

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program:
Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor:
Molekulární biologie a biochemie organismů



Natálie Dalewská

Imunitní buňky infiltrující preinvasivní léze a invazivní karcinomy vyvolané infekcí HPV
Immune cells infiltrating premalignant lesions and invasive carcinomas associated with HPV
infection

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Ruth Tachezy, Ph.D.

Praha, 2017

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 24. 8. 2017

Podpis

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat vedoucí práce RNDr. Ruth Tachezy, Ph.D. za poskytnuté rady, vstřícný přístup a věnovaný čas. Také děkuji Mgr. Barboře Pokrývkové za ochotu a praktické připomínky. V neposlední řadě patří poděkování i mé rodině, která mě v průběhu celého studia podporovala.

Abstrakt

Imunitní systém se účastní mnoha obranných mechanismů organismu, během kterých zapojuje různé typy imunitních buněk. Imunitní buňky hrají významnou roli při vzniku a progresi nádorů, které infiltrují a spoluvytváří nádorové mikroprostředí. Svou roli hrají i u onemocnění asociovaných s lidskými papilomaviry. Lidské papilomaviry jsou viry s onkogenním potenciálem schopné infikovat řadu anatomických lokalizací lidského těla. Tato infekce může vést ke vzniku benigních lézí, preinvazivních lézí a invazivních karcinomů. Preinvazivní léze často samovolně regredují, u pokročilejších stádií může docházet k progresi. Regrese nebo progresie lézí je dána genotypem HPV a množstvím, typem a lokalizací infiltrujících imunitních buněk. Součinnost těchto faktorů ovlivňuje prognózu onemocnění a případnou léčbu, a proto se určení imunologického skóre stává důležitým diagnostickým parametrem.

Poznatky o vlivu imunitních buněk na buňky nádorové se uplatňují při imunoterapeutické léčbě, která je založena na aktivaci vlastních protinádorových imunitních mechanismů. Imunoterapie se v kombinaci s další systémovou terapií využívá pro léčbu reziduálního onemocnění a podle posledních studií se předpokládá její uplatnění i jako monoterapie první volby.

V této práci shrnuji poznatky o imunitních buňkách infiltrujících preinvazivní léze a nádory asociované s infekcí HPV a popisují jejich vztah k prognóze onemocnění. V neposlední řadě zmiňuji možnosti imunoterapeutické léčby těchto onemocnění.

Klíčová slova: imunitní buňky, HPV, karcinom, preinvazivní, mikroprostředí, imunoterapie

Abstract

The immune system participates in many defence mechanisms of the body which involve the action of different types of immune cells. Immune cells play an important role in tumour development and progression. They infiltrate tumours and contribute to the tumour microenvironment. They are also implicated in diseases associated with human papillomavirus infection. Human papillomaviruses are viruses with oncogenic potential which cause infection in a number of anatomical locations of the human body. Such infection can lead to benign lesions, pre-invasive lesions, and invasive tumours. Pre-invasive lesions often regress spontaneously, but at advanced stages of the disease, progression to malignancy can occur. The tendency to regress or progress varies depending on the HPV genotype involved in the lesion and the quantity, type, and location of infiltrating immune cells. The synergy of these factors influences the prognosis and treatment of the disease, and, therefore, determining the immunological score as an important diagnostic parameter becomes of utmost relevance.

The knowledge of the effect of immune cells on tumour cells is useful in immunotherapy, which is based on the activation of the patient's own anti-tumour immune mechanisms. Immunotherapy is used in combination with systemic therapy for the treatment of residual disease and has the potential for use as the monotherapy in the future.

This thesis summarizes the findings about immune cells that infiltrate pre-invasive lesions and tumours induced by HPV and describes their relationship to the prognosis of the disease. Finally, the potential of immunotherapy for the treatment of these diseases is pointed out.

Key words: immune cells, HPV, cancer, pre-invasive, microenvironment, immunotherapy

Obsah

1. Úvod	1
2. Lidské papilomaviry	2
2.1 Taxonomie a klasifikace	2
2.2 Struktura virionu, virového genomu a funkce virových proteinů	2
2.3 Životní cyklus	3
2.4 Transformace buněk	4
2.5 Epidemiologie	6
2.6 Onemocnění spojená s infekcí papilomaviry	6
3. Imunitní systém	8
3.1 Neadaptivní imunitní systém	8
3.2 Adaptivní imunitní systém	9
3.3 Imunitní systém a HPV	11
4. Nádorové mikroprostředí a HPV	12
4.1 Imunitní buňky	13
4.2 Imunitní buňky v preinvazivních lézích a karcinomu hrdla děložního	16
4.3 Imunitní buňky v ostatních anogenitálních karcinomech	18
4.4 Imunitní buňky v karcinomech hlavy a krku	19
5. Imunoterapie	21
6. Imunoterapie u onemocnění asociovaných s HPV	22
7. Závěr	24
8. Seznam literatury	26

Seznam zkratek

zkratka	anglický název	český název
AIN	anal intraepithelial neoplasia	anální intraepiteliální neoplázie
APC	antigen presenting cell	buňka prezentující antigen
Bak	Bcl-2 homologous antagonist killer	antagonistický zabiják homologní k Bcl-2
CCL22	chemokine C-C motif ligand 22	ligand 22 chemokinů s C-C motivem
CD	cluster of differentiation	diferenční skupina
CIN	cervical intraepithelial neoplasia	cervikální intraepiteliální neoplázie
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4	protein 4 asociovaný s cytotoxickým T lymfocitem
DC	dendritic cell	dendritická buňka
DNA-PK	DNA-dependent protein kinase	DNA-dependentní protein kináza
E	early	časný
E2F	E2 factor	faktor E2
E6AP	E6-associated protein	protein asociovaný s proteinem E6
EGF	epidermal growth factor	epidermální růstový faktor
Foxp3	forkhead box P3	protein 3 s „forkhead“ boxem
GITR	glucocorticoid-induced TNFR-related protein	protein příbuzný TNFR indukovaný glukokortikoidy
HGL	high grade lesion	léze vysokého stupně
HPV	human papillomavirus	lidský papilomavirus
HR-HPV	high-risk human papillomavirus	vysoce rizikový typ lidského papilomaviru
IARC	International Agency for Research on Cancer	Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny
IFN	interferon	interferon
IL	interleukin	interleukin
ISH	<i>in situ</i> hybridization	<i>in situ</i> hybridizace
L	late	pozdní
LAK	lymphokine-activated killer	buňka zabiják aktivovaná lymfokinem
LC	Langerhans cell	Langerhansova buňka
LCR	long control region	dlouhá kontrolní oblast
LGL	low grade lesion	léze nízkého stupně
LR-HPV	low-risk human papillomavirus	nízce rizikový typ lidského papilomaviru
M1	macrophage type 1	makrofág typu 1

M2	macrophage type 2	makrofág typu 2
MHC	major histocompatibility complex	hlavní histokompatibilní komplex
MMP	matrix metalloprotease	matrixová metaloproteáza
MyD88	myeloid differentiation protein 88	myeloidní diferenciační protein 88
NK	natural killer cell	buňka přirozený zabiják
ORF	open reading frame	otevřený čtecí rámeček
p53	protein 53	protein o molekulové hmotnosti 53 kDa
PAMPs	pathogen-associated molecular patterns	molekulární vzory spojené s infekčními patogeny
PD-1	programmed death 1	receptor 1 programované buněčné smrti
PD-L1	programmed death-ligand 1	ligand 1 receptoru programované buněčné smrti
PDT	photodynamic therapy	fotodynamická terapie
PIN	penile intraepithelial neoplasia	penilní intraepiteliální neoplázie
pRb	retinoblastoma protein	retinoblastomový protein
PRRs	pattern recognition receptors	receptory rozeznávající molekulární vzory
PV	papillomavirus	papilomavirus
RNS	reactive nitrogen species	reaktivní formy dusíku
ROS	reactive oxygen species	reaktivní formy kyslíku
TAA	tumor-associated antigen	antigen asociovaný s nádorem
TAM	tumor-associated macrophage	makrofág asociovaný s nádorem
Tc	cytotoxic T lymphocyte	cytotoxický T lymfocyt
TGF	transforming growth factor	transformující růstový faktor
Th	helper T lymphocyte	pomocný T lymfocyt
TIL	tumor infiltrating lymphocyte	lymfocyt infiltrující nádor
TLRs	toll-like receptors	receptory skupiny podobné toll
TMA	tissue microarray	metoda „tissue microarray“
TNF	tumor necrosis factor	faktor nádorové nekrózy
TNM	tumor, node and metastasis classification	klasifikace nádoru, uzlin a metastáz
Treg	regulatory T lymphocyte	regulační T lymfocyt
TSA	tumor-specific antigen	antigen specifický pro nádor
VAIN	vaginal intraepithelial neoplasia	vaginální intraepiteliální neoplázie
VEGF	vascular endothelial growth factor	vaskulární endoteliální růstový faktor
VIN	vulvar intraepithelial neoplasia	vulvární intraepiteliální neoplázie

1. Úvod

Imunitní systém chrání organismus před škodlivými látkami a cizími i vlastními buňkami, které rozpoznává jako potenciálně nebezpečné. Při obranných procesech zapojuje neadaptivní i adaptivní imunitní mechanismy, jejichž rovnováha a možnost regulace je důležitá pro zajištění adekvátní imunitní odpovědi. Ta je zprostředkována na systematické i lokální úrovni různými typy imunitních buněk. Lokální působení imunitních buněk hraje významnou roli v eliminaci nádorových onemocnění. Imunitní buňky spoluvytváří nádorové mikroprostředí, v různém množství jej infiltrují, čímž mohou ovlivnit progresi nebo regresi onemocnění a prognózu pacienta.

Nádorové mikroprostředí se skládá z heterogenních populací buněk protkaných hustou cévní sítí, kterou nádor kompenzuje zvýšenou potřebu kyslíku a glukózy. Vznik nádoru představuje komplexní a mnohastupňový proces, při kterém se somatická buňka stává buňkou nádorovou. Na tomto procesu se mohou podílet i biologičtí činitelé, jako jsou bakterie a viry.

Mezi viry s onkogenním potenciálem patří i papilomaviry (PV, z angl. papillomavirus). PV jsou malé neobalené DNA viry, které infikují epitelální buňky lidí i zvířat. Lidské papilomaviry (HPV, z angl. human papillomavirus) mohou deregulovat buněčný cyklus a způsobit nadměrnou proliferaci infikovaných buněk, což vede k navození transformovaného stavu. HPV jsou příčinou druhého nejčastějšího onkologického onemocnění žen, kterým je karcinom hrdla děložního. Dále způsobují karcinomy v anogenitální oblasti mužů a žen a oblasti hlavy a krku a mohou být kofaktorem vzniku karcinomu kůže. Rizikovým faktorem pro vznik těchto karcinomů a jejich preinvasivních lézí je perzistence HPV infekce. Progrese nebo regrese onemocnění je dána funkcí imunitního systému.

Jedním ze směrů výzkumu v současné době je charakterizace rozdílů imunologických parametrů u pacientů s HPV asociovanými nádory a nádory s jinou etiologií lokalizovaných ve stejné anatomické lokalizaci ve vztahu k prognóze onemocnění. Získané poznatky jsou důležité pro vývoj nových léčebných postupů. U řady nádorů asociovaných s HPV infekcí nejsou tradiční způsoby léčby zcela účinné. Inovativní možností se zdá být imunoterapie založená na indukci protinádorových imunitních mechanismů.

Cílem mé bakalářské práce je shrnout nejnovější poznatky o imunitních buňkách a jejich funkci v preinvasivních lézích a karcinomech etiologicky spojených s infekcí HPV. V práci se také zabývám popisem HPV, imunitního systému, nádorového mikroprostředí a nakonec výčtem některých imunoterapeutických přístupů užívaných u nádorových onemocněních asociovaných s HPV.

2. Lidské papilomaviry

2.1 Taxonomie a klasifikace

Papilomaviry jsou malé neobalené DNA viry s vysokou druhovou specificitou. Lidské papilomaviry se rozdělují do 5 rodů (alfa-, beta-, gama-, mí- a ný-papilomaviry), z nichž tři rody (gama-, mí- a ný-papilomaviry) zahrnují výhradně lidské typy (Van Doorslaer, 2013). V rámci rodů jsou jednotlivé typy PV označovány čísly vyjadřujícími pořadí jejich objevení. PV se liší tkáňovým tropismem. Většina typů infikuje buď kožní nebo slizniční epitelální buňky hostitele, ale některé typy jsou schopné infikovat oba druhy epitelů.

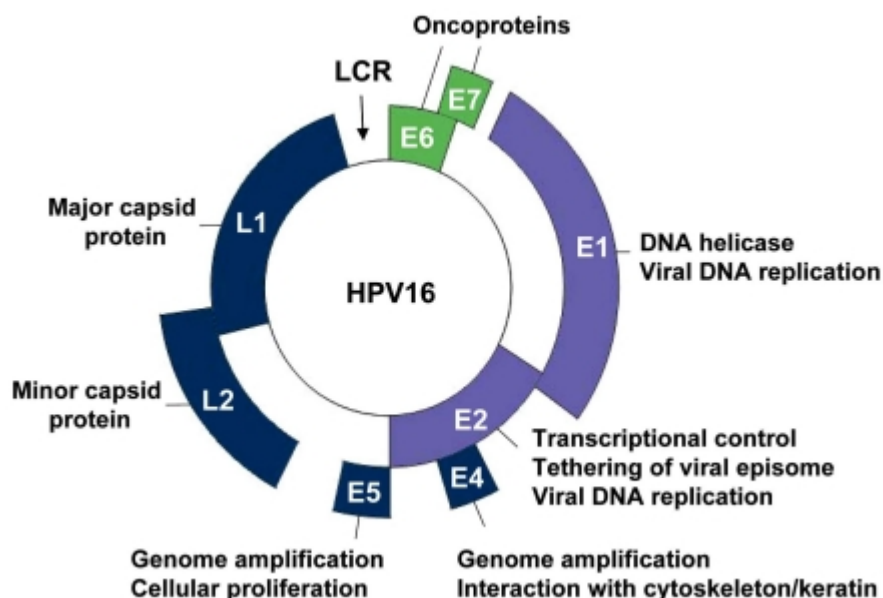
Podle onkogenního potenciálu se alfa-PV rozdělují do dvou skupin na vysoce rizikové (HR-HPV, z angl. high risk) a nízké rizikové (LR-HPV, z angl. low risk). Mezi HR-HPV patří například HPV16, 18, 31, 33, 35, 45 a mezi LR-HPV patří HPV6, 11, 42, 43, 44 (Bernard *et al.*, 2010). V roce 2009 se také dva typy beta-PV (HPV5 a HPV8) dostaly na seznam Mezinárodní agentury pro výzkum rakoviny (IARC, z angl. International Agency for Research on Cancer) jako pravděpodobně kancerogenní viry (Bouvard *et al.*, 2009).

