alfa podjednotku receptoru dojde k aktivaci signálních kaskád STAT5, MAPK a PI3K [90].

CD25 receptor není unikátní pouze pro regulační T lymfocyty, ale je ve zvýšené míře exprimován na aktivovaných efektorových T lymfocytech.

Klíčovou úlohu pro Treg během vývoje v thymu a pro regulaci jejich funkce hraje transkripční faktor „Forkhead box P3“ (Foxp3). Bývá také označován jako „master regulator“. Foxp3 moduluje rozdílnou odpověď na stimulaci TCR u regulačních a u efektorových T lymfocytů. Gen pro Foxp3 je lokalizován na X chromozómu. Samotný transkripční faktor Foxp3 má tři základní funkční domény, které ovlivňují celou řadu biologických procesů. Foxp3 pozitivita je vysoce specifická pro  $CD4^+25^+$  thymocyty a

pro myší periferní T regulační buňky. U lidí je exprimován Foxp3 i na jiných než periferních regulačních T lymfocytech včetně nádorových buněk [105], což zároveň s intracelulární lokalizací tohoto znaku limituje jeho použitelnost pro izolaci a studium subpopulace regulačních buněk u pacientů [87-89, 106]. V nádorovém mikroprostředí se nacházejí Treg s různou mírou exprese Foxp3. Ve vztahu k expresi molekuly CD45RA se rozdělují na 3 frakce: 1) frakce I – Foxp3<sup>lo</sup> CD45RA<sup>hi</sup> – nazývaná naivní Treg (nTreg), která se po antigenní stimulaci diferencuje do frakce II - Foxp3<sup>hi</sup>CD45RA<sup>-</sup> efektorové Treg (eTreg), které jsou terminálně diferencované, vysoce imunosupresivní a funkčně stabilní. Naopak frakce III - Foxp3<sup>lo</sup>CD45RA<sup>-</sup> jsou buňky, které nevykazují žádnou inhibiční aktivitu a mohou produkovat prozánětlivé cytokiny [107, 108].

Na povrchu Treg nacházíme celou řadu dalších znaků zodpovědných za inhibiční a modulační signály, nejvíce prostudované jsou molekuly CD28, CTLA-4 a GITR. CD28 (všeobecně známý kostimulační receptor na konvenčních T lymfocytech) je zároveň nezbytný pro vývoj Treg v thymu, kde CD28 kostimulace vyvíjejících se thymocytů indukuje expresi Foxp3, tedy nezávisle na produkci IL-2 [106, 109].

CTLA-4 je tzv. Counter-receptor pro skupinu B7 kostimulačních molekul (CD80, CD86) exprimovaný na APC. Na rozdíl od CD28, působí CTLA-4 při vazbě na CD80,CD86 inhibičně a indukuje produkci indolamin-2,3-dioxygenázy (IDO). Výsledkem je katabolismus tryptofanu, jeho lokální deplece a negativní regulace imunitní odpovědi [110].

Dalším povrchovým znakem, využitelným pro detekci Treg je molekula CD127,  $\alpha$ -řetězec receptoru pro IL-7, kdy Treg jsou CD127<sup>low</sup> populace a konvenční T buňky jsou CD127<sup>high</sup>. Povrchová exprese CD127 zároveň negativně koreluje s Foxp3. CD127 se zdá být využitelná pro průkaz lidských Treg pro funkční studie a potenciální terapeutické využití [111].

Další možností, jak přesně odlišit Treg od konvenčních T lymfocytů je DNA analýza. Treg vykazují demethylaci v regionu určeném pro Foxp3 gen (TSDR, Treg specific-demethylated region) [112].

Regulační funkce Treg je zprostředkována dvěma způsoby: a) sekrecí inhibičních cytokinů a b) přímým kontaktem. Treg mohou také působit nepřímo, prostřednictvím ovlivnění dendritických buněk [88].

Mezi hlavní inhibiční cytokiny patří IL-10 a TGF- $\beta$ . Jejich imunosupresivní efekt byl mnohokrát prokázán v *in vitro* i *in vivo* experimentech či modelech [113, 114]. Treg se také podílejí na produkci adenosinu v nádorovém mikroprostředí, který pak působí velmi silně imunosupresivně [82]. Produkce adenosinu je zprostředkována povrchově vázanými enzymy – CD73 – ecto-5-nukleotidázy, která je exprimovaná zároveň s CD39 – exonukleosid trifosfát difosfohydrolázou-1. Obě štěpí extracelulární nukleotidy a produkují v bezprostředním okolí buňky vysokou koncentraci adenosinu. Adenosin se poté naváže na inhibiční A2A receptor aktivovaných efektorových T buněk [83].

Na jiném principu funguje mechanismus takzvané metabolické disrupce. Tento pojem zahrnuje konzumpci IL-2. Treg exprimují trimerickou formu receptoru pro IL-2 (podjednotky alfa, beta a gama), ke které má IL-2 mnohonásobně (až 1000x) vyšší afinitu, což vede k jeho konzumpci, a tím snížení lokální dostupnosti pro dělicí se efektorové buňky [115].

Inhibiční kontakt mezi buňkou regulační a efektorovou je zprostředkován celou řadou mechanismů [116-118]. Cytolytický mechanismus při přímém kontaktu buněk je zprostředkován zejména interakcí granzymu A, B a perforinu s molekulou CD18 [119]. Tento mechanismus byl prokázán při ovlivnění funkce jak B lymfocytů, tak i NK buněk a cytotoxických T lymfocytů [120, 121].

Přímý mezibuněčný kontakt může vést ke spojení dvou buněk prostřednictvím „gap junction“ a tím transmembránového přenosu cAMP (cyklický adenosin monofosfát) do cílové T buňky [122].

Dalším možným mechanismem je vzájemné ovlivňování Treg a plasmocytoidních dendritických buněk (pDCs) a dalších antigen prezentujících buněk, které jsou nezbytné pro aktivaci efektivní T lymfocytární odpovědi [123, 124]. V tomto případě působí Treg inhibičně prostřednictvím vazby CTLA-4 na ko-stimulační molekuly CD80 nebo CD86 a produkci indolamin-2,3-dioxygenázy (IDO) [125, 126].

- Makrofágy (M1 vs. M2)

Dalším významným regulátorem nádorového mikroprostředí jsou makrofágy, nazývané TAM (tumor associated macrophages). Makrofágy jsou velmi zajímavou a různorodou součástí imunitního systému. Vznikají v kostní dřeni, jako monocyty cirkulují v periferní krvi a po vycestování dozrávají v tkáních. Svůj fenotyp mění podle prostředí,

ve kterém se nachází. Jsou popsány dva typy makrofágů. M1 aktivace, tzv. klasická, je charakterizovaná produkcí IL-12 a IL-23 a aktivuje Th buňky a APC. V nádorovém mikroprostředí však dochází zejména pod vlivem IL-4, IL-8, IL-10 a IL-13 k alternativní aktivaci typu M2. M2 působí protizánětlivě, podporují růst nádorů, stimulují nádorovou neoangiogenezi (produkce VEGF). M2 dále produkují imunosupresivní cytokiny IL-10 a TGF $\beta$  nebo růstové faktory (např. EGF). Zastoupení M2 v nádorovém mikroprostředí je spojováno s tendencí k metastazování a je asociováno s horší prognózou u řady malignit [127-131].

- MDSC (myeloid-derived suppressor cells)

V poslední době v souvislosti s nádorovou imunologií jsou MDSC uváděny jako velmi zajímavá skupina buněk. Jedná se nezralé myeloidní buňky, které vznikají v kostní dřeni a akumulují se v nádorové tkáni, kde potlačují imunitní odpověď. Na rozdíl od myších MDSC, které exprimují znaky Ly6C, Ly6G a CD11, bylo dlouho u lidí obtížné MDSC přesně identifikovat. Exprimují znaky Gr-1, CD11b, CD33 a teprve nedávno byl objeven znak LOX-1 (Lectin-type oxidized LDL receptor 1), který je exprimován pouze na lidských MDSC [132]. Primárně se MDSC akumulují v tkáních chronického zánětu, kam jsou atrahovány prostaglandinem E2, IL-6 a VEGF a svým působením uvolňují hodně IL-10. Tím inhibují imunitní reakci a mohou přispívat i k nádorovému růstu. Vysoká koncentrace IL-10 stimuluje tvorbu M2 makrofágů a mění T buněčnou diferenciaci směrem k Th2 populaci, která je v obraně proti nádorům méně účinná [133].

- Fas / Fas-L

Interakce molekuly Fas s ligandem Fas-L jsou základními regulačními mechanismy imunitního systému, který tímto způsobem brání organismus před přehnanou či příliš dlouho trvající imunitní odpovědí. Po vazbě ligandu na molekulu Fas (CD95) dochází ke spuštění apoptotické signální kaskády. Imunitní buňky, aktivované T lymfocyty, nesou na svém povrchu jak Fas, tak Fas-L. Ligand využívají na odstranění cílových buněk tím, že aktivují apoptózu v cílové buňce. Stejný mechanismus T buňky využívají k ukončení nepotřebné / nadbytečné imunitní odpovědi. Naopak řada nádorů exprimuje Fas-L na svém povrchu nebo uvolňuje solubilní Fas-L do mikroprostředí. Po kontaktu s efektorovou buňkou spouští navázání Fas-L apoptózu. Je to jedna z velmi dobře prozkoumaných a popsaných únikových strategií nádorů [133].

### 2.2.3. Principy nádorové imunoterapie

V současné době je imuno-onkologická léčba založena na několika různých základních přístupech a na jejich kombinacích. Můžeme je rozdělit jak z hlediska použitého efektoru (monoklonální protilátka, inhibitor, buňka) nebo z hlediska ovlivňované struktury či procesu. Pro účely této práce bude použito druhé rozdělení:

#### 2.2.3.1. Blokace růstových faktorů nebo jejich receptorů

V ORL onkologii je nejvíce využívána blokace receptoru pro epidermální růstový faktor (EGFR) monoklonálními protilátkami. Nejdříve a nejvíce používaný je cetuximab (Erbix), chimérická IgG1 protilátka. Velké očekávání a nadějně výsledky byly publikovány Bonnerem [40, 41], kdy v kombinaci s radioterapií u pacientů s lokálně pokročilým HNSCC (stádium III a IV) znamenala terapie cetuximabem významně lepší lokoregionální kontrolu onemocnění, delší celkové přežití i délku období do progresu onemocnění v průběhu 54 měsíců sledování. Inhibitory EGFR signální kaskády (tyrozin-kinázové inhibitory) pro HNSCC neprokazují účinnost [134] a neovlivňují prognózu pacienta. Efekt cetuximabu proti EGFR bude velmi pravděpodobně podmíněn jak zablokováním signální funkce receptoru, tak i opsonizačním mechanismem (ADCC – antibody-dependent cellular cytotoxicity, navázaná protilátka označí cílovou buňku pro snazší nalezení imunitním systémem). Význam funkčního imunitního systému je zdůrazněn i dalšími studiemi za použití jiných monoklonálních protilátek proti EGFR (nimotuzumab – chimérická protilátka; panitumumab – plně humanizovaná protilátka), které neprokazují zlepšení celkového přežití, ale pouze prodloužení období do progresu onemocnění [135, 136]. Naopak studie EXTREME [137] prokázala prodloužení celkové přežití kombinací cetuximabu s karbo či cisplatinou a 5-fluorouracilem. Rozdíl je z imunologického hlediska vysvětlitelný jinou strukturou monoklonální protilátky, kdy plně humanizovaná protilátka nevede k současné prezentaci dendritickým buňkám a NK buňkám [138]. Různá efektivita terapie proti EGFR naznačuje možnost či nutnost využít ještě jiný biologický mechanismus v kombinaci s blokací EGFR k efektivnímu ovlivnění růstu HNSCC [138]. Možným způsobem by mohlo být kombinované ovlivnění více růstových faktorů. Druhým nejčastěji využívaným cílovým růstovým faktorem je VEGF (vascularized endothelial growth factor), resp. jeho receptor. Monoklonální protilátka směřovaná proti tomuto receptoru se nazývá bevacuzimab (rekombinantní humanizovaná IgG1

protilátka). Ve II. fázi klinického testování byla prokázána dobrá tolerance kombinace cetuximabu a bevacizumabu s cisplatinou v konkomitantním režimu s radioterapií a celkové přežití testované skupiny bylo velmi nadějně, v dvouletém sledování dosahovalo 92% [139]. Výsledky v delším časovém odstupu nejsou zatím publikovány.