2.2 Struktura virionu, virového genomu a funkce virových proteinů

Viriony lidských papilomavirů jsou neobalené s ikosahedrální symetrií kapsidy o velikosti cca 55 nm (Orth *et al.*, 1977). Genom HPV je tvořen cirkulární dvouvláknovou DNA obsahující oblast časných (E, z angl. early) a pozdních (L, z ang. late) genů oddělených nekódující sekvencí LCR (z angl. long control region), která obsahuje regulační sekvence. Oblast časných genů kóduje časné virové proteiny E1, E2, E4, E5, E6 a E7 a oblast pozdních genů kóduje majoritní protein L1 a minoritní protein L2, které jsou potřebné k sestavení virové kapsidy (Obr. č. 1). Z toho vyplývá, že HPV obsahuje celkem 8 různých otevřených čtecích rámců (ORF, z angl. open reading frame), přičemž všechny ORF nemusí být přítomné u všech HPV, např. beta-PV nemají E5.

Protein E1 se uplatňuje při replikaci viru, slouží jako helikáza a váže se do oblasti replikačního počátku. Protein E2 je transkripční faktor, který hraje roli jak při transkripci, tak i nepřímo při replikaci, protože umožňuje navázání E1 proteinu na *ori* sekvenci. Protein E4 přispívá k destrukci keratinocytů a k uvolnění virionu z buňky (Doorbar *et al.*, 1991). Protein E5, podle posledních studií, působí jako minoritní onkoprotein (Müller *et al.*, 2015). Udržováním keratinocytů v proliferačním stavu a navození vhodného buněčného prostředí pro virovou replikaci napomáhá onkoproteinům E6 a E7 (Bouvard *et al.*, 1994). Hlavní funkcí protei-

nů E6 a E7 je interakce s produkty buněčných tumor-supresorových genů (viz kapitola 2.4). Dále E6 degradací proapoptického proteinu Bak (z angl. Bcl-2 homologous antagonist killer) inhibuje apoptózu infikovaných buněk (Thomas & Banks, 1998) a E7 duplikací centrozomů při tvorbě mitotického aparátu způsobuje nestabilitu chromozómů (Duensing *et al.*, 2000).



Obr. č. 1: Schematické znázornění genomu HPV16, převzato (D'Abramo & Archambault, 2011).

2.3 Životní cyklus

Životní cyklus HPV začíná infekcí epitelálních buněk bazální vrstvy, s jejichž postupnou diferenciací je úzce spojen. V bazálních buňkách dochází k nízké expresi časných genů. Expresí pozdních genů, replikace genomu, která je závislá na buněčném replikačním aparátu, a morfogeneze virionu probíhají až ve vrchních vrstvách diferencovaných keratinocytů (Obr. č. 2). V průběhu diferenciaci ztrácí epitelální buňky jádro a schopnost se množit, což je esenciální pro vývoj HPV, a proto virus pomocí proteinů E6 a E7 udržuje keratinocyty v proliferacním stavu a zabraňuje jejich terminální diferenciaci (Münger *et al.*, 1989). Viriony se z buněk uvolňují přirozeným procesem při odlupování kůže, nejedná se tedy o lytickou infekci. Infekce je lokální a nevyvolává viremii.

Genom HPV se v infikovaných buňkách nachází v extrachromosomální formě, ale za určitých okolností je schopen se začlenit do genomu hostitelské buňky, což hraje důležitou

roli při zahájení transformačního procesu (Pirisi *et al.*, 1987). Integrace není nezbytnou podmínkou pro vznik karcinomu, ale buňky s integrovaným genomem HPV jsou vlivem neregulované kontinuální exprese proteinů E6 a E7 chromozomálně nestabilní a zvyšuje se u nich riziko kumulace mutací vedoucích k maligní transformaci buňky (White *et al.*, 1994; Pett *et al.*, 2004).

Pravděpodobnost integrace zvyšuje přítomnost zánětu vyvolávající tvorbu reaktivních forem kyslíku (ROS, z angl. reactive oxygen species) a dusíku (RNS, z angl. reactive nitrogen species), které jsou schopné navodit zlomy hostitelské DNA. Ke vzniku karcinomu děložního hrdla tak mohou přispívat i jiná sexuálně přenosná onemocnění způsobující zánět, jako je infekce bakterií *Chlamydia trachomatis* (Anttila *et al.*, 2001; Paba *et al.*, 2008) nebo herpetickými viry (Szostek *et al.*, 2009). Zvýšená pravděpodobnost integrace HPV16 do genomu hostitele byla prokázána u koinfekce virem herpes simplex virus typu 2 (Smith *et al.*, 2002), cytomegalovirem a virem Epstein-Barrové (Szostek *et al.*, 2009).

Za normálních okolností jsou zlomy dsDNA opravovány DNA-dependentní protein kinázou (DNA-PK, z angl. DNA-dependent protein kinase) přispívající k větší stabilitě chromosomů a k menší pravděpodobnosti integrace HPV. Ale u pacientek s karcinomem hrdla děložního Someya a kol. (2006) prokázali v lymfocytech periferní krve, v porovnání se zdravými ženami, nižší aktivitu DNA-PK, zatímco u karcinomů hlavy a krku tyto rozdíly nebyly pozorovány.

2.4 Transformace buněk

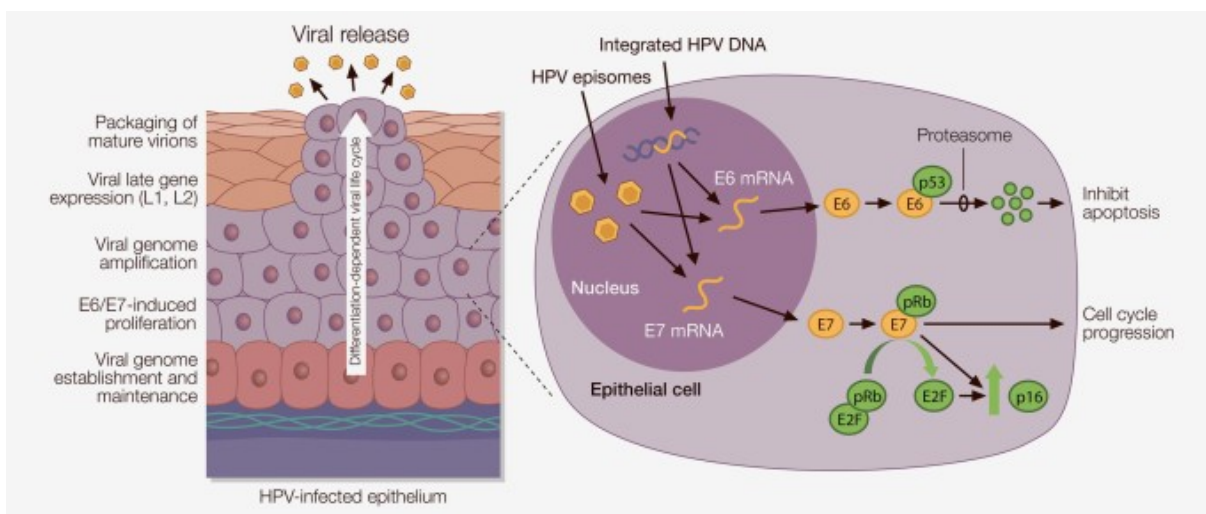
Transformační potenciál může být spojen s integrací virového genomu do genomu hostitelské buňky (Pirisi *et al.*, 1987), kdy ve většině případů, zatím z neznámých důvodů, dochází k narušení genů *E1* a *E2*. Inaktivace *E1* nebo *E2* genu a s tím spojená nepřítomnost *E2* proteinu jako transkripčního regulátoru vede k nadměrné expresi onkogenů *E6* a *E7*, což přispívá k nádorové transformaci (Jeon *et al.*, 1995). V posledních letech se zjistilo, že integrace není esenciální pro zahájení onkogeneze a funkce proteinu *E2* může být inaktivována i jiným mechanismem a to metylací jeho vazebných míst v časném virovém promotoru iniciujícím expresi *E6* a *E7* (Chaiwongkot *et al.*, 2013; Cheung *et al.*, 2013).

E6 a *E7* jsou nejdůležitějšími onkogeny papilomavirů, pod jejichž vlivem dochází k narušení buněčné genové exprese a buněčného cyklu. Proteiny *E6* a *E7* interagují s produkty buněčných tumor-supresorových genů (onkosupresorů), s proteinem o molekulové hmot-

nosti 53 kDa (p53, z angl. protein 53) a s retinoblastomovým proteinem (pRb, z angl. retinoblastoma protein) (Obr. č. 2).

V aktivovaném stavu je pRb negativním regulátorem buněčného cyklu, tudíž má anti-proliferační účinek. Protein E7 váže jeho hypofosforylovanou formu. V důsledku této vazby dojde k uvolnění transkripčního faktoru E2F (z angl. E2 factor) z komplexu pRb/E2F a následně k navození S-fáze buněčného cyklu (Dyson *et al.*, 1989). Inaktivace pRb vede k nekontrolovanému dělení buňky.

Protein p53 kontroluje poškození DNA a její správnou replikaci, je schopen buněčný cyklus pozastavit v G1/S a G2/M kontrolních bodech a indukovat buněčné opravné mechanismy. Pokud k reparaci DNA nedojde, p53 navodí apoptózu buňky. Protein p53 je vázán komplexem proteinu E6 a hostitelským proteinem spojeným s E6 (E6AP, z angl. E6-associated protein). E6AP je ubiquitin ligáza, která po navázání E6 vytváří polyubiquitinovou značku směřující p53 k proteazomální degradaci (Scheffner *et al.*, 1990). Ztráta p53 umožňuje hromadění genetických mutací a snížení citlivosti vůči apoptóze.



Obr. č. 2: Schematické znázornění životního cyklu HPV. Vlevo: vývoj HPV v průběhu diferenciaci keratinocytů na průřezu epitelu, vpravo: působení HPV na buněčné a molekulární úrovni, převzato (Andersen *et al.*, 2014).

2.5 Epidemiologie

Urogenitální HPV infekce patří k nejčastějším sexuálně přenosným onemocněním (Satterwhite *et al.*, 2013). Virus vstupuje do lidského organismu skrze poranění sliznice nebo kůže.

Infekce HPV a vznik onemocnění souvisí se sexuální aktivitou a počtem sexuálních partnerů. Zároveň bylo zjištěno, že vznik genitálních HPV infekcí u žen je ovlivněn sexuálním chováním nejen dotyčných žen, ale i jejich mužských partnerů (Burk *et al.*, 1996a). Použití kondomu sice snižuje riziko vzniku HPV infekce, avšak neposkytuje stoprocentní ochranu, protože přenos může proběhnout i přes okolní tkáň nechráněné kondomem (řit, pysky, šourek) (Burd, 2003).

Kromě sexuální aktivity je i věk důležitým faktorem HPV infekce. Vyšší riziko HPV infekce je u mladších žen (Ho *et al.*, 1998), u žen starších 45 let prevalence HPV infekce klesá (Burk *et al.*, 1996b). Naopak prevalence cervikálních lézí roste se zvyšujícím se věkem pacientek (35+), což souvisí s perzistencí infekce, která zvyšuje riziko progresu lézí (Adam *et al.*, 2000). Pokud nejsou tyto závažné léze včas odstraněny, mohou progredovat do invazivního karcinomu.

Mezi rizikové faktory pro indukci nádorů hlavy a krku patří kouření, které nezávisle na HPV infekci, zvyšuje pravděpodobnost vzniku orofaryngeálního karcinomu (Anantharaman *et al.*, 2016).

2.6 Onemocnění spojená s infekcí papilomaviry

HPV infekce bývá v převážné většině případů asymptomatická a do dvou let obvykle spontánně vymizí (Plummer *et al.*, 2007). Avšak u části infikovaných jedinců (10-15 %) infekce přetrvá a zvyšuje riziko vzniku maligních onemocnění (Rodriguez *et al.*, 2010).

Rozvoji malignit předchází výskyt transformujících (dříve prekancerózních) lézí, což jsou oblasti buněk se změněnou morfolofií a zvýšenou proliferací, které se mohou postupem času transformovat v nádorové buňky. Avšak ne každá transformující léze se vyvine v malignitu, protože vlivem buněk imunitního systému může docházet k jejich regresi.

Označení lézí hrdla děložního se historicky několikrát měnilo. V současné době se doporučuje označovat léze jako produktivní a transformující, přičemž produktivní léze odpovídají cervikálním intraepiteliálním neopláziím (CIN, z angl. cervical intraepithelial neoplasia) prvního a druhého stupně, které se též označují jako léze nízkého stupně (LGL, z ang.

low grade lesion), a léze transformující odpovídají CIN 2 a 3, které jsou též označovány jako léze vysokého stupně (HGL, z angl. high grade lesion). Produktivní léze mají obecně malý transformační potenciál. U transformujících lézí je již riziko maligního zvratu vysoké. Preinvazivní léze se mohou vyskytovat v různých anatomických lokalizacích a dle toho jsou i označovány: cervikální (CIN), vulvární (VIN, z angl. vulvar), vaginální (VAIN, z angl. vaginal), anální (AIN, z angl. anal) a penilní (PIN, z angl. penile) intraepiteliální neoplázie (Sarhanis *et al.*, 1996).

Potenciál vyvolat závažnější stupně preinvazivních lézí, které mohou progredovat v karcinom, mají HR-HPV. Až 70 % všech karcinomů děložního hrdla je způsobeno nejčastěji se vyskytujícími typy HR-HPV, a to HPV16 a HPV18 (Clifford *et al.*, 2003). Výzkum Vinokurové a kol. (2008) prokázal, že preinvazivní léze způsobené HPV typy 16, 18 a 45 mají schopnost se rychleji vyvinout v karcinom hrdla děložního než léze s HPV typy 31 a 33. HR-HPV také způsobují část dalších anogenitálních nádorů mužů a žen a část nádorů hlavy a krku, především v orofaryngeální lokalizaci. V oblasti hlavy a krku však nejsou, ve valné většině případů, preinvazivní léze detekovatelné.

LR-HPV způsobují benigní genitální bradavice a respirační papilomatózu. V těchto lézích se téměř výhradně nalézají HPV6 a HPV11 (Abramson *et al.*, 1987). Oproti tomu intraepiteliální neoplázie nízkého stupně (CIN1, VIN1, VAIN1, AIN1, PIN1) vyvolává celá řada LR-HPV typů.