#### 2.2.3.2. Terapie cytokiny

V oblasti onkologie HNSCC jsou s přímým použitím cytokinů větší zkušenosti pouze se s IL-2 a s kombinací cytokinů pod zkratkou IRX-2. IL-2 byl podáván jak systémově tak aplikací do okolí nádoru. Aplikací IL-2 do okolí nádoru bylo dosaženo zvýšeného množství infiltrujících T lymfocytů v nádorovém mikroprostředí a zvýšení CD8+ lymfocytů a NK buněk v periferní krvi u inoperabilních HNSCC [140]. V III. fázi klinické studie perilymfatická aplikace IL-2 následovaná operací a radioterapií vedla k 25 % zlepšení pětiletého celkového přežití u pacientů s nádorem dutiny ústní nebo oropharyngu [141]. Systémová aplikace se naopak ukázala jako méně vhodná, v léčbě refrakterních karcinomů nosohltanu nebyl prokázán žádný terapeutický efekt intravenosního podání IL-2, ale naopak došlo ke zvýšení toxicity léčby [142]. IL-2 je i součástí cytokinového mixu označeného IRX-2, který se dále skládá ještě z IL-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , G-CSF a GM-CSF. V současné době probíhá velká mezinárodní studie III. fáze, která by měla potvrdit slibné výsledky II. fáze. Při lokální aplikaci do okolí postižených lymfatických uzlin 10 dnů před plánovanou operací došlo ke změnám lymfocytárních populací v periferní krvi [143]. Bylo prokázáno zlepšení celkového 5 letého přežívání, korelující se zvýšenou lymfocytární infiltrací v nádorové tkáni [144].

#### 2.2.3.3. Terapeutické vakcíny

Cílem terapeutické protinádorové vakcinace je regrese nádoru aktivací adaptivní imunitní odpovědi. Za použití adjuvans (látky zesilující sílu imunitní odpověď) jsou TAA a/nebo TSA antigeny ve formě peptidů prezentovány v komplexu s MHC gp molekulou na APC. Vakcinaci lze využít před vznikem nádorového onemocnění, pak hovoříme o profylaktické vakcinaci. Nejvíce pokročilé jsou profylaktické vakcíny proti HPV, založené na principu prevence vzniku virové infekce v epiteliálních buňkách pomocí protilátkové odpovědi namířené proti virovým kapsidovým proteinům, které jsou dnes již běžně využívány k prevenci karcinomu děložního hrdla [145].

Tuto vakcínu ale není možné využít k léčbě již probíhající infekce virem HPV nebo onemocnění asociovaných s touto infekcí. V těchto případech vyžaduje léčba aktivaci

buněčné imunity, převážně CD4+ a CD8+ T lymfocytů, které dokáží rozpoznat a eliminovat buňky infikované virem.

Pro vývoj imunoterapeutických protokolů je klíčové identifikovat pro daný nádor specifické antigeny, které by určovaly specifitu požadované imunitní odpovědi. Vhodným modelem by mohly být virové onkoproteiny E6 a E7. Jednak jsou tyto virové proteiny pro tělo cizí, a tudíž více imunogenní v porovnání s vlastními mutovanými proteiny (například protein p53). Jsou navíc exprimovány všemi virem infikovanými buňkami, tudíž každou nádorovou buňkou, pokud se jedná o nádor HPV indukovaný. Vzhledem k tomu, že jsou E6 a E7 proteiny vyžadovány pro vznik a zachování maligního fenotypu, jsou nepřetržitě exprimovány nádorovými buňkami a nádorové buňky nemohou jejich expresi utlumit pod selekčním tlakem imunitního systému [146]. S terapeutickými vakcínami u HPV pozitivních HNSCC jsou zatím jen omezené zkušenosti, na malých skupinách pacientů [147, 148]. Jako terapeutická vakcinace může fungovat i podkožní aplikace radioterapií imortalizovaných vlastních nádorových buněk v kombinaci s BCG (bacillus Calmette-Guerin) a následná stimulace odpovědi aplikací IL-2 do oblasti spádových lymfatických uzlin [149]. Zajímavé výsledky přinesla II. fáze klinické studie testující přístup založený na podání vakcíny obsahující HPV16 E6 a E7 peptidy, která byla podávána pacientkám s vulvární intraepiteliální neoplázií (VIN). Kompletní klinická odpověď byla detekovatelná u téměř poloviny souboru pacientek, u všech se jednalo o T buněčnou odpověď indukovanou podáním vakcíny [150].

#### 2.2.3.4. DC vakcíny

Dalším typem vakcín jsou vakcíny založené na dendritických buňkách. Z periferní krve pacienta separované monocyty se kultivací mění v nezralé dendritické buňky. Těm jsou v *in vitro* podmínkách předloženy antigeny odpovídající antigennímu profilu daného nádoru. V různých studiích a experimentech jsou antigeny získávány různě. V rámci personalizované medicíny se může jednat o antigeny získané z vlastního nádoru pacienta, dále se může jednat o směs antigenů z tkáňových linií daného nádorového typu, mohou být ale i konstruovány *in vitro* na základě znalosti spektra neoantigenů získaného sekvenací genomu z nádorové tkáně [151]. Po kultivaci s příslušnými antigeny a vybranými cytokiny jsou stimulované a vyztřelé dendritické buňky navraceny zpět do těla pacienta, aby mohly fungovat jako APC a posilovat imunitní odpověď proti danému nádoru. V klinické praxi jsou nejvíce zavedené DC vakcíny v terapii melanomu, prostatických karcinomů, karcinomu prsu a ovariálních karcinomů [152].

V rámci HNSCC jsou zatím zkušenosti s DC vakcínami omezené, ale byla prokázána možnost indukovat imunitní odpověď v podobě dlouhodobě cirkulujících specifických T lymfocytů [153]. V rámci I.fáze klinické studie byla 16 pacientům podána DC vakcína směřující proti p53 peptidu. Terapie byla dobře snášena a u 69 % pacientů byla následně detekovatelná T buněčná specifická odpověď, se sníženou hladinou Treg [154]. Jednodušší schéma bylo použito v rámci I. fáze jiné studie, kdy pacientům s pokročilým stádiem HNSCC nebo po prokázání recidivy byly separovány z periferní krve PBMC (peripheral blood mononuclear cells), sloužící jako APC. Následně byly *in vitro* stimulovány peptidy E6 a E7 HPV 16 a poté aplikovány zpět pacientům intravenosně v celkem 4 dávkách v odstupu týdnů [155].

#### 2.2.3.5. T-buněčná terapie

T-buněčná imunoterapie nebo-li adoptivní T buněčný transfer je technikou, kdy vlastní T buňky jsou stimulovány *in vitro* a po stimulaci jsou navraceny zpět do organismu pacienta. Ke stimulaci či jinému funkčnímu ovlivnění je využívána celá řada způsobů. Mohou být získány TIL (tumor infiltrating lymphocytes), mohou být použity *ex vivo* modifikované T lymfocyty fúzí se synteticky připraveným T buněčným receptorem nebo s chimerickým receptorem proti příslušnému antigenu (CAR T lymfocyty). Adoptivní transfer byl testován také u pacientů s pokročilým karcinomem nosohltanu exprimujícím EBV (Epstein-Barr virus) antigeny. T lymfocyty rozpoznávající EBV antigeny byly aktivovány a expandovány pomocí EBV-transformovaných buněk. Léčba byla pacienty dobře snášena, přičemž 60 % pacientů vykazovalo kontrolu progresu onemocnění [156].

Zásadním problémem adoptivní T-buněčné terapie je relativně malý počet reaktivních T-lymfocytů, které proti antigenům nádoru vytváří sám pacient. Technologicky velmi složitou, ale díky pokrokům vědy [157] již proveditelnou metodu představili Schumacher a Schreiber [151]. Jedná se o individuální imunoterapeutický přístup, který se jeví jako slibný pro budoucí použití v rámci personalizované medicíny.

Z experimentálních prací je zřejmé, že z biopsie z nádoru je možné provést sekvenování genomu (NGS, next generation sequencing), resp. exomu. Po nalezení celé řady somatických mutací je sofistikovaným filtrováním vytipována skupina potenciálních neoantigenů – epitopů, které budou exprimovány na MHC gp molekulách nádorových buněk [158]. TIL pak mohou být *in vitro* stimulovány proti celé skupině vybraných antigenů. Po jejich navrácení zpět do organismu pacienta může být průběh imunitní

reakce ještě podpořen pomocí zablokování regulačních molekul (checkpoint molecules), např. monoklonálními protilátkami proti PD-1, CTLA-4, Tim-3. Celý proces zatím zní příliš složitě a pro běžné použití v klinické praxi příliš nedostupně, ale s rozšiřující se dostupností technologií (NGS) a znalostí se v relativně krátké době může stát realitou moderní imuno-onkologie a personalizované medicíny. Množství somatických mutací v jednotlivých nádorových lokalizacích či typech se liší poměrně značně. Mezi nádory s nejmenším počtem mutací patří AML (akutní myeloidní leukémie) a ALL (akutní lymfatická leukémie), naopak mezi nádory s největším počtem mutací patří melanom, plicní dlaždicobuněčný karcinom a adenokarcinom a karcinom žaludku. Také nádory hlavy a krku patří k nádorům s větším počtem somatických mutací [151, 159, 160].

#### 2.2.3.6. Blokace regulačních bodů imunitní reakce (immune checkpoints)

Jak již bylo zmíněno v předchozích částech práce, použití monoklonálních protilátek ovlivňujících regulační body imunitního systému se stalo nejzajímavější a nejnadějnější oblastí klinické i experimentální imuno-onkologie. Pro některá onemocnění a pro část pacientů může tato léčba znamenat zásadní zvrát ve vývoji či rychlosti progresu jejich onemocnění a vést i u velmi pokročilých stádií k dlouhodobé stabilizaci onemocnění [67, 68].

Pro nádory hlavy a krku jsou nyní testovány a do praxe uváděny tyto protilátky blokující regulační body (upraveno podle [161, 162]):

- Ipilimumab – IgG1 monoklonální protilátka namířená proti CTLA-4 – aktuálně ve III. fázi (v kombinaci s nivolumabem)
- Tremelimumab – IgG2 monoklonální protilátka namířena proti CTLA-4 – aktuálně probíhá III. fáze
- Durvalumab – IgG1 monoklonální protilátka namířená proti PD-L1 – aktuálně probíhá III. fáze (v kombinaci s Tremelimumabem)
- Pembrolizumab – IgG4 protilátka namířena proti PD-1 – II. fáze, uzavřeno, čeká se na výsledky
- Nivolumab – IgG4 protilátka namířena proti PD-1 – III. fáze, ukončeno předčasně

Poslední z uvedených protilátek – nivolumab – byla testovaná ve III. fázi klinické studie pod názvem CheckMate 141. Randomizovaná studie III. fáze srovnávala celkové přežití

u recidivujícího či metastatického HNSCC. Studie byla v průběhu roku 2016 předčasně zastavena [162] neboť bylo v průběhu předčasně dosaženo cíle. Výsledky jednoznačně prokázaly, že v ramenu léčeném monoterapií nivolumabem bylo celkové přežití mnohem lepší než u kontrolní skupiny, kde pacienti dostali adekvátní dostupnou terapii dle volby lékaře. Dle protokolu bylo randomizováno celkem 361 pacientů, se selháním primární léčby. Ve skupině léčené nivolumabem bylo o 30 % sníženo riziko úmrtí v důsledku progresse onemocnění v průběhu 7,5 měsíců sledování. Lepší odpověď na léčbu nivolumabem byla ve skupině pacientů, u kterých byla na povrchu nádoru detekovatelná přítomnost PD-L1 na více než 1 % buněk. Lepší přežití bylo zaznamenáno i u pacientů s HPV pozitivním nádorem, ale účinnost nivolumabu nebyla na přítomnosti PD-L1 ani na HPV pozitivitě nádoru závislá [163, 164]. Jedná se o první studii III. fáze, která prokázala obdobně nadějně a slibné výsledky u HNSCC, srovnatelné jako u některých dalších maligních onemocnění. Na základě i této studie se dá předpokládat, že imunoterapie se stane čtvrtou léčebnou modalitou pro HNSCC.

### **3. Cíle práce**

Cílem habilitační práce je shrnutí poznatků z publikovaných prací, doplněné o nejaktuálnější, dosud nepublikované výsledky, které se věnují imunitnímu systému pacientů s dlaždicobuněčnými karcinomy hlavy a krku (HNSCC). Jednotlivé parametry jsou analyzovány ve vztahu ke zdravé populaci a při srovnání skupin pacientů s různou etiologií HNSCC. Jsou hodnoceny parametry imunitního systému získané z periferní krve, z nádorového mikroprostředí a ze zdravých i v metastaticky postižených lymfatických uzlin. Je hodnoceno zastoupení nádorových buněk exprimujících znaky nádorových kmenových buněk, v korelaci s ostatními sledovanými imunologickými a klinicko-patologickými parametry. Multivariantní regresní analýzou jsou jednotlivé parametry hodnoceny ve vztahu k prognóze onemocnění.

## **4. Přehled metodiky**

Vzorky dlaždicobuněčných karcinomů hlavy a krku, vzorky metastaticky postižených a zdravých lymfatických uzlin a vzorky periferní krve byly získány od pacientů léčených na Klinice otorhinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku, 1.LFUK a FN v Motole.

Vzorky tkání byly odebírány vždy v rámci plánovaného chirurgického výkonu a jejich odběr byl podmíněn písemným souhlasem pacienta, vzorky periferní krve byly odebírány jak před plánovaným chirurgickým výkonem, tak v průběhu ambulantní dispenzarizace pacientů, odběry byly taktéž podmíněny písemným souhlasem pacienta. Kontrolní skupina pacientů sestávala se zdravých dárců krve, jejichž vzorky byly získány z Transfuzní stanice nemocnice Benešov, využití vzorků pro vědecké účely bylo podmíněno písemným souhlasem dárce.

Vzorky byly zpracovány v Laboratoři průtokové cytometrie Kliniky dětské hematologie a onkologie 2.LFUK a FN v Motole, v laboratoři nádorové imunologie Mikrobiologického ústavu AV ČR, v.v.i., v Ústavu imunologie 2.LFUK a FN v Motole a v Národní referenční laboratoři pro papillomaviry Ústavu hematologie a krevní transfuze. Data byla korelována s výsledky standardních patologických vyšetření provedených na Ústavu patologie a molekulární medicíny 2.LFUK a FN v Motole.

Vzorky periferní krve a vzorky primárních nádorů, lymfatických uzlin zdravých i metastatických byly po homogenizaci hodnoceny metodou vícekanálové průtokové cytometrie po značení monoklonálními protilátkami proti sledovaným znakům (CD3, CD8, CD11c, CD14, CD16, CD19, CD20, CD45, CD45RA, CD45RO, CD56, CD62L, CD4, CD123, HLA-DR, CCR7). Jednotlivé buněčné populace byly hodnoceny na základě exprese těchto parametrů: Plazmatické buňky: mDCs - CD45<sup>+</sup>LIN<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup>CD11c<sup>+</sup>, pDCs - CD45<sup>+</sup>LIN<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup>, monocyty/makrofágy - CD45<sup>+</sup>LIN<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> a naivní T lymfocyty jako CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD45RO<sup>-</sup>CCR7<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>, Treg – CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>.

Etiologie nádorů ve vztahu k HPV byla určována kombinací parametrů – imunohistochemická detekce p16 v nádorových tkáních (hodnoceno na Ústavu patologie a molekulární medicíny 2. LFUK a FN v Motole). Značení bylo prováděno monoklonální protilátkou proti p16INK4 a hodnocena byla intenzita značení (na 1 až 3 kříže) v jádrech a cytoplazmě buněk. Jako p16 pozitivní byl hodnocen nádor, kdy více než 50% buněk vykazuje jadernou a / nebo cytoplazmatickou expresi. Po izolaci DNA a RNA z fixovaných tkání nádorů byla PCR detekována přítomnost HPV DNA a amplifikována mRNA onkoproteinu E6 HPV 16.

Analýza cytokinů a chemokinů (IL-1b, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-17, IL-21, IL-23, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , CCL5, CCL17, CCL19, CCL20, CCL21, CCL22, CXCL9, CXCL10, CXCL12) v nádorovém mikroprostředí byla prováděna pomocí Quantibody Array Kit (Raybiotech) ze supernatantů získaných ze suspenze nádorových vzorků. Buněčná suspenze byla nejprve kultivována 24h po stimulaci PMA (Phorbol 12-myristate 13 acetate) a/nebo ionomycinem a poté zamražena do zpracování.

Statistické hodnocení probíhalo korelací výsledků a klinických dat za použití softwaru Statistica 10.0, za použití těchto testů: párový t-test, Kolmogorov–Smirnovův test normality, Welchův ANOVA test, multivariátní Coxova regresní analýza, Kaplan-Meierova analýza přežití, použití jednotlivých testů bylo navrženo a hodnoceno profesionálním statistikem.

## **5. Souhrn výsledků**

(odkazy na publikace autora habilitační práce, které obsahuje příloha, jsou uvedeny tučně)

### Regulační T lymfocyty (Treg)

Treg jsou přirozenou regulační složkou imunitního systému, která za fyziologických podmínek brání rozvoji příliš silné imunitní reakce nebo autoimunitní reakce. Inhibiční mechanismy Treg se uplatňují za patologických podmínek v umožnění růstu maligních nádorových onemocnění [105]. Význam Treg byl prokázán i pro HNSCC. Ve srovnání se zdravou populací jsou Treg zvýšeně zastoupeny v periferní krvi pacientů (**Bouček, 2010**; [98-101, 165]). Zvýšené zastoupení v periferní krvi koreluje s vyšším rizikem časně recidivy HNSCC (**Bouček, 2010**), naopak u nádorů oropharyngu může být zvýšené zastoupení společně s HPV pozitivitou nádoru pozitivním prognostickým znakem (**Lukešová, 2014**; [166, 167]). Negativní působení Treg na HNSCC se uplatňuje zejména v nádorovém mikroprostředí, kde dochází k jejich akumulaci [95-97]. Při porovnání zastoupení Treg v nádorovém mikroprostředí nádorů asociovaných s HPV a nádorů vzniklých na podkladě jiné etiologie, je zastoupení Treg vyšší v tkáni HPV pozitivních nádorů (**Partlová, 2015**). V regresní analýze zastoupení Treg infiltrujících HNSCC nekoreluje s prognózou pacientů (Bouček, 2017; [168]). Z terapeutického hlediska bylo prokázáno, že Treg jsou hlavní překážkou pro imunoterapii a aktivní vakcinaci HNSCC [169].

### Th17 lymfocyty

Jedná se o skupinu pomocných T lymfocytů, které jsou typické produkcí IL-17. Jsou nejvýznamnější složkou slizniční imunity, kdy se podílejí na udržení homeostázy při povrchovém kontaktu střevní mikroflóry a slizničního povrchu [170]. Zatím ne zcela jasný je význam Th17 lymfocytů pro imunitní reakce v nádorovém mikroprostředí, kdy je jejich působení spojováno jak s pozitivním, tak i s negativním efektem na růst nádoru [171, 172]. Pravděpodobně záleží na fázi růstu nádoru a na vlivech nádorového mikroprostředí. Je prokázána funkční souvislost mezi Treg a Th17, kdy pod vlivem TGF- $\beta$ , IL-6, IL-23 a IL-12 se v sebe mohou navzájem přeměňovat [170]. Rovnováhu mezi Treg a Th17 ovlivňuje složení střevní mikroflóry, přímo i nepřímo zasahující do

regulace protinádorové odpovědi [170, 173, 174]. Při porovnání zastoupení Th17 v nádorovém mikroprostředí nádorů asociovaných s HPV a nádorů vzniklých na podkladě jiné etiologie, není v zastoupení Th17 statisticky signifikantní rozdíl, a to ani v relativním, ani v absolutním počtu (**Partlová, 2015**; [175]). V regresní analýze Th17 infiltrace v nádorovém mikroprostředí HNSCC koreluje signifikantně negativně s prognózou pacientů (Bouček, 2017; [168]).

#### Naivní T lymfocyty

Naivní T lymfocyty se vyvíjejí v kostní dřeni a úspěšně musí projít pozitivní i negativní selekci v thymu. Poté cirkulují v periferní krvi před tím, než vycestují do tkání. Na svém povrchu nesou znaky jak  $CD4^+$ , tak  $CD8^+$  a dále L-selectin (CD62L) a naopak postrádají aktivační znaky CD25, CD44 či CD69 a nemají znak paměťových buněk CD45RO. Po setkání s antigenem (prezentovaným na molekule MHC gp I. třídy (pro  $CD8^+$ ) nebo II. třídy (pro  $CD4^+$ ) a navázání na jejich TCR (receptor T lymfocytů) dojde k aktivaci, diferenciaci a proliferaci. Průběh aktivační reakce je regulován aktivačními a regulačními molekulami, které zajišťují takzvaný druhý signál. U pacientů s HNSCC je hladina naivních  $CD4^+$  T lymfocytů ( $CD4^+CD45RA^+$ ) v periferní krvi nižší ve srovnání se zdravou populací (**Bouček, 2010**; Bouček, 2017; [168]). Hladina naivních  $CD4^+$  T lymfocytů koreluje s T stádiem onemocnění, kdy se stoupajícím T stádiem se v periferní krvi jejich hladina signifikantně zvyšuje (**Bouček, 2010**). Vyšší zastoupení naivních  $CD4^+$  T lymfocytů koreluje v regresní analýze s pozitivní prognózou onemocnění (Bouček, 2017; [168]). Infiltrace nádorového mikroprostředí naivními  $CD4^+$  lymfocyty se signifikantně liší i u HPV pozitivních a HPV negativních nádorů, kdy u HPV asociovaných nádorů je zastoupení signifikantně vyšší (**Partlová, 2015**).

#### Tc17 lymfocyty

Tc17 je subpopulace  $CD8^+$  T lymfocytů, která produkuje IL-17. Vznikají pod vlivem IL-6 a TGF- $\beta$ . Lidské Tc17 se od myších odlišují tím, že všechny Tc17 nesou na svém povrchu CD161, což je znak exprimovaných na jejich prekurzorech již v pupečnickové krvi [176]. Jejich hladina v periferní krvi ani v nádorové tkáni nekoreluje s prognózou pacienta (Bouček, 2017; [168]), ale po rozdělení nádorů do skupin dle etiologie je signifikantně zvýšené zastoupení Tc17 v tkáních HPV pozitivních nádorů (**Partlová, 2015**).

## CD8<sup>+</sup> lymfocyty

CD8<sup>+</sup> lymfocyty jsou hlavní složkou adaptivní imunitní odpovědi, která se po rozpoznání antigenního cíle a po aktivaci, diferenciaci a proliferaci podílí na likvidaci cílových buněk. K aktivaci adaptivní odpovědi je potřeba časový prostor, ale její efektivita je největší a zároveň je ale i velmi přesně řízena. Negativních regulačních mechanismů využívá i celá řada nádorů, čímž je pak umožněn jejich vznik či růst. U pacientů s HNSCC jsou CD8<sup>+</sup> lymfocyty zvýšeně zastoupeny v periferní krvi ve srovnání se zdravou populací (Bouček, 2017; [168]), ale jejich hladina v periferní krvi není prognosticky významná (Bouček, 2017; [168]). Naopak v nádorové tkáni je infiltrace CD8<sup>+</sup> T lymfocyty prognosticky významným pozitivním faktorem [166]. Pokud jsou porovnávány skupiny HPV pozitivních a HPV negativních nádorů, pak HPV asociované nádory jsou signifikantně více infiltrovány CD8<sup>+</sup> T lymfocyty, které jsou schopné produkovat IFN- $\gamma$ , tedy vyvinout efektivní imunitní reakci (**Partlová, 2015**).

## Dendritické buňky

Dendritické buňky jsou hlavní antigen prezentující buňky (APC), tedy buňky, které zpracují antigenní materiál a poté jednotlivé antigeny vystaví na svém povrchu ve vazbě na MHC gp molekuly. Jako nematurované cirkulují v periferní krvi a vycestovávají do tkání, po aktivaci migrují do lymfatických uzlin, kde vyžívají. Zde mohou rozpoznat T lymfocyty a po získání ko-stimulačních signálů zahájit imunitní reakci. Dendritické buňky tvoří propojení mezi vrozenou a adaptivní složkou imunitního systému. Rozdělují se na myeloidní (mDC) a plazmacytoidní (pDC), odlišují se exprimovanými znaky a produkují odlišné cytokiny. Myeloidní dendritické buňky jsou nejčastěji detekovány jako CD45<sup>+</sup>LIN<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup>D14<sup>-</sup>CD11c<sup>+</sup> a vyznačují se produkcí IL-12. Naopak plazmacytoidní dendritické buňky jsou detekovány jako CD45<sup>+</sup>LIN<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup> a typická je pro ně produkce IFN- $\gamma$ . V nádorové tkáni HNSCC jsou mDC i pDC zastoupeny ve zvýšené míře, větší zastoupení je v tkáních HPV pozitivních nádorů, ale pouze u mDC je rozdíl signifikantní (**Partlová, 2015**). Význam mDC pro vývoj onemocnění a prognózu zatím není pro HNSCC úplně zřejmý a je předmětem dalšího výzkumu.