Typy HPV5 a HPV8 z rodu beta působí u pacientů s kožním onemocněním *Epidermodyplasia verruciformis* jako vysoce rizikové (Majewski & Jablonska, 1997) a mohou působit jako kofaktor při progresi těchto lézí do spinocelulárního karcinomu kůže (Orth, 1986). V neposlední řadě HPV5 a HPV8 mohou u imunosuprimovaných jedinců společně s UV zářením působit jako kofaktory nemelanomového karcinomu kůže (Purdie *et al.*, 2005; Forslund *et al.*, 2007). U zdravých jedinců je role HPV při vzniku kožních malignit stále kontroverzní (McLaughlin-Drubin, 2015).

3. Imunitní systém

Imunitní systém je regulační soustava buněk a signálních molekul, jejichž hlavní funkcí je ochrana organismu před škodlivými látkami a mikroorganismy. Chrání nás před potenciálně nebezpečnými buňkami cizího původu, ale i před vlastními buňkami, které jsou rozpoznány jako abnormální, poškozené či staré. Existují dva typy imunitních mechanismů, adaptivní (specifické) a neadaptivní (přirozené). Oba se skládají z humorální a buněčné složky a reagují na antigeny, což jsou látky proteinového, lipidového, nebo i sacharidového původu stimulující imunitní odpověď.

3.1 Neadaptivní imunitní systém

Neadaptivní imunitní systém má vrozenou schopnost rozeznávat cizorodé struktury a mikroorganismy. Všichni zdraví jedinci v celé živočišné říši se rodí již s aktivním nespecifickým systémem, jelikož je nezávislý na předchozí stimulaci patogenem. Nespecifická imunita je založena na funkci tzv. profesionálních fagocytů, buněk schopných fagocytózy, mezi které patří neutrofilové, monocytové, makrofágy, žírné buňky a dendritické buňky (Delves & Roitt, 2000a) (Obr. č. 3). K tomuto typu imunity se řadí i kůže a sliznice sloužící jako přirozené bariéry organismu před vnějšími vlivy. Na povrchu buněk přirozené imunity se nacházejí specifické receptory PRRs (z angl. pattern recognition receptors) rozeznávající molekulární vzory spojené s infekčními patogeny (PAMPs, z angl. pathogen-associated molecular patterns), jako jsou lipopolysacharidy, lipoproteiny a prokaryotické nebo virové nukleové kyseliny. Významnou skupinou PRR jsou toll-like receptory (TLRs), jejichž aktivace spouští signální dráhy vedoucí k produkci cytokinů a chemokinů. Dvě nejčastěji aktivované dráhy jsou MyD88-závislá (z angl. myeloid differentiation protein 88) dráha vedoucí k produkci prozánětlivých cytokinů a MyD88-nezávislá dráha vedoucí ke stimulaci interferonu beta (IFN- β , z angl. interferon) a maturaci dendritických buněk (Medzhitov & Janeway Jr, 1997).

Dendritické buňky (DC, z angl. dendritic cell), které na svém povrchu exprimují MHC (z angl. major histocompatibility complex) glykoproteiny II. třídy, jsou buňkami prezentujícími antigeny (APC, z angl. antigen presenting cell) pro T lymfocyty (Guermontprez *et al.*, 2002). Zralými se stávají až po setkání s abnormálními buňkami představujícími potenciální nebezpečí pro organismus. Fungují jako spojka mezi nespecifickou a specifickou imunitou (Palucka & Banchereau, 1999). Makrofágy jsou plně funkční až po aktivaci cytokiny produkovánými T lymfocyty. Jejich hlavní funkcí je odstranění odumřelých buněk, cizích i vlast-

ních, a jsou schopné zabíjet intra i extracelulární bakterie. Do neadaptivního imunitního systému patří i NK buňky (z angl. natural killer cell), které ničí nádorové buňky nebo buňky infikované virem, které na svém povrchu vykazují nedostatek MHC glykoproteinů I. třídy (Kärre *et al.*, 1986; Ljunggren & Kärre, 1990; shrnuto v Kärre, 2002).

3.2 Adaptivní imunitní systém

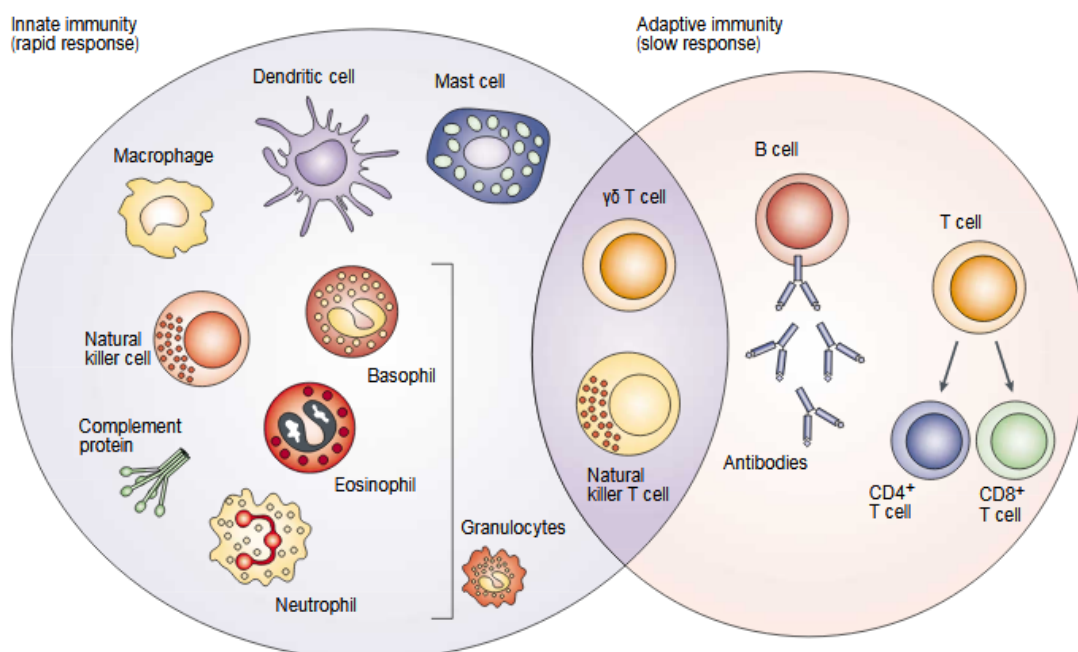
Adaptivní imunitní systém reprezentuje získanou schopnost obrany před patogeny, kterým byl již organismus vystaven. Tento imunitní systém se objevuje až u obratlovců, je evolučně mladší a vyspělejší. Adaptivní mechanismy využívají jevu zvaného imunologická paměť, která se vyvíjí v průběhu života a přispívá k rychlejší a účinnější imunitní odpovědi při opětovném setkání s patogenem. Činnost tohoto typu imunity je zajištěna dvěma typy buněk, B a T lymfocyty, které vznikají v kostní dřeni z lymfoidního progenitoru (Galy *et al.*, 1995).

B lymfocyty dozrávají v plazmatické buňky sloužící k tvorbě specifických protilátek, imunoglobulinů. Část B lymfocytů se přeměňuje na paměťové buňky. T lymfocyty se od B lymfocytů odlišují svou neschopností reagovat s antigenem přímo. Jejich kontakt s antigenem zprostředkovávají APC. APC fagocytují proteinový antigen a jeho peptidové fragmenty poté vystaví pomocí MHC glykoproteinů I. nebo II. třídy na svém povrchu.

T lymfocyty se pod vlivem odlišných stimulačních signálů a na základě funkčních rozdílů dělí do několika subpopulací. Pomocné T lymfocyty (Th, z angl. helper T lymphocyte) existují ve dvou základních variantách, Th1 a Th2 (Del Prete *et al.*, 1991; Mosmann & Sad, 1996). Th1 indukují buněčnou imunitní odpověď produkcí cytokinů, konkrétně interleukinu 12 (IL, z angl. interleukin) a IFN- γ , který aktivuje makrofágy, NK buňky a DC. Th2 buňky pomocí IL-4, 5, 6, 10 a 13 aktivují B lymfocyty k produkci protilátek, které představují humorální imunitní odpověď (Delves & Roitt, 2000b). Dále byly nezávisle na vývoji Th1 a Th2 popsány Th17, pro které je charakteristická produkce prozánětlivých cytokinů IL-17 a IL-22 (Park *et al.*, 2005). Cytotoxické T lymfocyty (Tc, z angl. cytotoxic T lymphocyte) jsou schopné ničit buňky prezentující cizorodé antigeny. Regulační T lymfocyty (Treg, z angl. regulatory T lymphocyte) kontrolují imunitní reakce a tlumí efektorové T lymfocyty, čímž zabraňují reakcím proti vlastním buňkám. Speciálním typem T lymfocytů jsou NK T lymfocyty a $\gamma\delta$ T lymfocyty. NK T lymfocyty mají na svém povrchu kromě $\alpha\beta$ -receptorů i stimulační a inhibiční receptory typické pro NK buňky. $\gamma\delta$ T lymfocyty exprimují menšinový typ receptorů T lymfocytů, a to $\gamma\delta$ -receptory. NK T lymfocyty a $\gamma\delta$ T lymfocyty se

kvůli své podobnosti s NK buňkami nachází na rozhraní neadaptivní a adaptivní imunity (Obr. č. 3) (Mak & Ferrick, 1998; Taniguchi *et al.*, 2003). NK T lymfocyty se dále člení na typy I a II. Typ I je důležitým regulátorem imunitních odpovědí, rychle produkuje cytokiny a je schopný degradovat cizorodé antigeny. Typ II se vyznačuje imunopresivní funkcí a je tedy negativním regulátorem imunitní odpovědi (Eberl *et al.*, 1999). $\gamma\delta$ T lymfocyty identifikují konzervované struktury, aktivují adaptivní imunitu a jsou schopné fungovat i jako APC a regulovat tak imunitní odpověď založenou na $\alpha\beta$ T lymfocytech (Brandes *et al.*, 2005).

T lymfocyty se, kromě vlastností a funkcí, odlišují i svými povrchovými molekulami. Každý leukocyt má na vnější straně plazmatické membrány skupinu diferenciačních antigenů (CD, z angl. cluster of differentiation), které jsou pro něj charakteristické (Engel *et al.*, 2015). Tyto antigeny slouží jako receptory, ligandy a molekulární „značky“ k rozpoznání typu buňky. CD3 a CD45 molekuly se standardně vyskytují na povrchu všech T lymfocytů. Zároveň pro většinu cytotoxických lymfocytů je charakteristická přítomnost CD8 molekul a pro většinu pomocných lymfocytů je charakteristická přítomnost CD4 molekul. Regulační T lymfocyty na svém povrchu exprimují CD4 a CD25 receptory. Dalšími molekulami Treg jsou CTLA-4 (z angl. cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4), GITR (z angl. glucocorticoid-induced tumour-necrosis-factor-receptor-related protein) a transkripční faktor Foxp3 (z angl. forkhead box P3), který představuje rozhodující selektivní znak pro Treg (Hori *et al.*, 2003).



Obr. č. 3: Složky neadaptivní a adaptivní imunity, převzato (Dranoff, 2004).

3.3 Imunitní systém a HPV

HPV infikují pouze epitelální buňky, které nelyzují. Produkce virových proteinů je závislá na diferenciaci keratinocytů, a proto HPV exprimují malé množství až do pozdní fáze životního cyklu. Jelikož HPV nemají viremickou fázi a v epitelech se nachází poměrně málo imunitních buněk, jsou HPV pro imunitní systém špatně viditelné. První obranou proti HPV je neadaptivní imunitní systém, který se v prvních fázích infekce snaží napadené buňky zneškodnit vyvoláním prozánětlivé odpovědi. Poté buňky vrozené imunity aktivují adaptivní imunitní systém. Spolupráce vrozené (NK buňky, fagocyty) a získané imunity (B lymfocyty a T lymfocyty) je důležitým faktorem pro účinnou protinádorovou imunitní odpověď. Správná regulace imunitních odpovědí a rovnováha mezi efektorovými a supresorovými funkcemi imunitního systému ovlivňuje progresi nebo regresi lézí (Sautès-Fridman *et al.*, 2011).

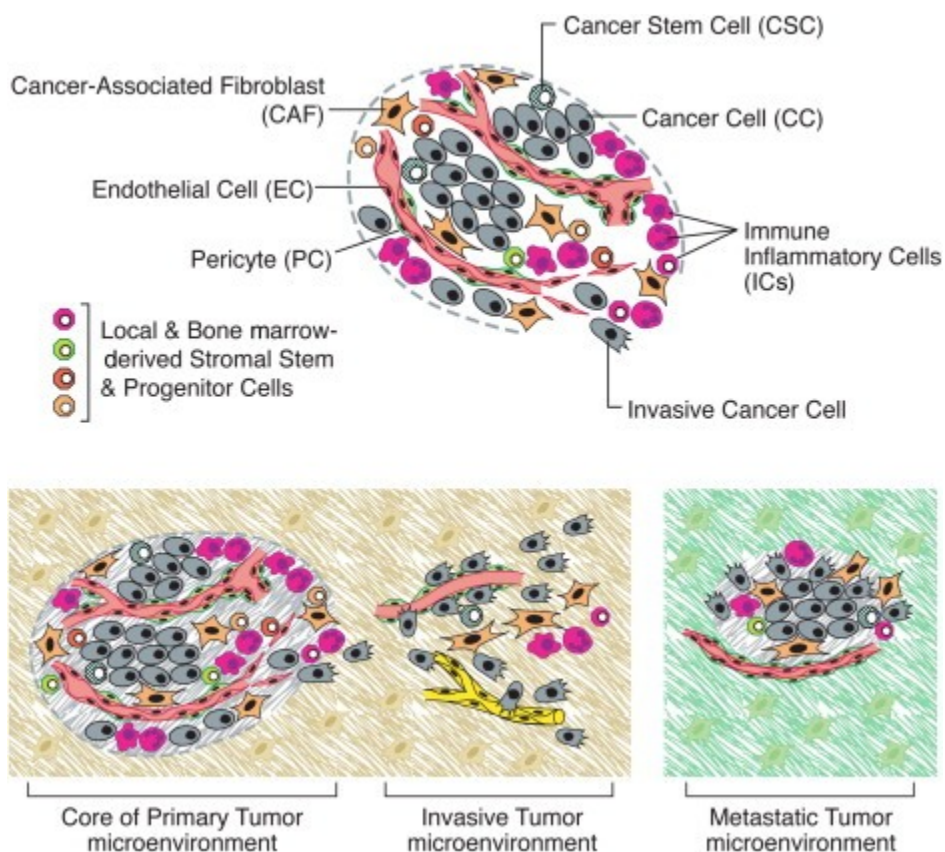
HPV k úniku před imunitním systémem využívá i schopnosti měnit hladinu cytokinů v místě infekce. Onkoproteiny E6 a E7 deregulují genovou expresi IFN- α a IFN- β a snižují jejich produkci v keratinocytech (Nees *et al.*, 2001). Onkoprotein E5 je schopen snižovat množství MHC glykoproteinů I. třídy na povrchu infikovaných buněk (Campo *et al.*, 2010).