## Cytokiny v nádorovém mikroprostředí

Nádorové mikroprostředí HNSCC je obecně považováno za imunosupresivní. Mezi imunitními buňkami velmi hojně infiltrujícími mikroprostředí HNSCC převažují buňky s imunosupresivní aktivitou. Ve vzorcích nádorů HNSCC byla prokázána vyšší hladina prozánětlivých cytokinů IL-2, IL-17, IL-23 and IFN- $\gamma$  a vyšší hladiny chemokinů CXCL9, CXCL10, CXCL12, CCL17 a CCL21 (**Partlová, 2015**). Z klinického hlediska je velmi zajímavá zvýšená hladina chemokinu CXCL12, jehož působením je stimulována migrační aktivita nádorových kmenových buněk a je prokázána větší tendence k metastazování [177-179]. U pacientů s HNSCC byl CXCL12 prokázán pouze u pacientů s metastatickým postižením, naopak jeho hladiny byly nulové, pokud nebylo diagnostikováno uzlinové metastatické postižení (**Partlová, 2015**). Pro pacienty s HNSCC byla dále prokázána významná korelace exprese CXCL12 a CXCR4 v nádorovém mikroprostředí s rostoucí pravděpodobností loko-regionální rekurence onemocnění a horší prognózou onemocnění [180, 181].

## Nádorové kmenové buňky u HNSCC

Nádorové kmenové buňky (CSC) tvoří malou populaci nádorových buněk, které vykazují podobné vlastnosti jako normální kmenové buňky, zejména schopnost vlastní obnovy a schopnost diferencovat ve všechny buněčné subpopulace, které jsou v nádoru nacházeny. CSC v různých stádiích vývoje tvoří různě velkou populaci, mohou být metabolicky méně aktivní a tedy rezistentnější na léčbu, mohou metastazovat a lokálně způsobovat recidivu onemocnění. Jednou z linií moderní onkologické terapie jsou léčiva cílená na CSC [182-186]. Pro překonání terapeutické rezistence CSC jsou syntetizovány makromolekulární systémy, například využívající polymerní HPMA (N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide) nosič (**Chytil, 2008; Říhová, 2008**). Zastoupení CSC se může významně lišit u nádorů stejné histopatologické typizace [187] a může ovlivňovat terapeutický přístup, například modifikovat radioterapeutický protokol [188]. CSC exprimují celou řadu molekul, které jim umožňují výše zmíněné chování. Rezistence na chemoterapii je dána zejména expresí MDR (multidrug resistance) transportérů, molekul, které z cytoplazmy odstraňují cizorodé látky. U řady CSC, včetně HNSCC je prokázána exprese MDR1, který umožní vyloučení cytotoxické barvičky Hoescht 33342 a na základě této vlastnosti je možné je sortovací průtokovou cytometrií vyselektovat jako tzv. side population [189, 190]. Takto vyselektovaná populace buněk pak ve zvýšené míře exprimuje znaky typické pro CSC, jako jsou CD29, cytokeratin 8 a

19 a Gal-1-BS (vazebného místa pro galectin-1) (Fik, 2014). CSC u HNSCC jsou dále charakteristické expresí povrchových znaků CD133, CD44 a genů *MET* a *SLC3A2*. Expresí proteinu CD44 a mRNA *MET* a *SLC3A2* statisticky významně koreluje s recidivou onemocnění [191, 192]. Dále koreluje zastoupení nádorových keratinocytů exprimujících CD133<sup>+</sup> buněk v primárních nádorech ve srovnání s metastaticky postiženými uzlinami i ve srovnání s kontrolními zdravými uzlinami (Bouček, 2017; [168]), korelací mezi gradingem onemocnění (G stádium) a zastoupením nádorových keratinocytů exprimujících CD44<sup>+</sup> buněk v nádorovém mikroprostředí (Bouček, 2017; [168]). Velmi zajímavé se ukazuje zastoupení CD133<sup>+</sup> buněk v primárním nádoru, které negativně korelovalo s N stádiem onemocnění, tedy větší zastoupení buněk exprimujících CD133<sup>+</sup> predikuje nižší metastatický potenciál (Bouček, 2017; [168]).

#### PD-1, Tim-3 a Cox-2 exprese

Význam regulačních molekul pro moderní imuno-onkologii byl vysvětlen v předchozích kapitolách. HNSCC jsou nádory s jedním z nejvyšších množství somatických mutací, tedy neoantigenů v nádorové tkáni [160], což je jeden z prognostických parametrů efektu anti-PD-1 terapie [193]. V korelaci s tím jsou i první výsledky III. fáze klinické studie, které prokázala profit pacientů s metastatickým nebo rekurentním, na platinové deriváty refrakterním HNSCC při terapii nivolumabem, protilátkou proti PD-1 receptoru [163]. Přestože dosavadní klinické výsledky použití inhibitorů imunoregulačních molekul, včetně blokování osy PD-1 a PD-L1, jsou velmi slibné, doposud nejsou úplně jasné prediktivní faktory, které by byly klinicky využitelné a umožnily spolehlivě vyselektovat pacienty, kteří z této léčby neprofitují, naopak jsou vystaveni riziku závažných nežádoucích účinků léčby. Podrobné informace o expresi regulačních molekul na buňkách nádorového mikroprostředí k tomuto pochopení přispívá. Expresí regulačních genů Cox-2, PD-1, PD-L1 a Tim-3 na úrovni mRNA je dalším parametrem lišícím se v závislosti na etiologii HNSCC. Expresí Cox-2 se výrazně liší ve zdravých a patologických tkáních. Velmi vysoká exprese je detekována v zánětlivých a nádorových lézích, kde prostřednictvím produkce prostaglandinů indukuje angiogenezi a nádorovou invazi [194]. U celé řady malignit je vysoká exprese Cox-2 asociována s negativní prognózou onemocnění [195-197]. U HNSCC je exprese Cox-2 signifikantně zvýšená v nádorovém mikroprostředí ve srovnání s kontrolními zdravými tkáněmi (Partlová, 2015; [198]) a míra exprese se zvyšuje se stupněm dysplazie premaligních lézí [198]. Významně se liší i exprese v závislosti na etiologii

onemocnění. U HPV negativních nádorů je signifikantně zvýšená exprese Cox-2, oproti HPV pozitivním nádorům (**Partlová, 2015**). Dále exprese mRNA Cox-2 negativně koreluje s hladinou infiltrujících Th1 a Th17 lymfocytů v nádorovém mikroprostředí (**Partlová, 2015**) a pozitivně koreluje s expresí mRNA Tim-3 (**Partlová, 2015**). Rozdíl mezi HNSCC v závislosti na etiologii je i v expresi PD-1, kdy u mRNA PD-1 je signifikantně zvýšená u HPV pozitivních nádorů. Pokud je exprese vztažena na zastoupení CD45 pozitivních buněk, pak v HPV pozitivních nádorech signifikantně převažuje exprese mRNA PD-1, naopak u Tim-3 je signifikantně nižší (**Partlová, 2015**). Funkčními esejemi bylo prokázáno, že se významně liší schopnost produkce IFN- $\gamma$  u CD8<sup>+</sup> TIL lymfocytů neexprimujících anti PD-1, ani Tim-3, exprimujících pouze PD-1 a ve srovnání s double pozitivní populací exprimující jak PD-1 tak i Tim-3. PD-1 i Tim-3 double pozitivní populace je schopná produkovat významně méně IFN- $\gamma$  než PD-1 i Tim-3 negativní populace i signifikantně méně než PD-1 pozitivní, Tim-3 negativní populace (**Partlová, 2015**).

## 6. Diskuze

Doposud nejvýznamnější změnou v onkologii hlavy a krku bylo v posledních přibližně 15 letech prokázání souvislosti části orofaryngeálních karcinomů s infekcí lidským papillomavirem (HPV), který je dnes považován za jeden z nejvýznamnějších rizikových faktorů [4]. Přesný mechanismus zvýhodňující z hlediska prognostického pacienta s HNSCC vzniklým na podkladě infekce HPV není jednoznačně objasněn, ale krom molekulárně-biologických mechanismů [6] je jedním z hlavních mechanismů odlišná schopnost protinádorových složek imunitního systému rozpoznat HPV pozitivní a HPV negativní buňky [199]. Při zhodnocení rozdílností jednotlivých parametrů imunitního systému dle etiologie nádoru, byly prokázány signifikantní rozdíly mezi HPV pozitivními a HPV negativními nádory v celé řadě parametrů. Jako imunologicky nejzajímavější a z hlediska terapeutického nejnadějnější se jeví odlišná exprese regulačních molekul PD-1 a Tim-3 (immune checkpoints) na imunokompetentních buňkách v nádorové tkáni a ovlivnění jejich funkčního stavu, resp. schopnosti efektivní protinádorové odpovědi, měřené jako produkce interferonu gamma (IFN- $\gamma$ ) a interleukinu 17 (IL-17). Blokace immune checkpoints je moderním trendem imuno-onkologie, který zlepšuje přežívání pacientů s pokročilými stádii řady maligních onemocnění, včetně HNSCC [162-164]. Exprese PD-1 receptoru na T buňkách je spojována jak s aktivovaným, tak i s takzvaným vyčerpaným fenotypem T buněk [200-202]. Přesný mechanismus účinku ani markery spolehlivě předpovídající, zda konkrétní pacient bude senzitivní k dané léčbě, zatím nejsou známy. Je prokázáno, že větší procento terapeutických odpovědí je dosahováno u nádorů s vyšším počtem somatických mutací [151], například melanomu, nemalobuněčného plicního karcinomu, nádorů močového měchýře, žaludku, jícnu, hlavy a krku nebo podskupiny kolorektálních karcinomů s vysokou mikrosatelitní nestabilitou (MSI high) [160, 203]. Zejména v situaci, kdy na léčbu odpovídá ne více než 20% pacientů napříč různými studiemi a léčba může mít závažné nežádoucí účinky a je finančně velmi náročná, je žádoucí přesně porozumět způsobu ovlivnění cílových buněk. U HNSCC není PD-1 molekula znakem pro vyčerpané či funkčně zablokované T lymfocyty, schopnost produkce IFN- $\gamma$  je vyšší u CD8<sup>+</sup> exprimujících PD-1 molekulu než u CD8<sup>+</sup> PD-1 negativních. Významné snížení produkce IFN- $\gamma$  nacházíme teprve u CD8<sup>+</sup> lymfocytů exprimujících na povrchu jak PD-1, tak i Tim-3 molekulu. V odlišné expresi PD-1 a

Tim-3 molekul v HPV pozitivních nádorech, resp. na CD8<sup>+</sup> TIL nacházíme jedno z možných vysvětlení, proč mají HPV pozitivní nádory lepší prognózu. Tyto výsledky jsou i v korelaci s výsledky Badoualové a kolektivu, kteří prokázali pozitivní korelaci infiltrace CD8<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> TIL v nádorovém mikroprostředí s prognózou HPV pozitivních HNSCC [204]. Poměrně překvapivě zjistili, že PD-1<sup>+</sup> T lymfocyty infiltrující HPV pozitivní nádory exprimují výrazně vyšší hladiny aktivačních markerů HLA-DR a CD38 [204]. Nejedná se o vyčerpané buňky a PD-1 nemůže, minimálně u HNSCC, být považovaná za marker funkční inhibice buňky.

Velmi perspektivním diagnostickým i terapeutickým cílem by mohla pro pacienty s HNSCC být Tim-3 molekula, neboť je exprimovaná pouze v mikroprostředí nádoru nebo chronického zánětu [205], tedy její blokace by neměla způsobovat závažné nežádoucí reakce. Blokace Tim-3 zatím nebyla testována v klinické onkologii, ale vzhledem k expresi Tim-3 pouze v mikroprostředí nádoru či chronického zánětu a pozitivním výsledkům v laboratorních testech [206], jeví se její použití jako velmi slibné s možností minimalizovat nežádoucí účinky léčby v podobě autoimunitních reakcí v jiných než cílových orgánech či tkáních.