Další mechanismus úniku HPV před imunitním systémem je zaměřen na Langerhansovy buňky (LC, z angl. Langerhans cell), které se nacházejí v pokožce hostitele. LC v kůži mají stejně jako DC v lymfatických uzlinách funkci APC pro T lymfocyty. HPV inhibují aktivaci LC a tím zabraňují spuštění protivirových imunitních mechanismů (Fausch *et al.*, 2002). Za neschopnost HPV aktivovat LC je zodpovědný minoritní kapsidový protein L2, který brání maturaci LC (Fahey *et al.*, 2009).

4. Nádorové mikroprostředí a HPV

Nádorové mikroprostředí je tvořeno nádorovými buňkami a nádorovým stroma, které zahrnuje fibroblasty, endotelové buňky a imunitní buňky hostitele a jejich molekulární produkty, mezi které patří cytokiny, chemokiny, růstové faktory a enzymy (Obr. č. 4). Nádorové buňky jsou odvozené od vlastních buněk organismu. Mají povrchové i vnitrobuněčné antigeny, které se s rozdílnou expresí mohou nacházet i v normálních buňkách, tzv. antigeny asociované s nádory (TAA, z angl. tumor-associated antigen). Druhou skupinou nádorových antigenů jsou antigeny specifické pro nádory (TSA, z angl. tumor-specific antigen) vyskytující se pouze v nádorových buňkách. Mezi TSA patří i virové onkoproteiny E6 a E7.

Nádorové stroma vzniká po zvýšení permeability cév a následném úniku koagulačních faktorů způsobeným zánětem. Důsledkem je vytvoření extracelulárního fibrinového gelu, do kterého se začlení fibroblasty. Ty následně proliferují a vytvoří nádorové stroma. Klíčovou roli, která ovlivňuje proliferaci nádorových buněk, růst nádoru a metastázování, hrají enzymy souhrnně nazývané matrixové metaloproteázy (MMP, z angl. matrix metalloprotease), které vznikají ve fibroblastech stroma (Stamenkovic, 2000).



Obr. č. 4: Nádorové mikroprostředí, převzato (Hanahan & Weinberg, 2011).

Pro nádorové mikroprostředí je kvůli nadměrné proliferaci transformovaných buněk typická zvýšená potřeba kyslíku a glukózy. Uplatňuje se tzv. Warburgův efekt, při kterém nádorové buňky k získání energie upřednostňují anaerobní glykolýzu i za přítomnosti kyslíku (Warburg, 1956). Pro přeměnu fosfoenolpyruvátu na pyruvát nádorové buňky preferenčně využívají izoformu pyruvát kinázy (tzv. pyruvátkinázu M2), která je méně efektivní, čímž napomáhá hromadění intermediátů glykolýzy. Vzniklý pyruvát je v cytoplazmě přednostně využíván procesem mléčného kvašení na laktát, částečně však může docházet k jeho přenosu do mitochondrií, kde je dále zpracováván oxidativní dekarboxylací. Laktát neboli kyselina mléčná je transportována z buňky a akumuluje se v okolí nádoru, které okyseluje. Takto snížené pH narušuje metabolismus a schopnost migrace T lymfocytů (Haas *et al.*, 2015) a tím potlačuje funkci imunitního systému. Zároveň studie zabývající se nádory hlavy a krku prokázala, že laktát podporuje migraci transformovaných buněk, která je spojena s vyšší pravděpodobností vzniku metastáz (Goetze *et al.*, 2011).

Během vývoje nádoru při zánětlivých imunitních procesech a opravách poškozené tkáně hrají roli žírné buňky neboli mastocyty. V oblasti nádoru regulují expresí různých typů vaskulárních endoteliálních růstových faktorů (VEGF, z angl. vascular endothelial growth factor) angiogenezi a přestavbu tkáně (Detoraki *et al.*, 2009).

4.1 Imunitní buňky

Imunitní buňky infiltrující nádory se studují jak v oblasti nádoru, tak i v periferní krvi pacienta, přičemž se zkoumá jejich množství, fenotyp a vztah ke klinickým parametrům a prognóze. Všechny studie však nemají stejnou výpovědní hodnotu, protože dříve se některé imunitní buňky, především Treg, charakterizovaly jen omezeným počtem povrchových znaků (Woo *et al.*, 2001), o kterých se dnes ví, že je exprimují i jiné buňky. Zároveň studie využívají různých metodických postupů. V dnešní době se buněčné složení nádoru i složení periferní krve charakterizuje většinou pomocí průtokové cytometrie, která umožňuje detekovat více znaků imunitních buněk najednou a přesněji určí typy buněk, které se v nich nacházejí. Průtoková cytometrie však nerozliší lokalizaci či možnou kolokalizaci buněk a celkovou architekturu nádoru, neboť vstupním materiálem je buněčná suspenze. Proto další důležitou metodou je imunohistochemie, během které se pomocí specifických protilátek na řezech nádoru značí vybrané buněčné znaky, čímž jsme schopni imunitní buňky identifikovat a určit jejich přesné rozmístění. Tato metoda se někdy označuje jako cytometrie *in situ*. Jiná metoda, *in situ* hybridizace (ISH, z angl. *in situ* hybridization), pomocí identifikace specifických úseků DNA a

mRNA také určí lokalizaci buněk v nádoru. V imunohistochemii některé vědecké práce využívají metodu TMA (z angl. tissue microarray). Její výhoda spočívá ve finanční a časové úspoře a též ve standardizaci, protože výseč několika vzorků je uložena v jednom parafinovém bloku a následně je řez z tohoto bloku zpracován jako jeden vzorek. Nevýhodou může být, že výseč ze vzorku nemusí, díky své velikosti, zobrazovat nádorové stroma a periferii, ale pouze centrální část nádoru. Použití této metody není též vhodné pro morfologicky heterogenní nádory. Kvůli metodickým rozdílům nelze jednotlivé studie jednoduše porovnávat.

Nádory mohou být infiltrovány různými typy imunitních buněk, např. B lymfocyty, T lymfocyty, NK buňkami, dendritickými buňkami, makrofágy. Souhrnně se nazývají lymfocyty infiltrující nádor (TIL, z angl. tumor infiltrating lymphocyte) a dělíme je podle lokalizace do tří skupin: (i) intratumorální nacházející se v centrální části nádoru, které jsou v přímém kontaktu s nádorovými buňkami, (ii) peritumorální nacházející se na hranici invazivního karcinomu a (iii) stromální vyskytující se v nádorovém stroma. TIL představují přirozené indikátory účinnosti protinádorové imunitní odpovědi a slouží jako prognostické faktory. Avšak je důležité rozlišovat různé typy infiltrujících T lymfocytů, protože mají odlišný vliv na vývoj nádoru (Gooden *et al.*, 2011).

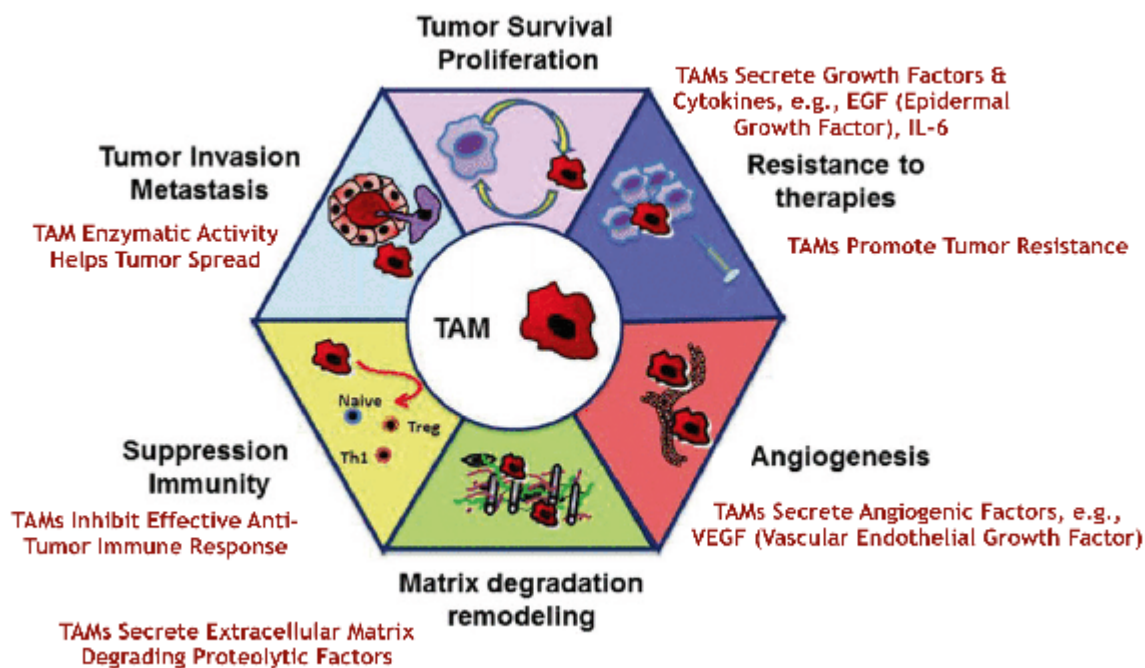
Prognostická výhoda CD8⁺ T lymfocytů byla prokázána u karcinomu vaječníků (Zhang *et al.*, 2003; Sato *et al.*, 2005; Leffers *et al.*, 2009) a kolorektálního karcinomu (Prall *et al.*, 2004). Th17 a neutrofilů produkci IL-17 negativně ovlivňují prognózu onemocnění. IL-17 zvyšuje angiogenezi tkáně (Numasaki *et al.*, 2003) a počet těsných spojů mezi buňkami, čímž zlepšuje jejich kontakt a podporuje růst nádoru především v časných fázích onemocnění (Kinugasa *et al.*, 2000). Další možný prognostický faktor představují CD4⁺ TIL, které zahrnují Th a Treg. Použití CD4⁺ TIL ke stanovení prognózy onemocnění je ale kontroverzní, protože se tyto buňky diferencují v různé subpopulace T lymfocytů (Kim & Cantor, 2014).

Treg jsou vlivem CCL22 chemokinu (z angl. chemokine C-C motif ligand 22) produkovaným makrofágy a dendritickými buňkami (Tsujikawa *et al.*, 2013) přesouvány a akumulovány v nádorech (Curiel *et al.*, 2004), kde produkci IL-10 a transformujícího růstového faktoru beta (TGF- β , z angl. transforming growth factor) potlačují efektorové T lymfocyty (Bergmann *et al.*, 2008). Treg tak svojí aktivitou snižují účinnost imunitního systému a přispívají k nádorovému bujení (Fujimoto *et al.*, 1975; Berendt & North, 1980). Wolf a kol. (2005) u karcinomu vaječníků a Visser a kol. (2007) u karcinomu hrdla děložního prokázali, že imunosupresivní vlastnosti regulačních TIL zhoršují prognózu onemocnění. Oproti tomu Zhang a kol. (2010) ve své práci zaměřené na nasofaryngeální karcinom zjistili, že regulační T lymfocyty slouží v pozdější fázi rozvoje onemocnění jako nezávislý prognostický faktor a

souvisí s lepšími výsledky léčby. Tyto výsledky naznačují, že prognostický význam TIL se může lišit dle lokalizace nádoru a stádia onemocnění. V současnosti je tak funkce Treg v nádorovém mikroprostředí stále ještě nejasná.

V posledních letech byl navržen jako významnější ukazatel prognózy solidních nádorů poměr mezi cytotoxickými (CD8+) a pomocnými (CD4+) buňkami, případně poměr mezi cytotoxickými (CD8+) a regulačními (Foxp3+) buňkami (Gooden *et al.*, 2011).

Makrofágy asociované s nádory (TAM, z angl. tumor-associated macrophage) mohou být dvojího typu, makrofágy typu 1 (M1) a typu 2 (M2). M1 produkcí IL-12 a faktoru nádorové nekrózy alfa (TNF- α , z angl. tumor necrosis factor) potlačují růst nádoru a M2 produkcí TGF- β a protizánětlivého cytokinu IL-10 podporují růst nádoru. Oba typy makrofágů však produkují řadu dalších látek, kterými ovlivňují nádorové mikroprostředí (Obr. č. 5). V nádorech se většinou vyskytují M2, které na svém povrchu exprimují větší množství receptoru CD163 a tvoří hlavní složku imunitních buněk přítomných v nádorovém stroma (Mantovani *et al.*, 2002). Přítomnost TAM negativně ovlivňuje prognózu (Movahedi *et al.*, 2010), protože tyto buňky rozpoznávají nádorovou tkáň jako poškozenou a přispívají k jejímu obnovení a tím i k proliferaci nádoru. Na myším modelu vedlo odstranění M2 k inhibici růstu nádoru a ke stimulaci CD8+ T lymfocytů (Lepique *et al.*, 2009).



Obr. č. 5: Funkce TAM, kterými podporují nádory, převzato a upraveno (Sica *et al.*, 2014).

Tumorogenní potenciál B lymfocytů spočívá ve schopnosti produkce TGF- β , jehož vlivem dochází k přeměně CD4⁺ T lymfocytů na Treg (Olkhanud *et al.*, 2011) a v potlačení aktivity CD8⁺ T lymfocytů skrze sekreci IL-10 (Schioppa *et al.*, 2011). Studie Tanga a kol. (2016) na myším modelu karcinomu hrdla děložního zbaveného B lymfocytů prokázala, že jejich absence vede k aktivaci CD4⁺ a CD8⁺ T lymfocytů a potlačení růstu nádoru.

NK buňky infiltrované v nádorech představují pouze malou část TIL. Přítomnost NK buněk koreluje s lepší prognózou HPV pozitivních (karcinom vulvy a orofaryngu) (Sznurkowski *et al.*, 2014; Wagner *et al.*, 2016) i HPV negativních karcinomů (karcinom kolorekta a plic) (Coca *et al.*, 1997; Villegas *et al.*, 2002). Pozitivní vliv NK buněk je založen na cytotoxických mechanismech, které zahrnují schopnost indukovat apoptózu nádorových buněk produkcí TNF nebo exocytózou granulí obsahujících proteiny perforin a granzym (Shresta *et al.*, 1995).