Bez ohledu na etiologii nádoru, byla prokázána pozitivní prognostická korelace infiltrace TIL v nádorovém mikroprostředí u HNSCC [207]. Hladiny CD8<sup>+</sup> lymfocytů jsou nižší v periferní krvi zdravých kontrol ve srovnání s HNSCC. Klinický význam však nacházíme pouze v jejich zastoupení v nádorové tkáni, kdy jejich vyšší zastoupení je prognosticky významným pozitivním faktorem [166]. To odpovídá i IHC průkazu infiltrace CD8<sup>+</sup> lymfocytů v nádorové tkáni HPV pozitivních HNSCC a vysoký podíl CD8<sup>+</sup>/Foxp3<sup>+</sup> T buněk pozitivně koreluje s klinickým stavem HPV pozitivních i HPV negativních pacientů [208].

Analýza populací imunitních buněk v nádoru pomocí průtokové cytometrie ukázala výrazně vyšší zastoupení leukocytů, a to zejména CD8<sup>+</sup> T lymfocytů, u HPV pozitivních pacientů. Zajímavé také je, že tyto CD8<sup>+</sup> T buňky v HPV pozitivních nádorech měly navíc schopnost produkovat signifikantně vyšší hladiny IFN- $\gamma$  v porovnání s HPV negativními vzorky. U ostatních populací T buněk, jako jsou Th1 buňky, regulační T lymfocyty, či Th17 buňky, nebyly pozorovány výrazné rozdíly mezi HPV pozitivními a negativními nádory (**Partlová, 2015**;[74]).

V současné době není stále zodpovězena otázka, proti jakým antigenům jsou infiltrující CD8<sup>+</sup> T lymfocyty u HPV pozitivních HNSCC namířeny. Doposud je velmi málo

studií, které by se detailně zabývaly analýzou funkce CD8<sup>+</sup> T lymfocytů u HNSCC pacientů. Z našich dosavadních výsledků je zřejmé, že minimálně u části pacientů s HPV pozitivním HNSCC je nádorové mikroprostředí infiltrováno CD8<sup>+</sup> T lymfocyty, které rozpoznávají virové antigeny asociované s HPV (nepublikovaná data). Pro jednoznačné zhodnocení je ale třeba získat více informací o nádorových a virových antigenech, které infiltrující CD8<sup>+</sup> T lymfocyty rozpoznávají, a poznat tak cíle imunitní odpovědi, které jsou důležité pro růst a přežívání nádorových buněk.

Poznatky o významu Treg pro vznik a rozvoj nádorového onemocnění se významně liší v závislosti na modelu či klinické problematice. Regulační T lymfocyty patří mezi CD4<sup>+</sup> buňky, jejichž hlavní funkcí je potlačovat potenciálně nebezpečné autoreaktivní T lymfocyty, které unikly centrální pozitivní a negativní selekci v thymu. Tím brání vzniku autoimunitních onemocnění, nastolují periferní toleranci a udržují imunitní homeostázu. Hodnocení Treg jako prognostického parametru v periferní krvi či v nádorové tkáni je věnována velká pozornost, ale zatím s rozporupnými výsledky. Jedním z vysvětlení je, že se úloha Treg v nádorové imunologii liší v závislosti na typu a etiologii nádoru. Druhým vysvětlením je zatím poměrně obtížná fenotypová detekce Treg, kdy existují velké funkční odlišnosti u buněk exprimujících stejné molekuly, pouze v jiné míře. Na jednu stranu regulační T lymfocyty potlačují imunitní odpověď proti nádorové tkáni a vysoké hladiny Treg jsou často spojovány se špatnou prognózou pacientů s různými nádorovými onemocněními [95]. Na druhou stranu byla přítomnost Treg popsána jako pozitivní prognostický marker například u kolorektálního karcinomu či lymfomů [209, 210]. Úloha Treg u pacientů s nádory hlavy a krku není zcela jednoznačná. Některé studie ukazují pozitivní korelaci vysokého zastoupení Treg v nádoru s loko-regionální kontrolou nádorového růstu [167]. Tuto hypotézu podporují i jiné práce, ve kterých zastoupení Treg pozitivně koreluje s celkovým přežitím pacientů [211]. Možné vysvětlení může být v rovnováze uvnitř nádorového mikroprostředí, tedy poměru mezi Treg a cytotoxickými CD8<sup>+</sup> T lymfocyty. Data Nasmana a kol.[208], uvádějí, že pacienti s nádory infiltrovanými vysokým počtem CD8<sup>+</sup> T lymfocytů a s vysokým podílem CD8<sup>+</sup>/Treg měli delší celkové přežití, a to jak ve skupině HPV pozitivních, tak HPV negativních pacientů.

Odlíšný význam jsme prokázali i v analýze dvou souborů pacientů s HNSCC. Vysoké hladiny Treg v periferní krvi v době diagnózy mohou predikovat časnou recidivu onemocnění (Bouček, 2010; [101]). Na druhou stranu vysoké zastoupení

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg v periferní krvi korelovalo s pozitivní prognózou u HPV pozitivních HNSCC (Lukešová, 2014; [212]). Možných vysvětlení tohoto rozdílu může být řada, rozdíl je jistě v charakteru imunitní odpovědi u HPV pozitivních pacientů, kdy vyšší hladina Foxp3 pozitivních Treg v periferní krvi ještě nemusí mít funkční vliv na situaci v nádorovém mikroprostředí. Dalším vysvětlením může být fakt, že fenotypově stejně detekované buňky (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>) nemusí být i funkčně analogické. Práce ze skupiny Sakaguchiho prokazují, že v nádorovém mikroprostředí kolorektálních karcinomů se nacházejí Treg s různou mírou exprese Foxp3. Ve vztahu k expresi molekuly CD45RA se rozdělují na 3 funkčně naprosto odlišné frakce. Frakce I (Foxp3<sup>lo</sup>CD45RA<sup>hi</sup>) je označovaná jako naivní Treg (nTreg). Po antigenní stimulaci dochází k její diferenciaci do frakce II (Foxp3<sup>hi</sup>CD45RA<sup>-</sup>), označované jako efektorové Treg (eTreg), které jsou terminálně diferencované, vysoce imunosupresivní a funkčně stabilní. Naopak za určitých podmínek může dojít k přechodu do frakce III (Foxp3<sup>lo</sup>CD45RA<sup>-</sup>), což jsou buňky nevykazující žádnou inhibiční aktivitu a mohou produkovat prozánětlivé cytokiny. Ve všech třech frakcích se jedná o CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> buňky s diametrálně odlišnou funkční aktivitou [107, 108].

Analogicky pro HNSCC je prokázána signifikantní korelace zastoupení populace CD45RA<sup>-</sup>Foxp3<sup>high</sup> Treg (odpovídající efektorové frakci, vysoce imunosupresivní, funkčně stabilní) v periferní cirkulaci u pacientů s HNSCC s T a N stádiem onemocnění [165].

## 7. Závěr

Klinická onkologie a imunologie v posledních měsících a letech dokázaly najít styčné body. Lepší porozumění interakcím mezi nádorovým procesem a imunitním systémem již dnes významně promlouvá do léčby onkologických pacientů.

Ovlivnění regulačních mechanismů imunitního systému umožňuje zlepšení dosavadních terapeutických výsledků některých nádorových onemocnění. Doposud největšího pokroku bylo dosaženo v léčbě maligního melanomu. Onemocnění, jehož dříve neléčitelná stádia je v dnešní době u části pacientů možné imuno-onkologickou léčbou ovlivnit natolik, že pacienti dlouhodobě přežívají. Poznatky o fungování imunitního systému v interakci s jednotlivými nádorovými onemocněními umožňují stále rozšiřování indikací léčby. Přibývá i množství molekulárních a signalizačních mechanismů, na které nové léčebné přístupy cílí.

Dosavadní, i zde souhrnně prezentované výsledky o odlišnostech imunitní odpovědi u HNSCC s různou etiologií, bude v budoucnu možné využít k lepšímu prognostickému zhodnocení konkrétního pacienta. Zároveň rozšiřují množství znalostí o významu imunitního systému pro vývoj dlaždicobuněčných karcinomů hlavy a krku a mohou umožnit zlepšení terapeutických výsledků zavedením nových léčebných postupů.

Aktuální výsledky prvních klinických studií s imuno-onkoterapií v oblasti hlavy a krku se zdají velmi slibné a naznačují možnost zlepšení závažné prognózy pacientů.

Terapeutické využití monoklonálních protilátek proti PD-1 a PD-L1 se již i v České republice stává realitou v rámci klinických studií a v brzké budoucnosti se dá očekávat jak rozšíření indikačních kritérií, tak rozšíření i do běžné klinické praxe. Z hlediska dosavadních znalostí se jeví perspektivní využití monoklonální protilátky proti Tim-3 molekule, která je exprimována na funkčně skutečně vyčerpaných či inhibovaných T lymfocytech a nacházíme ji pouze v patologických tkáních, jak nádorových, tak chronicky zánětlivě změněných. V onkologii dlaždicobuněčných karcinomů hlavy a krku má imunoterapie jistě perspektivu stát se čtvrtým pilířem léčby, vedle chirurgie, radioterapie a chemoterapie.

Pro dosažení dostatečného efektu bude u řady nádorových onemocnění nutná kombinace více typů imunologické a biologické léčby tak, aby nádorové buňky byly ovlivněny více mechanismy. Pro přesné cílení a načasování léčby je nutné i nalezení markerů spolehlivě monitorujících jak stav imunitního systému pacienta, tak schopnost

nádorového onemocnění odpovídat na daný typ imuno-onkoterapie. Imunitní systém má velmi mocné prostředky, nepochopení principů může snadno vyústit v závažné nežádoucí účinky léčby. Naštěstí rostoucí penzum znalostí o regulačních mechanismech imunitního systému a schopnost předkládat imunitnímu systému cílové antigeny umožňují stále zdokonalovat výsledky imuno-onkologické léčby.

## 8. Literatura

1. Psyrrri, A., et al., *Head and neck cancer*. J Oncol, 2009. **2009**: p. 358098.
2. Parkin, D.M., et al., *Global cancer statistics, 2002*. CA Cancer J Clin, 2005. **55**(2): p. 74-108.
3. Carvalho, A.L., et al., *Trends in incidence and prognosis for head and neck cancer in the United States: a site-specific analysis of the SEER database*. Int J Cancer, 2005. **114**(5): p. 806-16.
4. Young, D., et al., *Increase in head and neck cancer in younger patients due to human papillomavirus (HPV)*. Oral Oncol, 2015. **51**(8): p. 727-30.
5. Horng, J.T., et al., *Identifying the combination of genetic factors that determine susceptibility to cervical cancer*. IEEE Trans Inf Technol Biomed, 2004. **8**(1): p. 59-66.
6. Leemans, C.R., B.J. Braakhuis, and R.H. Brakenhoff, *The molecular biology of head and neck cancer*. Nat Rev Cancer, 2011. **11**(1): p. 9-22.
7. Slaughter, D.P., H.W. Southwick, and W. Smejkal, *Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin*. Cancer, 1953. **6**(5): p. 963-8.
8. zur Hausen, H., *Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account*. Virology, 2009. **384**(2): p. 260-5.
9. D'Souza, G., et al., *Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer*. N Engl J Med, 2007. **356**(19): p. 1944-56.
10. Tachezy, R., et al., *HPV and other risk factors of oral cavity/oropharyngeal cancer in the Czech Republic*. Oral Dis, 2005. **11**(3): p. 181-5.
11. Marur, S., et al., *HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic*. Lancet Oncol, 2010. **11**(8): p. 781-9.
12. Castellsague, X., et al., *HPV Involvement in Head and Neck Cancers: Comprehensive Assessment of Biomarkers in 3680 Patients*. J Natl Cancer Inst, 2016. **108**(6): p. djv403.
13. Ndiaye, C., et al., *HPV DNA, E6/E7 mRNA, and p16INK4a detection in head and neck cancers: a systematic review and meta-analysis*. Lancet Oncol, 2014. **15**(12): p. 1319-31.
14. Klozar, J. and R. Tachezy, *What are the implications of human papillomavirus status in oropharyngeal tumors for clinical practice?* Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg, 2014. **22**(2): p. 90-4.
15. Kanodia, S., L.M. Fahey, and W.M. Kast, *Mechanisms used by human papillomaviruses to escape the host immune response*. Curr Cancer Drug Targets, 2007. **7**(1): p. 79-89.
16. Sepiashvili, L., et al., *Novel insights into head and neck cancer using next-generation "omic" technologies*. Cancer Res, 2015. **75**(3): p. 480-6.
17. Rotnaglova, E., et al., *HPV involvement in tonsillar cancer: prognostic significance and clinically relevant markers*. Int J Cancer, 2011. **129**(1): p. 101-10.
18. Ang, K.K., et al., *Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer*. N Engl J Med, 2010. **363**(1): p. 24-35.
19. Network, N.C.C. *NCCN guidelines, Head and Neck cancers, Version 2.2016*. 2016 [cited Version 2.2016; Available from: <https://www.nccn.org/>].