TIL se využívají k určení imunologického skóre. Imunologické skóre zahrnuje informace o typu, počtu a lokalizaci imunitních buněk v primárním nádoru. Recentní studie dokazují, že u některých typů nádorů má imunologické skóre lepší výpovědní hodnotu a napomáhá i k určení nejvhodnější léčby, a proto se u některých typů nádorů stává diagnosticky důležitější než dosud běžně využívaná TNM klasifikace (z angl. tumor, node and metastasis). Ta popisuje velikost nádoru, postižení lymfatických uzlin a přítomnost metastáz, ale poskytuje omezené informace o prognóze a nepředpovídá reakci pacienta na terapii (Galon *et al.*, 2012). Příkladem takového nádoru je kolorektální karcinom, u kterého byl prognostický význam imunologického skóre potvrzen a je dále studován (Mlecnik *et al.*, 2011; Park *et al.*, 2014; Park *et al.*, 2017). Začlenění imunologického skóre do klinické praxe vyžaduje jeho pečlivou standardizaci pro daný typ nádoru (Galon *et al.*, 2014).

4.2 Imunitní buňky v preinvazivních lézích a karcinomu hrdla

děložního

V mikroprostředí karcinomu hrdla děložního se nachází široký repertoár nádorově specifických CD4⁺ a CD8⁺ T lymfocytů. Vliv HPV specifických T lymfocytů na lokální protinádorovou imunitní odpověď se značně liší (de Vos van Steenwijk *et al.*, 2010). Imunitní odpověď založená na aktivitě CD4⁺ T lymfocytů je důležitá pro odstranění HPV infekce a je pravděpodobné, že nedostatek CD4⁺ T lymfocytů přispívá k progresi lézí (Steele *et al.*, 2005). Zvýšená hladina CD8⁺ TIL a zvýšený poměr CD8⁺/CD4⁺ T lymfocytů u karcinomu

hrdla děložního koreluje s absencí metastáz v lymfatických uzlinách a lepší prognózou onemocnění. Pacientky ve studii Piersma a kol. (2007) vykazovaly v intraepiteliální i stromální oblasti vyšší hladinu Foxp3+ Treg, které v tkáni hrdla děložního zdravých žen nebyly téměř přítomné. Zvýšená hladina Treg může být způsobena velkým množstvím TGF- β (Visser *et al.*, 2007), který je produkován nádorovými buňkami (Sheu *et al.*, 2001). TGF- β indukuje vývoj Treg z jejich prekursorů (Chen *et al.*, 2003) a jak bylo popsáno výše, může být produkován i makrofágy M2 a B lymfocyty infiltrovanými v nádoru.

Dále bylo prokázáno, že Treg v nádorovém mikroprostředí karcinomu hrdla děložního potlačují cytotoxickou aktivitu NK buněk. Inhibice NK buněk vede ke snížené expresi perforinu a IFN- γ a neúčinné protinádorové odpovědi. Snížená exprese NK buněk zároveň korelovala se zvýšenou expresí Treg (Chang *et al.*, 2016).

V porovnání s preinvazivními lézemi bylo u karcinomu hrdla děložního prokázáno větší množství žírných buněk. Nejnižší počet byl dokumentován ve zdravé tkáni a zvyšoval se se závažností onemocnění. Zvyšující se infiltrace žírných buněk také korelovala s rostoucí intenzitou angiogeneze karcinomu (Wilk *et al.*, 2010).

Podobný jev byl zaznamenán u infiltrace makrofágy. Počet intraepiteliálních i stromálních makrofágů se zvyšoval se zvětšujícím se zánětem a progresí CIN do invazivního karcinomu. Perzistující nebo progredující CIN vykazovaly, oproti regredujícím lézím, větší množství makrofágů, které tak představuje rizikový faktor pro progresi CIN (Hammes *et al.*, 2007).

Pacientky, u kterých bylo zaznamenáno zvýšené množství peritumorálních neutrofilů, měly vyšší riziko rekurence onemocnění (Carus *et al.*, 2013). Studie Matsumota a kol. (2017) toto riziko pozorovala i u neutrofilů v intratumorální oblasti. Neutrofilů by tak mohly sloužit jako nezávislý prognostický faktor pro rekurenci karcinomu hrdla děložního.

Th17 byly, v porovnání se zdravou tkání, ve větším množství dokumentovány v CIN a karcinomu hrdla děložního, ve kterých vyšší hladina IL-17 produkovaná Th17 korelovala s horší prognózou onemocnění. Vliv na vývoj a progresi onemocnění měl také nižší poměr Th17 a Treg (Hou *et al.*, 2012). Naopak studie Puntové a kol. (Punt *et al.*, 2015) prokázala opačný vliv Th17 na prognózu onemocnění. Th17 v nádorovém stroma zajišťovaly pouze minoritní produkci IL-17 a spíše korelovaly pozitivně s prognózou. V této studii prokázali, že IL-17 je produkován převážně neutrofilů a žírnými buňkami.

Studie Prata a kol. (2015) zaznamenala u keratinocytů, makrofágů a LC v karcinomu hrdla děložního a CIN stupně 2 a 3 zvýšenou produkci IL-10. Větší množství IL-10 vedlo

ke vzniku vysoce imunosupresivního mikroprostředí, které přispívá k perzistenci HPV a progresi lézí. Tato studie zároveň potvrdila, že zvýšená hladina IL-10 koreluje s větší virovou náloží (množství virové DNA).

4.3 Imunitní buňky v ostatních anogenitálních karcinomech

Mezi onemocnění anogenitální oblasti asociovaná s HPV infekcí patří vulvární, vaginální, penilní a anální karcinom a s nimi spojené intraepiteliální neoplázie. Dosud se tato problematika nejvíce studovala u onemocnění vulvy, naopak nejméně u penisu, což je dáno rozdílnou prevalencí onemocnění v populaci.

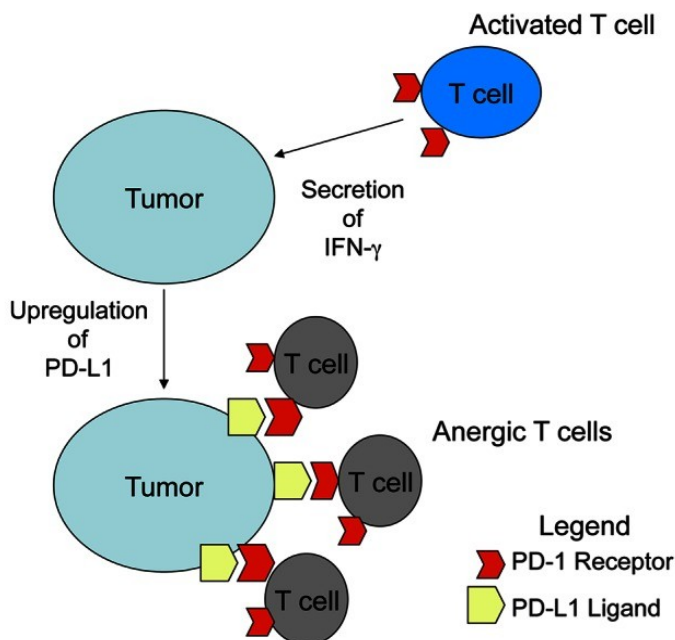
Studie van Eschové a kol. (2015) prokázala, že infiltrace VIN CD163+ makrofágy byla signifikantně spojena se zvýšeným rizikem rekurence onemocnění. Pacientky, u kterých se rekurence doposud neobjevila, vykazovaly nízké počty CD163+ makrofágů a větší množství stromálních CD8+ buněk, u kterých byl dříve prokázán pozitivní vliv na přežívání. U VIN dokumentovali vyšší počet intraepiteliálních i stromálních CD163+ M2, naopak u karcinomu vulvy v obou lokalizacích převažovaly M1. Poznatky van Eschové a kol. naznačují, že pro stanovení prognózy pacientek s VIN může být rozhodující přibližné určení počtu intraepiteliálních makrofágů.

Studie Sznurkowského a kol. (2011) zjistila, že u karcinomu vulvy množství intratumorálních CD4+ a CD8+ lymfocytů nekoreluje s přežíváním pacientek. CD4+ TIL se podílí na kontrole protinádorové imunitní odpovědi, ale CD8+ TIL v nádorové tkáni vulvy nefungovaly jako účinné efektorové buňky. I když CD4+ a CD8+ TIL interagovaly s nádorovými buňkami, tato interakce neovlivnila prognózu onemocnění. Naopak Sznurkowski a kol. (2014) prokázali, že zvýšená hladina intraepiteliálních NK buněk pozitivně ovlivňuje přežívání pacientek s metastazujícím karcinomem vulvy.

Nádorové buňky pod vlivem IFN- γ u většiny HPV negativních karcinomů penisu exprimují ligand 1 programované buněčné smrti (PD-L1, z angl. programmed death-ligand 1). Receptor 1 programované buněčné smrti (PD-1, z angl. programmed death 1) je exprimován na povrchu T lymfocytů. Pokud se na PD-1 naváže ligand PD-L1, dojde k imunosupresivní reakci a k anergii T lymfocytů, které tak nejsou schopné produkovat cytokiny (Obr. č. 6) (Pai, 2013). Exprese PD-L1 v nádorovém stroma karcinomu penisu korelovala s absencí metastáz v lymfatických uzlinách, zatímco difúzní exprese byla spojena s horším přežíváním pacientů (Ottenhof *et al.*, 2017). Podobný trend byl pozorován i u karcinomu hrdla děložního (Heeren *et al.*, 2016). Práce Ottenhofové a kol. (2017), která studovala vliv exprese PD-L1 na přežívá-

ní pacientů s karcinomem penisu a analyzovala i HPV status v nádorech, ukázala, že PD-L1 byl častěji exprimován u HPV negativních nádorů a lokalizace jeho exprese byla prognosticky významná.

Anální karcinom je ve více jak 80 % případů asociován s HR-HPV (Daling *et al.*, 2004). Studie Grabenbauera a kol. (2006) prokázala, že přítomnost CD4+ TIL je spojena s nepříznivou prognózou onemocnění. Naopak Treg a makrofágy infiltrované v nádoru neměly na prognózu análního karcinomu vliv.



Obr. č. 6: Aktivace PD-1/PD-L1 dráhy jako mechanismus obrany nádorových buněk před adaptivním imunitním systémem, převzato (Pai, 2013).

4.4 Imunitní buňky v karcinomech hlavy a krku

Ve většině nádorů v oblasti hlavy a krku asociovaných s HPV infekcí byly detekovány virově specifické T lymfocyty. Přítomnost T lymfocytů specifických pro HPV16 byla prokázána nejen v nádoru, ale i v lymfatických uzlinách pacientů s HPV16 pozitivním karcinomem orofaryngu (Heusinkveld *et al.*, 2012).

Nižší poměr CD8+ T lymfocytů a Treg u karcinomů hlavy a krku koresponduje s horším vývojem onemocnění (Heusinkveld *et al.*, 2012) stejně jako v případě karcinomu hrdla děložního (Jordanova *et al.*, 2008). Watanabe a kol. (2010) u karcinomu v oblasti dutiny ústní a Näsman a kol. (2012) u karcinomu tonsil prokázali, že zvýšená hladina CD8+ T lymfocytů

koreluje s lepší prognózou a slouží jako nezávislý prognostický faktor (Balermipas *et al.*, 2016).

HPV pozitivní orofaryngeální a tonzilární karcinomy jsou na rozdíl od HPV negativních spojeny s lepší prognózou onemocnění (Fakhry *et al.*, 2008; Näsman *et al.*, 2012). Oguejiofor a kol. (2017) zaznamenali stejnou expresi PD-1 u HPV pozitivních a negativních orofaryngeálních karcinomů, naopak exprese PD-L1 byla vyšší u HPV negativních karcinomů, což může vést k inhibici většího počtu CD8+ T lymfocytů a tím i horší prognóze onemocnění.

Rozdílná prognóza u HPV pozitivních a negativních karcinomů orofaryngu by mohla být způsobena i odlišnou distribucí tumorálních a stromálních TIL (Oguejiofor *et al.*, 2015). Studie Oguejiofora a kol. (2017) uvedla, že zvýšená hladina CD8+ T lymfocytů ve stromální oblasti HPV pozitivního karcinomu orofaryngu, na rozdíl od tumorální oblasti, koreluje s lepšími klinickými výsledky. U HPV negativních pacientů větší množství makrofágů ve stromální oblasti korelovalo s lepším přežíváním.

Infiltrace CD163+ TAM v karcinomu v dutině ústní byla spojena s agresivnějším vývojem nádoru, který se rozšířil i do lymfatických uzlin. Zvýšená exprese CD163 molekuly v nádoru byla v této studii spojena s horší prognózou onemocnění (He *et al.*, 2014).

Studie Wagnera a kol. (2016) zaznamenala u HPV pozitivních karcinomů orofaryngu větší množství NK buněk v oblasti nádoru a v nádorovém stroma. Přítomnost NK buněk byla, nezávisle na HPV statusu, spojena s lepším přežíváním pacientů a může být tedy zvažována jako nezávislý prognostický faktor u karcinomů v oblasti hlavy a krku.

Dále byl u HPV pozitivních karcinomů orofaryngu v porovnání s HPV negativními nádory dokumentován v intraepiteliální i stromální oblasti nižší počet neutrofilů. Méně neutrofilů produkovalo menší množství IL-17, což pravděpodobně vedlo k účinnější protinádorové imunitní odpovědi a přispělo tak lepšímu přežívání HPV pozitivních pacientů (Punt *et al.*, 2016).

5. Imunoterapie

V současné době se k léčbě onkologických onemocnění využívá zejména chirurgické odstranění nádorové masy, radioterapie a chemoterapie. Po určité době skepse se zdá, že i imunoterapie nachází své místo v léčbě onkologických onemocnění. Rozvoj imunoterapie je umožněn stále detailnějším poznáváním vzájemného působení nádorových buněk a buněk imunitního systému. Imunoterapie cíleně využívá imunitních mechanismů a je založena na stimulaci protinádorové imunity. Aby byla účinná, je nutné, aby byly splněny alespoň tři základní podmínky: imunogennost nádoru, malá velikost nádoru a funkční imunitní systém pacienta. Léčba musí být též specifická, aby její toxické účinky byly co nejmenší.

Hlavní role imunoterapie je v současnosti v léčbě residuální nemoci a metastáz. Využívá se i v kombinaci se systémovou léčbou. Objevují se však první studie, jejichž výsledky naznačují, že by mohla být v budoucnosti použita jako monoterapie první volby. Takovéto povolení pro použití již dostala pro solidní nádory monoklonální protilátka pembrolizumab (keytruda) blokující imunitní kontrolní bod (Seiwert *et al.*, 2016; Plimack *et al.*, 2017).

Mezi imunoterapeutické postupy patří aktivní specifická imunoterapie, tedy nádorové vakcíny. Zde přes intenzivní výzkum zatím nejsou dostupné vakcíny pro klinickou praxi, i když právě vakcíny namířené proti PV jsou intenzivně zkoumány (Jia *et al.*, 2017).

Dalším přístupem je aktivní nespecifická imunoterapie, která spočívá v podání látek nespecificky stimulujících imunitní systém, jako jsou například cytokiny či látky aktivující makrofágy. Komplikací této léčby, např. IL-2, bývá systémová zánětlivá odpověď, která může být pro pacienta život ohrožující. Tato terapie se však s úspěchem využívá pro lokální aplikaci např. u kožních nádorů (Anasagasti-Angulo *et al.*, 2009).

Pasivní imunoterapie, jako další metoda, spočívá v podání protilátek. Tento imunoterapeutický přístup je dnes asi nejvíce uplatňován v klinické praxi. Vedle přímého účinku protilátek blokadí cílových molekul bylo zjištěno, že dochází i k vyvolání cytotoxicity zprostředkované buňkami, což ještě zesiluje protinádorový účinek těchto protilátek.

Posledním přístupem je adoptivní buněčná terapie, která využívá TIL izolované přímo z nádorové tkáně (Vávrová *et al.*, 2015). Jejím cílem je zpětně injikovanými aktivovanými a namnoženými TIL způsobit lyzi nádorových buněk vedoucí k regresi až úplné eliminaci onemocnění. Podobným typem imunoterapie je využití LAK buněk (z angl. lymphokine-activated killer) získaných z periferní krve, které sice zčásti potlačí růst nádoru, ale kvůli své nižší specifitě jsou méně účinné než TIL, které jsou v eliminaci rakovinných buněk 50-100x účinnější (Rosenberg *et al.*, 1986).

6. Imunoterapie u onemocnění asociovaných s HPV

V klinické praxi pro léčbu onemocnění, v jejichž etiologii hrají roli HPV, se používá řada imunoterapeutických přístupů. Jedním z nich je pasivní imunizace. Jedná se o monoklonální protilátky, které jsou zaměřeny proti receptorům pro růstové faktory (Presta *et al.*, 1997; Baselga, 2000). Růstové faktory, mezi které patří VEGF a epidermální růstový faktor (EGF, z angl. epidermal growth factor), jsou produkovány nádorovými buňkami a jejich zvýšená exprese vede ke zvýšení proliferace a angiogeneze nádoru.

Cetuximab je monoklonální protilátka, která vazbou na receptor pro EGF na povrchu nádorových buněk blokuje účinky EGF, což vede ke snížení proliferace a k apoptóze buňky. Využívá se při léčbě nádorů v oblasti hlavy a krku společně s radioterapií nebo chemoterapií (Egloff *et al.*, 2014; Magnes *et al.*, 2017).

Na podobném principu je založena monoklonální protilátka bevacizumab cílená proti receptoru pro VEGF endotelu cév, jehož inhibice snižuje angiogenezi. Využívá se pro léčbu karcinomu hrdla děložního (Tewari *et al.*, 2014; Tewari *et al.*, 2017) a v kombinaci s cetuximabem byla zkoušena i u karcinomů v oblasti hlavy a krku (Argiris *et al.*, 2013).

Další typ monoklonálních protilátek zabraňuje aktivaci PD-1/PD-L1 dráhy, která patří mezi kontrolní body imunitního systému. Blokáce PD-1 nebo PD-L1 brání útlumu T lymfocytů a navození imunosupresivního stavu v nádoru. Nivolumab je monoklonální protilátka, která blokuje PD-1. Její léčbou bylo prodlouženo přežití pacientů s karcinom hlavy a krku, kteří již podstoupili chemoterapii a jejich prognóza byla stále nepříznivá (Ferris *et al.*, 2016). Další protilátkou blokující PD-1 je pembrolizumab, který se využívá také pro léčbu karcinomů v oblasti hlavy a krku (Chow *et al.*, 2016) a letos bylo jeho využití schváleno i jako monoterapie první volby pro inoperabilní anebo metastazující solidní nádory se specifickými biologickými znaky (poruchou mismatch oprav DNA nebo vysokou nestabilitou mikrosatelitů).

Mezi další metody využívané v klinické praxi pro onemocnění asociovaná s HPV patří fotodynamická terapie a imiquimod. Fotodynamická terapie (PDT, z angl. photodynamic therapy) je metoda založena na použití fotosenzibilizátoru, látky, která po podání indukuje citlivost organismu na světlo. Fotosenzibilizátor je vpraven do těla pacienta a díky vysoké afinitě k rychle proliferujícím buňkám se hromadí v nádorových buňkách. Fotosenzibilizátor po vystavení světlu o určité vlnové délce indukuje produkci ROS a způsobí cytotoxicitu v oblasti nádoru. ROS zastaví virovou replikaci a aktivují apoptózu nebo nekrózu transformovaných buněk obsahujících fotosenzibilizátor (shrnutí v Henderson & Dougherty, 1992). Poškozené nebo mrtvé buňky v průběhu PDT přispívají k aktivaci vrozeného i adaptivního imu-

nitního systému (Tanaka *et al.*, 2016). Nejčastěji používaným fotosenzibilizátorem v gynekologii je kyselina 5-aminolevulová, která se přeměňuje na porfyrin. Po expozici UV světla dochází k fluorescenci porfyrinu, kterou lze detekovat v nádorově transformovaných oblastech (Hillemanns *et al.*, 2000).

PDT se zkouší při léčbě CIN (Fu *et al.*, 2016), VIN a genitálních kondylomat. U mladých pacientek s VIN se PDT, oproti vulvektomii, jeví jako vhodnější léčba, protože umožňuje zachování pohlavních orgánů a jejich sexuální funkce (Choi *et al.*, 2015). Studie Lianga a kol. (2009) při léčbě genitálních bradavic ukázala, že PDT je účinnější než CO₂ laserová terapie, po které častěji dochází k rekurenci onemocnění.

Hlavní výhoda PDT spočívá ve specifitě a nízké invazivitě a toxicitě. Její použití je ale omezeno dosahem světelných paprsků, které pronikají jen cca 1 cm pod povrch tkáně.

Imiquimod je imunostimulační látka s antivirotickými a antitumorogenními účinky. Imiquimod navázáním na buněčné receptory, konkrétně TLR-7, aktivuje makrofágy a DC. Dochází ke stimulaci vrozených imunitních mechanismů a produkci prozánětlivých cytokinů IL-12, IFN- γ a TNF- α (Slade, 1998).

Imiquimod se využívá především při léčbě VIN. Podle studie van Seterse a kol. (2008) imiquimod u VIN zvyšuje počet imunitních buněk v epitelu a současně snižuje pravděpodobnost rekurence (Terlou *et al.*, 2011). Pozitivní účinky imiquimodu byly pozorovány i u VAIN (Tainio *et al.*, 2016) a CIN. U CIN došlo k regresi onemocnění až v 73 % (Grimm *et al.*, 2012). Výzkum Torelliho a kol. (2017) potvrdil efektivnost léčby imiquimodem u pacientů s karcinomem penisu asociovaným s HPV infekcí, u kterých bylo docíleno kompletní odpovědi na léčbu a absence relapsu po dobu průměrně 28 měsíců. Jednalo se však o malou studii, jejíž výsledky bude třeba dále ověřit a prokázat účinnost imiquimodu při delším sledování.

7. Závěr

Lidské papilomaviry jsou spojeny s nádorovými onemocněními v řadě lokalizací. Pacienti s HPV pozitivními nádory mají odlišnou imunitní odpověď a vykazují lepší prognózu oproti pacientům s nádory HPV negativními. Vysvětlení tohoto jevu může být dáno tím, že proteiny HPV fungují jako TSA. Studium imunitních buněk infiltrujících nádory je v současné době velmi aktuální, neboť pro diagnostiku některých onemocnění začíná být imunologické skóre důležitějším prognostickým nástrojem než běžná TNM klasifikace. Přesná charakterizace nádorového imunitního prostředí je předpokladem pro možné využití imunoterapie k léčení residuálního onemocnění a v budoucnosti i jako monoterapeutická alternativa k chemoterapii.

Nádory asociované s infekcí HPV jsou většinou, ze všech imunitních buněk, nejvíce infiltrovány T lymfocyty. CD8+ T lymfocyty díky cytotoxickým vlastnostem mají pozitivní vliv na prognózu pacienta. Navzdory intenzivnímu výzkumu jsou regulační T lymfocyty stále velmi kontroverzní populací, protože jejich vztah k prognóze se liší podle lokalizace nádoru a stádia onemocnění. Další úskalí přináší fakt, že dosud publikované studie popisující funkci Treg nejsou zcela konzistentní v charakterizaci této populace. Ve většině případů však zvýšená hladina Treg představuje negativní prognostický faktor. Kromě T lymfocytů jsou nádory infiltrovány i buňkami vrozeného imunitního systému. Makrofágy typu M2 infiltrující nádory produkují odlišné cytokiny než M1 a zhoršují přežívání pacientů. Největší množství makrofágů bylo, oproti jiným lokalizacím, zaznamenáno u onemocnění vulvy. I když populace NK buněk bývá ve srovnání s ostatními imunitními buňkami méně četná, jejich přítomnost pozitivně ovlivňuje prognózu pacientů.

Většina publikací zabývajících se vlivem imunitních buněk na prognózu charakterizuje imunitní buňky lokalizované intratumorálně a nerozlišuje infiltraci buněk v peritumorální oblasti a nádorovém stroma. Publikované studie však naznačují, že nejen fenotyp a kvantita, ale i lokalizace imunitních buněk v nádoru je prognosticky důležitá.

V důsledku intenzivního studia nádorových onemocnění jsou stále objevovány nové subpopulace T lymfocytů. Pochopení jejich funkce při indukci a proliferaci nádoru vyžaduje další studium. Výzkum by mohl být zaměřen i na nalezení dalších povrchových a intracelulárních znaků, které by sloužily ke spolehlivější charakterizaci jednotlivých populací.

I když některé dosud publikované práce ukazují rozličné výsledky, studium imunitních buněk u nádorů vyvolaných HPV je velmi intenzivní a umožňuje tak v některých případech již zavedení imunoterapeutických léčebných metod do klinické praxe. Nejvíce uplatňovaným

imunoterapeutickým přístupem je v současnosti pasivní podání protilátek, které se využívá při léčbě karcinomu hrdla děložního a karcinomů v oblasti hlavy a krku. Protipól představuje aktivní imunizace specifickými nádorovými vakcínami, které však nejsou dosud dostupné pro běžnou klinickou praxi. U nádorů lokalizovaných do 1 cm pod povrchem tkáně se využívá fotodynamická terapie. Pozitivní účinky při léčbě preinvazivních lézí v anogenitální oblasti vyvolala i imunostimulační látka imiquimod.

Ve své práci jsem shrnula dostupné poznatky o fenotypu, zastoupení a případně i funkci imunitních buněk v preinvazivních lézích a karcinomech asociovaných s HPV. V práci nezmiňuji studie analyzující imunitní buňky v periferní krvi. Je třeba též podotknout, že s rychlým vývojem poznatků v imunologii a technologickým postupem se mění možnosti a doporučení pro identifikaci subpopulací imunitních buněk, a je proto obtížné výsledky jednotlivých studií vzájemně porovnávat. Metody analýzy buněk v nádorech se však stále zlepšují. Metoda průtokové cytometrie napomáhá charakterizovat stále větší množství znaků a zpřesnit tak charakterizaci a funkci buněčných populací, výsledky imunohistochemických metod přináší informace o lokalizaci a možných interakcích buněk v tkáni.

8. Seznam literatury

- Abramson, A. L., Steinberg, B. M. & Winkler, B. (1987).** Laryngeal papillomatosis: clinical, histopathologic and molecular studies. *Laryngoscope* **97**, 678–685.
- Adam, E., Berkova, Z., Daxnerova, Z., Icenogle, J., Reeves, W. C. & Kaufman, R. H. (2000).** Gynecology Papillomavirus detection: Demographic and behavioral characteristics influencing the identification of cervical disease. *Am J Obstet Gynecol* **182**, 257–264.
- Anantharaman, D., Muller, D. C., Lagiou, P., Ahrens, W., Holcátová, I., Merletti, F., Kjærheim, K., Polesel, J., Simonato, L. & other authors. (2016).** Combined effects of smoking and HPV16 in oropharyngeal cancer. *Int J Epidemiol* **45**, 752–761.
- Anasagasti-Angulo, L., Garcia-Vega, Y., Barcelona-Perez, S., Lopez-Saura, P. & Bello-Rivero, I. (2009).** Treatment of advanced, recurrent, resistant to previous treatments basal and squamous cell skin carcinomas with a synergistic formulation of interferons. Open, prospective study. *BMC Cancer* **9**, 262.
- *Andersen, A. S., Koldjær Sølling, A. S., Ovesen, T. & Rusan, M. (2014).** The interplay between HPV and host immunity in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* **134**, 2755–2763.
- Anttila, T., Saikku, P., Koskela, P. & Al, E. (2001).** Serotypes of chlamydia trachomatis and risk for development of cervical squamous cell carcinoma. *JAMA* **285**, 47–51.
- Argiris, A., Kotsakis, A. P., Hoang, T., Worden, F. P., Savvides, P., Gibson, M. K., Gyanchandani, R., Blumenschein, G. R., Chen, H. X. & other authors. (2013).** Cetuximab and bevacizumab: Preclinical data and phase II trial in recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *Ann Oncol* **24**, 220–225.
- Balermipas, P., Rödel, F., Rödel, C., Krause, M., Linge, A., Lohaus, F., Baumann, M., Tinhofer, I., Budach, V. & other authors. (2016).** CD8+ tumour-infiltrating lymphocytes in relation to HPV status and clinical outcome in patients with head and neck cancer after postoperative chemoradiotherapy: A multicentre study of the German cancer consortium radiation oncology group (DKTK-ROG). *Int J Cancer* **138**, 171–181.
- Baselga, J. (2000).** Monoclonal antibodies directed at growth factor receptors. *Ann Oncol* **11 Suppl 3**, 187–190.
- Berendt, M. J. & North, R. J. (1980).** T-cell-mediated suppression of anti-tumor immunity. An explanation for progressive growth of an immunogenic tumor. *J Exp Med* **151**, 69–80.
- Bergmann, C., Strauss, L., Wang, Y., Szczepanski, M. J., Lang, S., Johnson, J. T. & Whiteside, T. L. (2008).** T regulatory type 1 cells in squamous cell carcinoma of the head and neck: Mechanisms of suppression and expansion in advanced disease. *Clin Cancer Res* **14**, 3706–3715.
- Bernard, H. U., Burk, R. D., Chen, Z., van Doorslaer, K., Hausen, H. zur & de Villiers, E. M. (2010).** Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology* **401**, 70–79.