20. Stransky, N., et al., *The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma*. Science, 2011. **333**(6046): p. 1157-60.
21. Poeta, M.L., et al., *TP53 mutations and survival in squamous-cell carcinoma of the head and neck*. N Engl J Med, 2007. **357**(25): p. 2552-61.
22. Skinner, H.D., et al., *TP53 disruptive mutations lead to head and neck cancer treatment failure through inhibition of radiation-induced senescence*. Clin Cancer Res, 2012. **18**(1): p. 290-300.
23. Cancer Genome Atlas, N., *Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas*. Nature, 2015. **517**(7536): p. 576-82.
24. Mrhalova, M., et al., *Epidermal growth factor receptor--its expression and copy numbers of EGFR gene in patients with head and neck squamous cell carcinomas*. Neoplasma, 2005. **52**(4): p. 338-43.
25. Keren, S., et al., *Role of EGFR as a prognostic factor for survival in head and neck cancer: a meta-analysis*. Tumour Biol, 2014. **35**(3): p. 2285-95.
26. Smith, B.D., et al., *Prognostic significance of vascular endothelial growth factor protein levels in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma*. J Clin Oncol, 2000. **18**(10): p. 2046-52.
27. Lukes, P., et al., *The role of NBI HDTV magnifying endoscopy in the prehistologic diagnosis of laryngeal papillomatosis and spinocellular cancer*. Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 285486.
28. Zabrodsky, M., et al., *The role of narrow band imaging in the detection of recurrent laryngeal and hypopharyngeal cancer after curative radiotherapy*. Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 175398.
29. Ferlito, A., et al., *Proposal for a rational classification of neck dissections*. Head Neck, 2011. **33**(3): p. 445-50.
30. *TNM Classification of Malignant Tumours - 7th ed.* 2009.
31. O'Sullivan, B., et al., *Development and validation of a staging system for HPV-related oropharyngeal cancer by the International Collaboration on Oropharyngeal cancer Network for Staging (ICON-S): a multicentre cohort study*. Lancet Oncol, 2016. **17**(4): p. 440-51.
32. Mlecnik, B., et al., *Integrative Analyses of Colorectal Cancer Show Immunoscore Is a Stronger Predictor of Patient Survival Than Microsatellite Instability*. Immunity, 2016. **44**(3): p. 698-711.
33. Mlecnik, B., et al., *The tumor microenvironment and Immunoscore are critical determinants of dissemination to distant metastasis*. Sci Transl Med, 2016. **8**(327): p. 327ra26.
34. Monnier, Y. and C. Simon, *Surgery Versus Radiotherapy for Early Oropharyngeal Tumors: a Never-Ending Debate*. Curr Treat Options Oncol, 2015. **16**(9): p. 42.
35. Yeh, D.H., et al., *Transoral robotic surgery vs. radiotherapy for management of oropharyngeal squamous cell carcinoma - A systematic review of the literature*. Eur J Surg Oncol, 2015. **41**(12): p. 1603-14.
36. Robbins, K.T., et al., *Neck dissection classification update: revisions proposed by the American Head and Neck Society and the American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery*. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 2002. **128**(7): p. 751-8.
37. Lefebvre, J.L., et al., *Induction chemotherapy followed by either chemoradiotherapy or bioradiotherapy for larynx preservation: the TREMPIN randomized phase II study*. J Clin Oncol, 2013. **31**(7): p. 853-9.

38. Adelstein, D.J., et al., *Docetaxel, cisplatin, and fluorouracil induction chemotherapy followed by accelerated fractionation/concomitant boost radiation and concurrent cisplatin in patients with advanced squamous cell head and neck cancer: A Southwest Oncology Group phase II trial (S0216)*. *Head Neck*, 2010. **32**(2): p. 221-8.
39. Pignon, J.P., et al., *Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC): an update on 93 randomised trials and 17,346 patients*. *Radiother Oncol*, 2009. **92**(1): p. 4-14.
40. Bonner, J.A., et al., *Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck*. *N Engl J Med*, 2006. **354**(6): p. 567-78.
41. Bonner, J.A., et al., *Radiotherapy plus cetuximab for locoregionally advanced head and neck cancer: 5-year survival data from a phase 3 randomised trial, and relation between cetuximab-induced rash and survival*. *Lancet Oncol*, 2010. **11**(1): p. 21-8.
42. Ang, K.K., et al., *Randomized phase III trial of concurrent accelerated radiation plus cisplatin with or without cetuximab for stage III to IV head and neck carcinoma: RTOG 0522*. *J Clin Oncol*, 2014. **32**(27): p. 2940-50.
43. Bonner, J.A., et al., *Association of human papillomavirus and p16 status with mucositis and dysphagia for head and neck cancer patients treated with radiotherapy with or without cetuximab: Assessment from a phase 3 registration trial*. *Eur J Cancer*, 2016. **64**: p. 1-11.
44. Teknos, T.N., et al., *Elevated serum vascular endothelial growth factor and decreased survival in advanced laryngeal carcinoma*. *Head Neck*, 2002. **24**(11): p. 1004-11.
45. Argiris, A., et al., *Cetuximab and bevacizumab: preclinical data and phase II trial in recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck*. *Ann Oncol*, 2013. **24**(1): p. 220-5.
46. Burnet, F.M., *The concept of immunological surveillance*. *Prog Exp Tumor Res*, 1970. **13**: p. 1-27.
47. Matzinger, P., *Tolerance, danger, and the extended family*. *Annu Rev Immunol*, 1994. **12**: p. 991-1045.
48. Burnet, M., *Cancer: a biological approach. III. Viruses associated with neoplastic conditions. IV. Practical applications*. *Br Med J*, 1957. **1**(5023): p. 841-7.
49. Dunn, G.P., et al., *Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape*. *Nat Immunol*, 2002. **3**(11): p. 991-8.
50. Srivastava, P.K. and L.J. Old, *Individually distinct transplantation antigens of chemically induced mouse tumors*. *Immunol Today*, 1988. **9**(3): p. 78-83.
51. Melief, C.J., et al., *Immunosurveillance of virus-induced tumors*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 1989. **54 Pt 1**: p. 597-603.
52. Hislop, A.D., et al., *Cellular responses to viral infection in humans: lessons from Epstein-Barr virus*. *Annu Rev Immunol*, 2007. **25**: p. 587-617.
53. Graziano, D.F. and O.J. Finn, *Tumor antigens and tumor antigen discovery*. *Cancer Treat Res*, 2005. **123**: p. 89-111.
54. Horejsi, V., *[Antitumour Weapons of the Immune System]*. *Klin Onkol*, 2015. **28 Suppl 4**: p. 4S15-22.
55. Rihova, B. and M. Stastny, *[History of Immuno-therapy - from Coley Toxins to Check-points of the Immune Reaction]*. *Klin Onkol*, 2015. **28 Suppl 4**: p. 4S8-14.

56. Fucikova, J., J. Bartunkova, and R. Spisek, [*The Concept of Immunogenic Cell Death in Antitumor Immunity*]. *Klin Onkol*, 2015. **28 Suppl 4**: p. 4S48-55.
57. Obeid, M., et al., *Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death*. *Nat Med*, 2007. **13**(1): p. 54-61.
58. Zitvogel, L., A. Tesniere, and G. Kroemer, *Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion*. *Nat Rev Immunol*, 2006. **6**(10): p. 715-27.
59. Kroemer, G., et al., *Immunogenic cell death in cancer therapy*. *Annu Rev Immunol*, 2013. **31**: p. 51-72.
60. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. *Cell*, 2011. **144**(5): p. 646-74.
61. Schreiber, R.D., L.J. Old, and M.J. Smyth, *Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion*. *Science*, 2011. **331**(6024): p. 1565-70.
62. Sharma, P. and J.P. Allison, *The future of immune checkpoint therapy*. *Science*, 2015. **348**(6230): p. 56-61.
63. Jie, H.B., et al., *Intratumoral regulatory T cells upregulate immunosuppressive molecules in head and neck cancer patients*. *Br J Cancer*, 2013. **109**(10): p. 2629-35.
64. Barber, D.L., et al., *Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection*. *Nature*, 2006. **439**(7077): p. 682-7.
65. Hino, R., et al., *Tumor cell expression of programmed cell death-1 ligand 1 is a prognostic factor for malignant melanoma*. *Cancer*, 2010. **116**(7): p. 1757-66.
66. Hamanishi, J., et al., *Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(9): p. 3360-5.
67. Prieto, P.A., et al., *CTLA-4 blockade with ipilimumab: long-term follow-up of 177 patients with metastatic melanoma*. *Clin Cancer Res*, 2012. **18**(7): p. 2039-47.
68. Wolchok, J.D., et al., *Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma*. *N Engl J Med*, 2013. **369**(2): p. 122-33.
69. Vetizou, M., et al., *Anticancer immunotherapy by CTLA-4 blockade relies on the gut microbiota*. *Science*, 2015. **350**(6264): p. 1079-84.
70. Pitt, J.M., et al., *Resistance Mechanisms to Immune-Checkpoint Blockade in Cancer: Tumor-Intrinsic and -Extrinsic Factors*. *Immunity*, 2016. **44**(6): p. 1255-69.
71. Leitner, J., et al., *TIM-3 does not act as a receptor for galectin-9*. *PLoS Pathog*, 2013. **9**(3): p. e1003253.
72. Nebbia, G., et al., *Upregulation of the Tim-3/galectin-9 pathway of T cell exhaustion in chronic hepatitis B virus infection*. *PLoS One*, 2012. **7**(10): p. e47648.
73. Anderson, A.C., *Tim-3: an emerging target in the cancer immunotherapy landscape*. *Cancer Immunol Res*, 2014. **2**(5): p. 393-8.
74. Partlova, S., et al., *Distinct patterns of intratumoral immune cell infiltrates in patients with HPV-associated compared to non-virally induced head and neck squamous cell carcinoma*. *Oncoimmunology*, 2015. **4**(1): p. e965570.
75. Huang, C.T., et al., *Role of LAG-3 in regulatory T cells*. *Immunity*, 2004. **21**(4): p. 503-13.
76. Pardoll, D.M., *The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy*. *Nat Rev Cancer*, 2012. **12**(4): p. 252-64.

77. Uyttenhove, C., et al., *Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase*. Nat Med, 2003. **9**(10): p. 1269-74.
78. Holmgaard, R.B., et al., *Tumor-Expressed IDO Recruits and Activates MDSCs in a Treg-Dependent Manner*. Cell Rep, 2015. **13**(2): p. 412-24.
79. Brandacher, G., et al., *Prognostic value of indoleamine 2,3-dioxygenase expression in colorectal cancer: effect on tumor-infiltrating T cells*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(4): p. 1144-51.
80. Okamoto, A., et al., *Indoleamine 2,3-dioxygenase serves as a marker of poor prognosis in gene expression profiles of serous ovarian cancer cells*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(16): p. 6030-9.
81. Speeckaert, R., et al., *Indoleamine 2,3-dioxygenase, a new prognostic marker in sentinel lymph nodes of melanoma patients*. Eur J Cancer, 2012. **48**(13): p. 2004-11.
82. Antonioli, L., et al., *Immunity, inflammation and cancer: a leading role for adenosine*. Nat Rev Cancer, 2013. **13**(12): p. 842-57.
83. Deaglio, S., et al., *Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression*. J Exp Med, 2007. **204**(6): p. 1257-65.
84. Tu, E., P.Z. Chia, and W. Chen, *TGFbeta in T cell biology and tumor immunity: Angel or devil?* Cytokine Growth Factor Rev, 2014. **25**(4): p. 423-35.
85. Chockley, P.J. and V.G. Keshamouni, *Immunological Consequences of Epithelial-Mesenchymal Transition in Tumor Progression*. J Immunol, 2016. **197**(3): p. 691-8.
86. Sakaguchi, S., *Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self*. Nat Immunol, 2005. **6**(4): p. 345-52.
87. Campbell, D.J. and S.F. Ziegler, *FOXP3 modifies the phenotypic and functional properties of regulatory T cells*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(4): p. 305-10.
88. Vignali, D.A., L.W. Collison, and C.J. Workman, *How regulatory T cells work*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(7): p. 523-32.
89. Sakaguchi, S., et al., *Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases*. J Immunol, 1995. **155**(3): p. 1151-64.
90. Sakaguchi, S. and N. Sakaguchi, *Regulatory T cells in immunologic self-tolerance and autoimmune disease*. Int Rev Immunol, 2005. **24**(3-4): p. 211-26.
91. Kapp, J.A., *Special regulatory T-cell review: Suppressors regulated but unsuppressed*. Immunology, 2008. **123**(1): p. 28-32.
92. Pomie, C., I. Menager-Marcq, and J.P. van Meerwijk, *Murine CD8(+) regulatory T lymphocytes: The new era*. Hum Immunol, 2008. **69**(11): p. 708-14.
93. Nishikawa, H. and S. Sakaguchi, *Regulatory T cells in tumor immunity*. Int J Cancer, 2010. **127**(4): p. 759-67.
94. Whiteside, T.L., *Induced regulatory T cells in inhibitory microenvironments created by cancer*. Expert Opin Biol Ther, 2014. **14**(10): p. 1411-25.
95. Curiel, T.J., et al., *Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival*. Nat Med, 2004. **10**(9): p. 942-9.