*sekundární citace

- Bouvard, V., Matlashewski, G., Gu, Z. M., Storey, A. & Banks, L. (1994).** The human papillomavirus type 16 E5 gene cooperates with the E7 gene to stimulate proliferation of primary cells and increases viral gene expression. *Virology* **203**, 73–80.
- *Bouvard, V., Baan, R., Straif, K., Grosse, Y., Secretan, B., El Ghissassi, F., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Freeman, C. & other authors. (2009).** A review of human carcinogens--Part B: biological agents. *Lancet Oncol* **10**, 321–322.
- Brandes, M., Willmann, K. & Moser, B. (2005).** Professional Antigen-Presentation Function by Human gd T Cells. *Science (80-)* **309**, 264–268.
- Burd, E. (2003).** Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev* **16**, 1–17.
- Burk, R. D., Ho, G. Y., Beardsley, L., Lempa, M., Peters, M. & Bierman, R. (1996a).** Sexual behavior and partner characteristics are the predominant risk factors for genital human papillomavirus infection in young women. *J Infect Dis* **174**, 679–689.
- Burk, R. D., Kelly, P., Feldman, J., Bromberg, J., Vermund, S. H., Dehovitz, J. A. & Landesman, S. H. (1996b).** Declining Prevalence of Cervicovaginal Human Papillomavirus Infection With Age Is Independent of Other Risk Factors. *Sex Transm Dis* **23**, 333–341.
- Campo, M. S., Graham, S. V., Cortese, M. S., Ashrafi, G. H., Araibi, E. H., Dornan, E. S., Miners, K., Nunes, C. & Man, S. (2010).** HPV-16 E5 down-regulates expression of surface HLA class I and reduces recognition by CD8 T cells. *Virology* **407**, 137–142.
- Carus, A., Ladekarl, M., Hager, H., Nedergaard, B. S. & Donskov, F. (2013).** Tumour-associated CD66b+ neutrophil count is an independent prognostic factor for recurrence in localised cervical cancer. *Br J Cancer* **108**, 2116–2122.
- Clifford, G. M., Smith, J. S., Plummer, M., Munoz, N. & Franceschi, S. (2003).** Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *Br J Cancer* **88**, 63–73.
- Coca, S., Perez-Piqueras, J., Martinez, D., Colmenarejo, A., Saez, M. A., Vallejo, C., Martos, J. A. & Moreno, M. (1997).** The prognostic significance of intratumoral natural killer cells in patients with colorectal carcinoma. *Cancer* **79**, 2320–2328.
- Curiel, T. J., Coukos, G., Zou, L., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P., Evdemon-Hogan, M., Conejo-Garcia, J. R., Zhang, L. & other authors. (2004).** Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* **10**, 942–949.
- D'Abramo, C. M. & Archambault, J. (2011).** Small molecule inhibitors of human papillomavirus protein - protein interactions. *Open Virol J* **5**, 80–95.
- Daling, J. R., Madeleine, M. M., Johnson, L. G., Schwartz, S. M., Shera, K. A., Wurscher, M. A., Carter, J. J., Porter, P. L., Galloway, D. A. & McDougall, J. K. (2004).** Human papillomavirus, smoking, and sexual practices in the etiology of anal cancer. *Cancer* **101**, 270–280.
- *Delves, P. J. & Roitt, I. M. (2000a).** The immune system. First of two parts. *N Engl J Med* **343**, 37–49.
- *Delves, P. J. & Roitt, I. M. (2000b).** The immune system. Second of two parts. *N Engl J Med* **343**, 108–117.

*sekundární citace

- Detoraki, A., Staiano, R. I., Granata, F., Giannattasio, G., Prevete, N., de Paulis, A., Ribatti, D., Genovese, A., Triggiani, M. & Marone, G. (2009).** Vascular endothelial growth factors synthesized by human lung mast cells exert angiogenic effects. *J Allergy Clin Immunol* **123**, 1142–1149.
- Doorbar, J., Ely, S., Sterling, J., McLean, C. & Crawford, L. (1991).** Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature* **352**, 824–827.
- Van Doorslaer, K. (2013).** Evolution of the Papillomaviridae. *Virology* **445**, 11–20.
- Dranoff, G. (2004).** Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **4**, 11–22.
- Duensing, S., Lee, L. Y., Duensing, A., Basile, J., Piboonniyom, S., Gonzalez, S., Crum, C. P. & Munger, K. (2000).** The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins cooperate to induce mitotic defects and genomic instability by uncoupling centrosome duplication from the cell division cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 10002–10007.
- Dyson, N., Howley, P. M., Munger, K. & Harlow, E. (1989).** The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science (80-)* **243**, 934–937.
- Eberl, G., Lees, R., Smiley, S. T., Taniguchi, M., Grusby, M. J. & MacDonald, H. R. (1999).** Tissue-specific segregation of CD1d-dependent and CD1d-independent NK T cells. *J Immunol* **162**, 6410–6419.
- Egloff, A. M., Lee, J.-W., Langer, C. J., Quon, H., Vaezi, A., Grandis, J. R., Seethala, R. R., Wang, L., Shin, D. M. & other authors. (2014).** Phase II Study of Cetuximab in Combination with Cisplatin and Radiation in Unresectable, Locally Advanced Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Eastern Cooperative Oncology Group Trial E3303. *Clin Cancer Res* **20**, 5041–5051.
- Engel, P., Boumsell, L., Balderas, R., Bensussan, A., Gattei, V., Horejsi, V., Jin, B.-Q., Malavasi, F., Mortari, F. & other authors. (2015).** CD Nomenclature 2015: Human Leukocyte Differentiation Antigen Workshops as a Driving Force in Immunology. *J Immunol* **195**, 4555–4563.
- van Esch, E. M. G., van Poelgeest, M. I. E., Trimpos, J. B. M. Z., Fleuren, G. J., Jordanova, E. S. & van Der Burg, S. H. (2015).** Intraepithelial macrophage infiltration is related to a high number of regulatory T cells and promotes a progressive course of HPV-induced vulvar neoplasia. *Int J Cancer* **136**, E85–E94.
- Fahey, L. M., Raff, A. B., Da Silva, D. M. & Kast, W. M. (2009).** A Major Role for the Minor Capsid Protein of Human Papillomavirus Type 16 in Immune Escape. *J Immunol* **183**, 6151–6156.
- Fakhry, C., Westra, W. H., Li, S., Cmelak, A., Ridge, J. A., Pinto, H., Forastiere, A. & Gillison, M. L. (2008).** Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *J Natl Cancer Inst* **100**, 261–269.
- Fausch, S. C., Da Silva, D. M., Rudolf, M. P. & Kast, W. M. (2002).** Human Papillomavirus Virus-Like Particles Do Not Activate Langerhans Cells: A Possible Immune Escape Mechanism Used by Human Papillomaviruses. *J Immunol* **169**, 3242–3249.

- Ferris, R. L., Blumenschein, G., Fayette, J., Guigay, J., Colevas, A. D., Licitra, L., Harrington, K., Kasper, S., Vokes, E. E. & other authors. (2016). Nivolumab for Recurrent Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *N Engl J Med* **375**, 1856–1867.
- Forslund, O., Iftner, T., Andersson, K., Lindelöf, B., Hradil, E., Nordin, P., Stenquist, B., Kirnbauer, R., Dillner, J. & de Villiers, E. (2007). Cutaneous Human Papillomaviruses Found in Sun-Exposed Skin: Beta-papillomavirus Species 2 Predominates in Squamous Cell Carcinoma. *J Infect Dis* **196**, 876–883.
- Fu, Y., Bao, Y., Hui, Y., Gao, X., Yang, M. & Chang, J. (2016). Topical photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid for cervical high-risk HPV infection. *Photodiagnosis Photodyn Ther* **13**, 29–33.
- Fujimoto, S., Greene, M. & Schon, A. H. (1975). Immunosuppressor T Cells in Tumor Bearing Hosts. *Immunol Commun* **4**, 201–217.
- *Galon, J., Pagès, F., Marincola, F. M., Thurin, M., Trinchieri, G., Fox, B. A., Gajewski, T. F., Ascierto, P. A., Locker, G. & other authors. (2012). The immune score as a new possible approach for the classification of cancer. *J Transl Med* **10**, 1.
- *Galon, J., Mlecnik, B., Bindea, G., Angell, H. K., Berger, A., Lagorce, C., Lugli, A., Zlobec, I., Hartmann, A. & other authors. (2014). Towards the introduction of the ‘Immunescore’ in the classification of malignant tumours. *J Pathol* **232**, 199–209.
- Galy, A., Travis, M., Cen, D. & Chen, B. (1995). Human T, B, Natural Killer, and Dendritic Cells Arise From a Common Bone Marrow Progenitor Cell Subset. *Immunity* **3**, 459–473.
- Goetze, K., Walenta, S., Ksiazkiewicz, M., Kunz-Schughart, L. A. & Mueller-Klieser, W. (2011). Lactate enhances motility of tumor cells and inhibits monocyte migration and cytokine release. *Int J Oncol* **39**, 453–463.
- *Gooden, M. J. M., Bock, G. H. De, Leffers, N., Daemen, T. & Nijman, H. W. (2011). The prognostic influence of tumour-infiltrating lymphocytes in cancer : a systematic review with meta-analysis. *Br J Cancer* **105**, 93–103.
- Grabenbauer, G. G., Lahmer, G., Distel, L. & Niedobitek, G. (2006). Tumor-infiltrating cytotoxic T cells but not regulatory T cells predict outcome in anal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* **12**, 3355–3360.
- Grimm, C., Polterauer, S., Natter, C., Rahhal, J., Hefler, L., Tempfer, C. B., Heinze, G., Stary, G., Reinthaller, A. & Speiser, P. (2012). Treatment of Cervical Intraepithelial Neoplasia With Topical Imiquimod. *Obstet Gynecol* **120**, 152–159.
- Guermonez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., Théry, C. & Amigorena, S. (2002). Antigen Presentation And T Cell Stimulation By Dendritic Cells. *Annu Rev Immunol* **20**, 621–667.
- Haas, R., Smith, J., Rocher-Ros, V., Nadkarni, S., Montero-Melendez, T., D’Acquisto, F., Bland, E. J., Bombardieri, M., Pitzalis, C. & other authors. (2015). Lactate regulates metabolic and proinflammatory circuits in control of T cell migration and effector functions. *PLoS Biol* **13**, 1–24.

*sekundární citace

- Hammes, L. S., Tekmal, R. R., Naud, P., Edelweiss, M. I., Kirma, N., Valente, P. T., Syrjänen, K. J. & Cunha-Filho, J. S. (2007).** Macrophages, inflammation and risk of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) progression-Clinicopathological correlation. *Gynecol Oncol* **105**, 157–165.
- Hanahan, D. & Weinberg, R. A. (2011).** Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **144**, 646–674.
- He, K.-F., Zhang, L., Huang, C.-F., Ma, S.-R., Wang, Y.-F., Wang, W.-M., Zhao, Z.-L., Liu, B., Zhao, Y.-F. & other authors. (2014).** CD163+ tumor-associated macrophages correlated with poor prognosis and cancer stem cells in oral squamous cell carcinoma. *Biomed Res Int* **2014**, 838632.
- Heeren, A. M., Punt, S., Bleeker, M. C., Gaarenstroom, K. N., van der Velden, J., Kenter, G. G., de Gruijl, T. D. & Jordanova, E. S. (2016).** Prognostic effect of different PD-L1 expression patterns in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the cervix. *Mod Pathol* **29**, 753–763.
- *Henderson, B. W. & Dougherty, T. J. (1992).** How Does Photodynamic Therapy Work? *Photochem Photobiol* **55**, 145–157.
- Heusinkveld, M., Goedemans, R., Briet, R. J. P., Gelderblom, H., Nortier, J. W. R., Gorter, A., Smit, V. T. H. B. M., Langeveld, A. P. M., Jansen, J. C. & van der Burg, S. H. (2012).** Systemic and local human papillomavirus 16-specific T-cell immunity in patients with head and neck cancer. *Int J Cancer* **131**, E74–E85.
- Hillemanns, P., Weingandt, H., Baumgartner, R., Diebold, J., Xiang, W. & Stepp, H. (2000).** Photodetection of cervical intraepithelial neoplasia using 5- aminolevulinic acid-induced porphyrin fluorescence. *Cancer* **88**, 2275–2282.
- Ho, G. Y. F., Bierman, R., Beardsley, L., Chang, C. J. & Burk, R. D. (1998).** Natural History of Cervicovaginal Papillomavirus Infection In Young Women. *N Engl J Med* **338**, 423–428.
- Hori, S., Nomura, T. & Sakaguchi, S. (2003).** Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* **299**, 1057–1061.
- Hou, F., Li, Z., Ma, D., Zhang, W., Zhang, Y., Zhang, T., Kong, B. & Cui, B. (2012).** Distribution of Th17 cells and Foxp3-expressing T cells in tumor-infiltrating lymphocytes in patients with uterine cervical cancer. *Clin Chim Acta* **413**, 1848–1854.
- Chaiwongkot, A., Vinokurova, S., Pientong, C., Ekalaksananan, T., Kongyingyoes, B., Kleebkaow, P., Chumworathayi, B., Patarapadungkit, N., Reuschenbach, M. & Von Knebel Doeberitz, M. (2013).** Differential methylation of E2 binding sites in episomal and integrated HPV 16 genomes in preinvasive and invasive cervical lesions. *Int J Cancer* **132**, 2087–2094.
- Chang, W.-C., Li, C.-H., Chu, L.-H., Huang, P.-S., Sheu, B.-C. & Huang, S.-C. (2016).** Regulatory T Cells Suppress Natural Killer Cell Immunity in Patients With Human Cervical Carcinoma. *Int J Gynecol Cancer* **26**, 156–162.