96. Wolf, A.M., et al., *Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(2): p. 606-12.
97. Woo, E.Y., et al., *Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer*. Cancer Res, 2001. **61**(12): p. 4766-72.
98. Schaefer, C., et al., *Characteristics of CD4+CD25+ regulatory T cells in the peripheral circulation of patients with head and neck cancer*. Br J Cancer, 2005. **92**(5): p. 913-20.
99. Strauss, L., et al., *The frequency and suppressor function of CD4+CD25highFoxp3+ T cells in the circulation of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(21): p. 6301-11.
100. Mandapathil, M., et al., *Increased ectonucleotidase expression and activity in regulatory T cells of patients with head and neck cancer*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(20): p. 6348-57.
101. Boucek, J., et al., *Regulatory T cells and their prognostic value for patients with squamous cell carcinoma of the head and neck*. J Cell Mol Med, 2010. **14**(1-2): p. 426-33.
102. Groux, H. and F. Cottrez, *The complex role of interleukin-10 in autoimmunity*. J Autoimmun, 2003. **20**(4): p. 281-5.
103. Vignali, D., *How many mechanisms do regulatory T cells need?* Eur J Immunol, 2008. **38**(4): p. 908-11.
104. Strauss, L., C. Bergmann, and T.L. Whiteside, *Functional and phenotypic characteristics of CD4+CD25highFoxp3+ Treg clones obtained from peripheral blood of patients with cancer*. Int J Cancer, 2007. **121**(11): p. 2473-83.
105. Martin, F., et al., *Human FOXP3 and cancer*. Oncogene, 2010. **29**(29): p. 4121-9.
106. Randolph, D.A. and C.G. Fathman, *Cd4+Cd25+ regulatory T cells and their therapeutic potential*. Annu Rev Med, 2006. **57**: p. 381-402.
107. Saito, T., et al., *Two FOXP3(+)CD4(+) T cell subpopulations distinctly control the prognosis of colorectal cancers*. Nat Med, 2016. **22**(6): p. 679-84.
108. Miyara, M., et al., *Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor*. Immunity, 2009. **30**(6): p. 899-911.
109. Tai, X., et al., *CD28 costimulation of developing thymocytes induces Foxp3 expression and regulatory T cell differentiation independently of interleukin 2*. Nat Immunol, 2005. **6**(2): p. 152-62.
110. Kronenberg, M. and A. Rudensky, *Regulation of immunity by self-reactive T cells*. Nature, 2005. **435**(7042): p. 598-604.
111. Liu, W., et al., *CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells*. J Exp Med, 2006. **203**(7): p. 1701-11.
112. Wieczorek, G., et al., *Quantitative DNA methylation analysis of FOXP3 as a new method for counting regulatory T cells in peripheral blood and solid tissue*. Cancer Res, 2009. **69**(2): p. 599-608.
113. Strauss, L., et al., *A unique subset of CD4+CD25highFoxp3+ T cells secreting interleukin-10 and transforming growth factor-beta1 mediates suppression in the tumor microenvironment*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(15 Pt 1): p. 4345-54.
114. Hilchey, S.P., et al., *Follicular lymphoma intratumoral CD4+CD25+GITR+ regulatory T cells potently suppress CD3/CD28-costimulated autologous and*

- allogeneic CD8+CD25- and CD4+CD25- T cells*. J Immunol, 2007. **178**(7): p. 4051-61.
115. Shevach, E.M., *Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression*. Immunity, 2009. **30**(5): p. 636-45.
  116. Takahashi, T., et al., *Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state*. Int Immunol, 1998. **10**(12): p. 1969-80.
  117. Thornton, A.M. and E.M. Shevach, *CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production*. J Exp Med, 1998. **188**(2): p. 287-96.
  118. Jonuleit, H., et al., *Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood*. J Exp Med, 2001. **193**(11): p. 1285-94.
  119. Grossman, W.J., et al., *Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells*. Blood, 2004. **104**(9): p. 2840-8.
  120. Zhao, D.M., et al., *Activated CD4+CD25+ T cells selectively kill B lymphocytes*. Blood, 2006. **107**(10): p. 3925-32.
  121. Cao, X., et al., *Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance*. Immunity, 2007. **27**(4): p. 635-46.
  122. Bopp, T., et al., *Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression*. J Exp Med, 2007. **204**(6): p. 1303-10.
  123. Irla, M., et al., *MHC class II-restricted antigen presentation by plasmacytoid dendritic cells inhibits T cell-mediated autoimmunity*. J Exp Med, 2010. **207**(9): p. 1891-905.
  124. Bordon, Y., *Present and clear danger*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(8): p. 616.
  125. Fallarino, F., et al., *Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells*. Nat Immunol, 2003. **4**(12): p. 1206-12.
  126. Mellor, A.L. and D.H. Munn, *IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(10): p. 762-74.
  127. Mantovani, A. and A. Sica, *Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity*. Curr Opin Immunol, 2010. **22**(2): p. 231-7.
  128. Sica, A., *Macrophages give Gas(6) to cancer*. Blood, 2010. **115**(11): p. 2122-3.
  129. Sica, A., P. Allavena, and A. Mantovani, *Cancer related inflammation: the macrophage connection*. Cancer Lett, 2008. **267**(2): p. 204-15.
  130. Mantovani, A., et al., *Cancer-related inflammation*. Nature, 2008. **454**(7203): p. 436-44.
  131. Okubo, M., et al., *M2-polarized macrophages contribute to neovasculogenesis, leading to relapse of oral cancer following radiation*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 27548.
  132. Condamine, T., et al., *Lectin-type oxidized LDL receptor 1 distinguishes population of human polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells in cancer patients*. Science Immunology., 2016. **in press**
  133. Perez-Gracia, J.L., et al., *Orchestrating immune check-point blockade for cancer immunotherapy in combinations*. Curr Opin Immunol, 2014. **27**: p. 89-97.
  134. Argiris, A., et al., *Phase III randomized, placebo-controlled trial of docetaxel with or without gefitinib in recurrent or metastatic head and neck cancer: an eastern cooperative oncology group trial*. J Clin Oncol, 2013. **31**(11): p. 1405-14.

135. Trivedi, S., et al., *Anti-EGFR Targeted Monoclonal Antibody Isotype Influences Antitumor Cellular Immunity in Head and Neck Cancer Patients*. Clin Cancer Res, 2016. **22**(21): p. 5229-5237.
136. Vermorken, J.B., et al., *Cisplatin and fluorouracil with or without panitumumab in patients with recurrent or metastatic squamous-cell carcinoma of the head and neck (SPECTRUM): an open-label phase 3 randomised trial*. Lancet Oncol, 2013. **14**(8): p. 697-710.
137. Vermorken, J.B., et al., *Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer*. N Engl J Med, 2008. **359**(11): p. 1116-27.
138. Li, Q., M.E. Prince, and J.S. Moyer, *Immunotherapy for head and neck squamous cell carcinoma*. Oral Oncol, 2015. **51**(4): p. 299-304.
139. Fury, M.G., et al., *Phase II trial of bevacizumab + cetuximab + cisplatin with concurrent intensity-modulated radiation therapy for patients with stage III/IVB head and neck squamous cell carcinoma*. Head Neck, 2016. **38** Suppl 1: p. E566-70.
140. Whiteside, T.L., et al., *Evidence for local and systemic activation of immune cells by peritumoral injections of interleukin 2 in patients with advanced squamous cell carcinoma of the head and neck*. Cancer Res, 1993. **53**(23): p. 5654-62.
141. De Stefani, A., et al., *Improved survival with perilymphatic interleukin 2 in patients with resectable squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx*. Cancer, 2002. **95**(1): p. 90-7.
142. Chi, K.H., et al., *Phase II trial of systemic recombinant interleukin-2 in the treatment of refractory nasopharyngeal carcinoma*. Oncology, 2001. **60**(2): p. 110-5.
143. Whiteside, T.L., et al., *A short course of neoadjuvant IRX-2 induces changes in peripheral blood lymphocyte subsets of patients with head and neck squamous cell carcinoma*. Cancer Immunol Immunother, 2012. **61**(6): p. 783-8.
144. Berinstein, N.L., et al., *Increased lymphocyte infiltration in patients with head and neck cancer treated with the IRX-2 immunotherapy regimen*. Cancer Immunol Immunother, 2012. **61**(6): p. 771-82.
145. Joura, E.A., et al., *A 9-valent HPV vaccine against infection and intraepithelial neoplasia in women*. N Engl J Med, 2015. **372**(8): p. 711-23.
146. Best, S.R., K.J. Niparko, and S.I. Pai, *Biology of human papillomavirus infection and immune therapy for HPV-related head and neck cancers*. Otolaryngol Clin North Am, 2012. **45**(4): p. 807-22.
147. Voskens, C.J., et al., *Induction of MAGE-A3 and HPV-16 immunity by Trojan vaccines in patients with head and neck carcinoma*. Head Neck, 2012. **34**(12): p. 1734-46.
148. Yoshitake, Y., et al., *Phase II clinical trial of multiple peptide vaccination for advanced head and neck cancer patients revealed induction of immune responses and improved OS*. Clin Cancer Res, 2015. **21**(2): p. 312-21.
149. Chang, A.E., et al., *Generation of vaccine-primed lymphocytes for the treatment of head and neck cancer*. Head Neck, 2003. **25**(3): p. 198-209.
150. Kenter, G.G., et al., *Vaccination against HPV-16 oncoproteins for vulvar intraepithelial neoplasia*. N Engl J Med, 2009. **361**(19): p. 1838-47.
151. Schumacher, T.N. and R.D. Schreiber, *Neoantigens in cancer immunotherapy*. Science, 2015. **348**(6230): p. 69-74.
152. Bloy, N., et al., *Trial watch: Dendritic cell-based anticancer therapy*. Oncoimmunology, 2014. **3**(11): p. e963424.

153. Whiteside, T.L., et al., *Dendritic cell-based autologous tumor vaccines for head and neck squamous cell carcinoma*. *Head Neck*, 2016. **38 Suppl 1**: p. E494-501.
154. Schuler, P.J., et al., *Phase I dendritic cell p53 peptide vaccine for head and neck cancer*. *Clin Cancer Res*, 2014. **20(9)**: p. 2433-44.
155. ClinicalTrials.gov. *Vaccine Therapy in Treating Patients With Advanced or Recurrent Cancer*. 2001; Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT00019110>.
156. Comoli, P., et al., *Cell therapy of stage IV nasopharyngeal carcinoma with autologous Epstein-Barr virus-targeted cytotoxic T lymphocytes*. *J Clin Oncol*, 2005. **23(35)**: p. 8942-9.
157. Rosenberg, S.A., et al., *Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer*. *N Engl J Med*, 1985. **313(23)**: p. 1485-92.
158. Segal, N.H., et al., *Epitope landscape in breast and colorectal cancer*. *Cancer Res*, 2008. **68(3)**: p. 889-92.
159. Forbes, S.A., et al., *COSMIC: exploring the world's knowledge of somatic mutations in human cancer*. *Nucleic Acids Res*, 2015. **43(Database issue)**: p. D805-11.
160. Lawrence, M.S., et al., *Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes*. *Nature*, 2013. **499(7457)**: p. 214-8.
161. Ferris, R.L., *Immunology and Immunotherapy of Head and Neck Cancer*. *J Clin Oncol*, 2015. **33(29)**: p. 3293-304.
162. ClinicalTrials.gov. *ClinicalTrials.gov*. 2016; Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02105636>.
163. Gillison, M., et al., *Nivolumab (nivo) vs investigator's choice (IC) for recurrent or metastatic (R/M) head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC): CheckMate-141 in AACR Annual meeting 2016*. 2016: New Orleans.
164. Ferris, R.L., et al., *Nivolumab for Recurrent Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck*. *N Engl J Med*, 2016.
165. Sun, W., et al., *CD45RA-Foxp3high but not CD45RA+Foxp3low suppressive T regulatory cells increased in the peripheral circulation of patients with head and neck squamous cell carcinoma and correlated with tumor progression*. *J Exp Clin Cancer Res*, 2014. **33**: p. 35.
166. Nguyen, N., et al., *Tumor infiltrating lymphocytes and survival in patients with head and neck squamous cell carcinoma*. *Head Neck*, 2016. **38(7)**: p. 1074-84.
167. Badoual, C., et al., *Prognostic value of tumor-infiltrating CD4+ T-cell subpopulations in head and neck cancers*. *Clin Cancer Res*, 2006. **12(2)**: p. 465-72.
168. Boucek, J., et al., *Prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes subpopulations for patients with Head and Neck Squamous Cell Carcinoma*. manuscript in preparation, 2017.
169. Whiteside, T.L., *Anti-tumor vaccines in head and neck cancer: targeting immune responses to the tumor*. *Curr Cancer Drug Targets*, 2007. **7(7)**: p. 633-42.
170. Omenetti, S. and T.T. Pizarro, *The Treg/Th17 Axis: A Dynamic Balance Regulated by the Gut Microbiome*. *Front Immunol*, 2015. **6**: p. 639.
171. Bailey, S.R., et al., *Th17 cells in cancer: the ultimate identity crisis*. *Front Immunol*, 2014. **5**: p. 276.
172. Punt, S., et al., *The correlations between IL-17 vs. Th17 cells and cancer patient survival: a systematic review*. *Oncoimmunology*, 2015. **4(2)**: p. e984547.

173. Zitvogel, L., et al., *Microbiome and Anticancer Immunosurveillance*. Cell, 2016. **165**(2): p. 276-87.
174. Galluzzi, L. and G. Kroemer, *A four-lane highway to cancer*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2016. **17**(7): p. 398.
175. Punt, S., et al., *A beneficial tumor microenvironment in oropharyngeal squamous cell carcinoma is characterized by a high T cell and low IL-17(+) cell frequency*. Cancer Immunol Immunother, 2016. **65**(4): p. 393-403.
176. Liang, Y., H.F. Pan, and D.Q. Ye, *Tc17 Cells in Immunity and Systemic Autoimmunity*. Int Rev Immunol, 2015. **34**(4): p. 318-31.
177. Muller, A., et al., *Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis*. Nature, 2001. **410**(6824): p. 50-6.
178. Cojoc, M., et al., *Emerging targets in cancer management: role of the CXCL12/CXCR4 axis*. Onco Targets Ther, 2013. **6**: p. 1347-1361.
179. Ray, P., et al., *CXCL12-gamma in primary tumors drives breast cancer metastasis*. Oncogene, 2015. **34**(16): p. 2043-51.
180. Leon, X., et al., *Expression of the CXCL12/CXCR4 chemokine axis predicts regional control in head and neck squamous cell carcinoma*. Eur Arch Otorhinolaryngol, 2016.
181. Albert, S., et al., *Focus on the role of the CXCL12/CXCR4 chemokine axis in head and neck squamous cell carcinoma*. Head Neck, 2013. **35**(12): p. 1819-28.
182. Gupta, P.B., et al., *Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening*. Cell, 2009. **138**(4): p. 645-59.
183. Gupta, R., P. Vyas, and T. Enver, *Molecular targeting of cancer stem cells*. Cell Stem Cell, 2009. **5**(2): p. 125-6.
184. Jangamreddy, J.R., et al., *Salinomycin induces activation of autophagy, mitophagy and affects mitochondrial polarity: differences between primary and cancer cells*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1833**(9): p. 2057-69.
185. Jin, L., et al., *Monoclonal antibody-mediated targeting of CD123, IL-3 receptor alpha chain, eliminates human acute myeloid leukemic stem cells*. Cell Stem Cell, 2009. **5**(1): p. 31-42.
186. Rosa, R., et al., *Approaches for targeting cancer stem cells drug resistance*. Expert Opin Drug Discov, 2016.
187. Hill, R.P. and L. Milas, *The proportion of stem cells in murine tumors*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1989. **16**(2): p. 513-8.
188. Baumann, M., et al., *Cancer stem cells and radiotherapy*. Int J Radiat Biol, 2009. **85**(5): p. 391-402.
189. Hadnagy, A., et al., *SP analysis may be used to identify cancer stem cell populations*. Exp Cell Res, 2006. **312**(19): p. 3701-10.
190. Scharenberg, C.W., M.A. Harkey, and B. Torok-Storb, *The ABCG2 transporter is an efficient Hoechst 33342 efflux pump and is preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors*. Blood, 2002. **99**(2): p. 507-12.
191. Linge, A., et al., *Low Cancer Stem Cell Marker Expression and Low Hypoxia Identify Good Prognosis Subgroups in HPV(-) HNSCC after Postoperative Radiochemotherapy: A Multicenter Study of the DTK-ROG*. Clin Cancer Res, 2016. **22**(11): p. 2639-49.
192. Kaseb, H.O., et al., *Identification, expansion and characterization of cancer cells with stem cell properties from head and neck squamous cell carcinomas*. Exp Cell Res, 2016. **348**(1): p. 75-86.
193. Meng, X., et al., *Predictive biomarkers in PD-1/PD-L1 checkpoint blockade immunotherapy*. Cancer Treat Rev, 2015. **41**(10): p. 868-76.

194. Yu, T., X. Lao, and H. Zheng, *Influencing COX-2 Activity by COX Related Pathways in Inflammation and Cancer*. *Mini Rev Med Chem*, 2016. **16**(15): p. 1230-1243.
195. Ristimaki, A., et al., *Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in breast cancer*. *Cancer Res*, 2002. **62**(3): p. 632-5.
196. Yang, B., et al., *Clinicopathological and prognostic significance of cyclooxygenase-2 expression in head and neck cancer: A meta-analysis*. *Oncotarget*, 2016.
197. Butkiewicz, D., et al., *The VEGFR2, COX-2 and MMP-2 polymorphisms are associated with clinical outcome of patients with inoperable non-small cell lung cancer*. *Int J Cancer*, 2015. **137**(10): p. 2332-42.
198. Saba, N.F., et al., *Role of cyclooxygenase-2 in tumor progression and survival of head and neck squamous cell carcinoma*. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2009. **2**(9): p. 823-9.
199. Spanos, W.C., et al., *Immune response during therapy with cisplatin or radiation for human papillomavirus-related head and neck cancer*. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 2009. **135**(11): p. 1137-46.
200. Sauce, D., et al., *PD-1 expression on human CD8 T cells depends on both state of differentiation and activation status*. *AIDS*, 2007. **21**(15): p. 2005-13.
201. Boussiotis, V.A., *Molecular and Biochemical Aspects of the PD-1 Checkpoint Pathway*. *N Engl J Med*, 2016. **375**(18): p. 1767-1778.
202. Blackburn, S.D., et al., *Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection*. *Nat Immunol*, 2009. **10**(1): p. 29-37.
203. Dudley, J.C., et al., *Microsatellite Instability as a Biomarker for PD-1 Blockade*. *Clin Cancer Res*, 2016. **22**(4): p. 813-20.
204. Badoual, C., et al., *PD-1-expressing tumor-infiltrating T cells are a favorable prognostic biomarker in HPV-associated head and neck cancer*. *Cancer Res*, 2013. **73**(1): p. 128-38.
205. Anderson, A.C., *Tim-3, a negative regulator of anti-tumor immunity*. *Curr Opin Immunol*, 2012. **24**(2): p. 213-6.
206. Kim, J.E., et al., *Combination therapy with anti-PD-1, anti-TIM-3, and focal radiation results in regression of murine gliomas*. *Clin Cancer Res*, 2016.
207. Ward, M.J., et al., *Tumour-infiltrating lymphocytes predict for outcome in HPV-positive oropharyngeal cancer*. *Br J Cancer*, 2014. **110**(2): p. 489-500.
208. Nasman, A., et al., *Tumor infiltrating CD8+ and Foxp3+ lymphocytes correlate to clinical outcome and human papillomavirus (HPV) status in tonsillar cancer*. *PLoS One*, 2012. **7**(6): p. e38711.
209. Salama, P., et al., *Tumor-infiltrating FOXP3+ T regulatory cells show strong prognostic significance in colorectal cancer*. *J Clin Oncol*, 2009. **27**(2): p. 186-92.
210. Alvaro, T., et al., *Outcome in Hodgkin's lymphoma can be predicted from the presence of accompanying cytotoxic and regulatory T cells*. *Clin Cancer Res*, 2005. **11**(4): p. 1467-73.
211. Bron, L., et al., *Prognostic value of arginase-II expression and regulatory T-cell infiltration in head and neck squamous cell carcinoma*. *Int J Cancer*, 2013. **132**(3): p. E85-93.
212. Lukesova, E., et al., *High level of Tregs is a positive prognostic marker in patients with HPV-positive oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas*. *Biomed Res Int*, 2014. **2014**: p. 303929.



## **9. Příloha – soubor publikací autora k tématu habilitační práce**

- 1) **Boucek J**, Mrkvan T, Chovanec M, Kuchar M, Betka J, Boucek V, Hladikova M, Betka J, Eckschlager T, Rihova B. - Regulatory T cells and their prognostic value for patients with Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. JOURNAL OF CELLULAR AND MOLECULAR MEDICINE, 2010, Volume: 14, Issue: 1-2, Pages: 426-433. **Impact Factor – 4,938**  
*Publikace byla oceněna Kutvirtovou cenou České společnosti otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku ČLS JEP za nejlepší publikaci roku 2010.*
- 2) Lukesova E., **Boucek J.**, Rotnaglova E., Salakova M., Koslabova E., Grega M., Eckschlager T., Rihova B., Prochazka B., Klozar J., Tachezy R. - High Level of Tregs Is a Positive Prognostic Marker in Patients with HPV-Positive Oral and Oropharyngeal Squamous Cell Carcinomas - BIOMED RESEARCH INTERNATIONAL, 2014:303929, **Impact Factor – 2,134**
- 3) Partlová S., **Bouček J.**, Kloudová K., Lukešová E., Zábrodský M., Grega M., Fučíková J., Truxová I., Tachezy R., Špišek R. & Fialová A. - Distinct patterns of intratumoral immune cell infiltrates in patients with HPV-associated compared to non-virally induced head and neck squamous cell carcinoma, ONCOIMMUNOLOGY, 2015, Volume 4, Issue 1. **Impact Factor – 7,644**  
*Publikace byla oceněna cenou Jaroslava Štercla České imunologické společnosti za nejlepší publikaci roku 2015.*
- 4) Chytil P., Etrych T., Konák C., Sirová M., Mrkvan T., **Boucek J.**, Rihová B., Ulbrich K. - New HPMA copolymer-based drug carriers with covalently bound hydrophobic substituents for solid tumour targeting. JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, 2008 Apr 21;127(2):121-30. **Impact Factor – 7,441**

- 5) Ríhová B., Strohalm J., Hovorka O., Subr V., Etrych T., Chytil P., Pola R., Plocová D., **Boucek J.**, Ulbrich K. - Doxorubicin release is not a prerequisite for the *in vitro* cytotoxicity of HPMA-based pharmaceuticals: *in vitro* effect of extra drug-free GlyPheLeuGly sequences. JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, 2008 Apr 21;127(2):110-20. **Impact Factor – 7,441**
- 6) Fik Z., Dvorankova B., Kodet O., **Boucek J.**, Betka JA., Betka J., Andre S., Gabius HJ., Snajdr P., Smetana K., Chovanec M. - Towards Dissecting Molecular Routes of Intercellular Communication in the Tumour Microenvironment: Phenotypic Plasticity of Stem Cell-Associated Markers in Co-culture (Carcinoma Cell/Fibroblast) Systems - FOLIA BIOLOGICA, 2014, Volume: 60 Issue: 5 Pages: 205-212. **Impact Factor – 0,833**