*sekundární citace

- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K., Li, L., Marinos, N., McGrady, G. & Wahl, S. M. (2003).** Conversion of Peripheral CD4 + CD25 – Naive T Cells to CD4 + CD25 + Regulatory T Cells by TGF- β Induction of Transcription Factor Foxp3. *J Exp Med* **198**, 1875–1886.
- Cheung, J. L. K., Cheung, T. H., Yu, M. Y. & Chan, P. K. S. (2013).** Virological characteristics of cervical cancers carrying pure episomal form of HPV16 genome. *Gynecol Oncol* **131**, 374–379.
- Choi, M. C., Kim, M. S., Lee, G. H., Jung, S. G., Park, H., Joo, W. D., Lee, C., Lee, J. H., Hwang, Y. Y. & Kim, S. J. (2015).** Photodynamic therapy for premalignant lesions of the vulva and vagina: A long-term follow-up study. *Lasers Surg Med* **47**, 566–570.
- Chow, L. Q. M., Haddad, R., Gupta, S., Mahipal, A., Mehra, R., Tahara, M., Berger, R., Eder, J. P., Burtness, B. & other authors. (2016).** Antitumor activity of pembrolizumab in biomarker-unselected patients with recurrent and/or metastatic head and neck squamous cell carcinoma: Results from the phase Ib KEYNOTE-012 expansion cohort. *J Clin Oncol* **34**, 3838–3845.
- Jeon, S., Allen-Hoffmann, B. L. & Lambert, P. F. (1995).** Integration of human papillomavirus type 16 into the human genome correlates with a selective growth advantage of cells. *J Virol* **69**, 2989–2997.
- Jia, Y. Y., Tan, W. J., Duan, F. F., Pan, Z. M., Chen, X., Yin, Y. L. & Jiao, X. A. (2017).** A Genetically Modified attenuated Listeria Vaccine Expressing HPV16 E7 Kill Tumor Cells in Direct and Antigen-Specific Manner. *Front Cell Infect Microbiol* **7**, 279.
- Jordanova, E. S., Gorter, A., Ayachi, O., Prins, F., Durrant, L. G., Kenter, G. G., Van Der Burg, S. H. & Fleuren, G. J. (2008).** Human leukocyte antigen class I, MHC class I chain-related molecule A, and CD8+/regulatory T-cell ratio: Which variable determines survival of cervical cancer patients? *Clin Cancer Res* **14**, 2028–2035.
- Kärre, K., Ljunggren, H. G., Piontek, G. & Kiessling, R. (1986).** Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature* **319**, 675–678.
- *Kärre, K. (2002).** NK cells, MHC class I molecules and the missing self. *Scand J Immunol* **55**, 221–228.
- *Kim, H.-J. & Cantor, H. (2014).** CD4 T-cell Subsets and Tumor Immunity: The Helpful and the Not-so-Helpful. *Cancer Immunol Res* **2**, 91–98.
- Kinugasa, T., Sakaguchi, T., Gu, X. & Reinecker, H. C. (2000).** Claudins regulate the intestinal barrier in response to immune mediators. *Gastroenterology* **118**, 1001–1011.
- Leffers, N., Gooden, M. J. M., De Jong, R. A., Hoogeboom, B. N., Ten Hoor, K. A., Hollema, H., Boezen, H. M., Van Der Zee, A. G. J., Daemen, T. & Nijman, H. W. (2009).** Prognostic significance of tumor-infiltrating T-lymphocytes in primary and metastatic lesions of advanced stage ovarian cancer. *Cancer Immunol Immunother* **58**, 449–459.
- Lepique, A. P., Daghanli, K. R. P., Cuccovia, I. & Villa, L. L. (2009).** HPV16 tumor associated macrophages suppress antitumor T cell responses. *Clin Cancer Res* **15**, 4391–4400.

*sekundární citace

- Liang, J., Lu, X. N., Tang, H., Zhang, Z., Fan, J. & Xu, J. H. (2009).** Evaluation of photodynamic therapy using topical aminolevulinic acid hydrochloride in the treatment of condylomata acuminata: a comparative, randomized clinical trial. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* **25**, 293–297.
- Ljunggren, H. G. & Kärre, K. (1990).** In search of the ‘missing self’: MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* **11**, 237–244.
- Magnes, T., Melchardt, T., Weiss, L., Mittermair, C., Neureiter, D., Klieser, E., Gampenrieder, S., Moser, G., Gaggl, A. & other authors. (2017).** Prognostic score in patients with recurrent or metastatic carcinoma of the head and neck treated with cetuximab and chemotherapy. *PLoS One* **12**, e0180995.
- Majewski, S. & Jablonska, S. (1997).** Human papillomavirus-associated tumors of the skin and mucosa. *J Am Acad Dermatol* **36**, 659–685.
- Mak, T. W. & Ferrick, D. A. (1998).** The [gamma][delta] T-cell bridge: Linking innate and acquired immunity. *Nat Med* **4**, 764–765.
- *Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P. & Sica, A. (2002).** Macrophage polarization: Tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol* **23**, 549–555.
- Matsumoto, Y., Mabuchi, S., Kozasa, K., Kuroda, H., Sasano, T., Yokoi, E., Komura, N., Sawada, K. & Kimura, T. (2017).** The significance of tumor-associated neutrophil density in uterine cervical cancer treated with definitive radiotherapy. *Gynecol Oncol* **145**, 469–475.
- McLaughlin-Drubin, M. E. (2015).** Human papillomaviruses and non-melanoma skin cancer. *Semin Oncol* **42**, 284–290.
- Medzhitov, R. & Janeway Jr, C. A. (1997).** Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol* **9**, 4–9.
- Mlecnik, B., Tosolini, M., Kirilovsky, A., Berger, A., Bindea, G., Meatchi, T., Bruneval, P., Trajanoski, Z., Fridman, W. H. & other authors. (2011).** Histopathologic-based prognostic factors of colorectal cancers are associated with the state of the local immune reaction. *J Clin Oncol* **29**, 610–618.
- Mosmann, T. R. & Sad, S. (1996).** The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* **17**, 138–146.
- Movahedi, K., Laoui, D., Gysemans, C., Baeten, M., Stangé, G., Van Bossche, J. Den, Mack, M., Pipeleers, D., In’t Veld, P. & other authors. (2010).** Different tumor microenvironments contain functionally distinct subsets of macrophages derived from Ly6C(high) monocytes. *Cancer Res* **70**, 5728–5739.
- Müller, M., Prescott, E. L., Wasson, C. W. & Macdonald, A. (2015).** Human papillomavirus E5 oncoprotein: function and potential target for antiviral therapeutics. *Future Virol* **10**, 27–39.
- Münger, K., Phelps, W. C., Bubb, V., Howley, P. M. & Schlegel, R. (1989).** The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J Virol* **63**, 4417–4421.

*sekundární citace

- Näsman, A., Romanitan, M., Nordfors, C., Grün, N., Johansson, H., Hammarstedt, L., Marklund, L., Munck-Wikland, E., Dalianis, T. & Ramqvist, T. (2012).** Tumor infiltrating CD8 + and Foxp3 + Lymphocytes correlate to clinical outcome and human papillomavirus (HPV) status in Tonsillar cancer. *PLoS One* **7**, e38711.
- Nees, M., Geoghegan, J. M., Hyman, T., Frank, S., Miller, L. & Woodworth, C. D. (2001).** Papillomavirus type 16 oncogenes downregulate expression of interferon-responsive genes and upregulate proliferation-associated and NF-kappaB-responsive genes in cervical keratinocytes. *J Virol* **75**, 4283–4296.
- Numasaki, M., Fukushi, J., Ono, M., Narula, S. K., Zavodny, P. J., Kudo, T., Robbins, P. D., Tahara, H. & Lotze, M. T. (2003).** Interleukin-17 promotes angiogenesis and tumor growth. *Blood* **101**, 2620–2627.
- Oguejiofor, K., Hall, J., Slater, C., Betts, G., Hall, G., Slevin, N., Dovedi, S., Stern, P. L. & West, C. M. L. (2015).** Stromal infiltration of CD8 T cells is associated with improved clinical outcome in HPV-positive oropharyngeal squamous carcinoma. *Br J Cancer* **113**, 886–893.
- Oguejiofor, K., Galletta-Williams, H., Dovedi, S. J., Roberts, D. L., Stern, P. L. & West, C. M. L. (2017).** Distinct patterns of infiltrating CD8+ T cells in HPV+ and CD68 macrophages in HPV- oropharyngeal squamous cell carcinomas are associated with better clinical outcome but PD-L1 expression is not prognostic. *Oncotarget* **8**, 14416–14427.
- Olkhanud, P. B., Damdinsuren, B., Bodogai, M., Gress, R. E., Sen, R., Wejksza, K., Malchinkhuu, E., Wersto, R. P. & Biragyn, A. (2011).** Tumor-evoked regulatory B cells promote breast cancer metastasis by converting resting CD4 T cells to T regulatory cells. *Cancer Res* **71**, 3505–3515.
- Orth, G. (1986).** Epidermodysplasia verruciformis: a model for understanding the oncogenicity of human papillomaviruses. *Ciba Found Symp* **120**, 157–174.
- Orth, G., Favre, M. & Croissant, O. (1977).** Characterization of a new type of human papillomavirus that causes skin warts. *J Virol* **24**, 108–120.
- Ottenhof, S. R., Djajadiningrat, R. S., de Jong, J., Thygesen, H. H., Horenblas, S. & Jordanova, E. S. (2017).** Expression of Programmed Death Ligand 1 in Penile Cancer is of Prognostic Value and Associated with HPV Status. *J Urol* **197**, 690–697.
- Paba, P., Bonifacio, D., Di Bonito, L., Ombres, D., Favalli, C., Syrjänen, K. & Ciotti, M. (2008).** Co-expression of HSV2 and Chlamydia trachomatis in HPV-positive cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia lesions is associated with aberrations in key intracellular pathways. *Intervirology* **51**, 230–234.
- Pai, S. I. (2013).** Adaptive immune resistance in HPV-associated head and neck squamous cell carcinoma. *Oncoimmunology* **2**, e24065.
- Palucka, K. & Banchereau, J. (1999).** Dendritic cells: a link between innate and adaptive immunity. *J Clin Immunol* **19**, 12–25.
- Park, H., Li, Z., Yang, X. O., Chang, S. H., Nurieva, R., Wang, Y.-H., Wang, Y., Hood, L., Zhu, Z. & other authors. (2005).** A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* **6**, 1133–1141.

- Park, J. H., Richards, C. H., McMillan, D. C., Horgan, P. G. & Roxburgh, C. S. D. (2014).** The relationship between tumour stroma percentage, the tumour microenvironment and survival in patients with primary operable colorectal cancer. *Ann Oncol* **25**, 644–651.
- Park, J. H., van Wyk, H., Roxburgh, C. S. D., Horgan, P. G., Edwards, J. & McMillan, D. C. (2017).** Tumour invasiveness, the local and systemic environment and the basis of staging systems in colorectal cancer. *Br J Cancer* **116**, 1444–1450.
- Pett, M. R., Alazawi, W. O. F., Roberts, I., Downen, S., Smith, D. I., Stanley, M. A. & Coleman, N. (2004).** Acquisition of High-Level Chromosomal Instability Is Associated with Integration of Human Papillomavirus Type 16 in Cervical Keratinocytes Acquisition of High-Level Chromosomal Instability Is Associated with Integration of Human Papillomavirus Type 16 in. *Cancer Res* **64**, 1359–1368.
- Piersma, S. J., Jordanova, E. S., Van Poelgeest, M. I. E., Kwappenberg, K. M. C., Van Der Hulst, J. M., Drijfhout, J. W., Melief, C. J. M., Kenter, G. G., Fleuren, G. J. & other authors. (2007).** High number of intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes is associated with the absence of lymph node metastases in patients with large early-stage cervical cancer. *Cancer Res* **67**, 354–361.
- Pirisi, L., Yasumoto, S., Feller, M., Doniger, J. & DiPaolo, J. A. (1987).** Transformation of human fibroblasts and keratinocytes with human papillomavirus type 16 DNA. *J Virol* **61**, 1061–1066.
- Plimack, E. R., Bellmunt, J., Gupta, S., Berger, R., Chow, L. Q. M., Juco, J., Lunceford, J., Saraf, S., Perini, R. F. & O'Donnell, P. H. (2017).** Safety and activity of pembrolizumab in patients with locally advanced or metastatic urothelial cancer (KEYNOTE-012): a non-randomised, open-label, phase 1b study. *Lancet Oncol* **18**, 212–220.
- Plummer, M., Schiffman, M., Castle, P. E., Maucort-Boulch, D. & Wheeler, C. M. (2007).** A 2-year prospective study of human papillomavirus persistence among women with a cytological diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance or low-grade squamous intraepithelial lesion. *J Infect Dis* **195**, 1582–1589.
- Prall, F., Dührkop, T., Weirich, V., Ostwald, C., Lenz, P., Nizze, H. & Barten, M. (2004).** Prognostic role of CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes in stage III colorectal cancer with and without microsatellite instability. *Hum Pathol* **35**, 808–816.
- Prata, T. T. M., Bonin, C. M., Ferreira, A. M. T., Padovani, C. T. J., Fernandes, C. E. dos S., Machado, A. P. & Tozetti, I. A. (2015).** Local immunosuppression induced by high viral load of human papillomavirus: Characterization of cellular phenotypes producing interleukin-10 in cervical neoplastic lesions. *Immunology* **146**, 113–121.
- Presta, L. G., Chen, H., Connor, S. J., Chisholm, V., Meng, Y. G., Krummen, L., Winkler, M. & Ferrara, N. (1997).** Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders. *Cancer Res* **57**, 4593–4599.

- Del Prete, G. F., De Carli, M., Mastromauro, C., Biagiotti, R., Macchia, D., Falagiani, P., Ricci, M. & Romagnani, S. (1991).** Purified protein derivative of *Mycobacterium tuberculosis* and excretory-secretory antigen(s) of *Toxocara canis* expand in vitro human T cells with stable and opposite (type 1 T helper or type 2 T helper) profile of cytokine production. *J Clin Invest* **88**, 346–350.
- Punt, S., Fleuren, G. J., Kritikou, E., Lubberts, E., Trimpos, J. B., Jordanova, E. S. & Gorter, A. (2015).** Angels and demons: Th17 cells represent a beneficial response, while neutrophil IL-17 is associated with poor prognosis in squamous cervical cancer. *Oncoimmunology* **4**, e984539.
- Punt, S., Dronkers, E. A. C., Welters, M. J. P., Goedemans, R., Koljenović, S., Bloemena, E., Snijders, P. J. F., Gorter, A., van der Burg, S. H. & other authors. (2016).** 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* **65**, 393–403.
- Purdie, K. J., Suretheran, T., Sterling, J. C., Bell, L., McGregor, J. M., Proby, C. M., Harwood, C. A. & Breuer, J. (2005).** Human papillomavirus gene expression in cutaneous squamous cell carcinomas from immunosuppressed and immunocompetent individuals. *J Invest Dermatol* **125**, 98–107.
- Rodriguez, A. C., Schiffman, M., Herrero, R., Hildesheim, A., Bratti, C., Sherman, M. E., Solomon, D., Guillén, D., Alfaro, M. & other authors. (2010).** Longitudinal study of human papillomavirus persistence and cervical intraepithelial neoplasia grade 2/3: Critical role of duration of infection. *J Natl Cancer Inst* **102**, 315–324.
- Rosenberg, S. A., Spiess, P. & Lafreniere, R. (1986).** A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes. *Science* **233**, 1318–1321.
- Sarhanis, P., Blackett, A. D. & Sharp, F. (1996).** Intraepithelial neoplasia of the anogenital area: A multicentric condition. *Curr Obstet Gynaecol* **6**, 92–97.
- Sato, E., Olson, S. H., Ahn, J., Bundy, B., Nishikawa, H., Qian, F., Jungbluth, A. A., Frosina, D., Gnjjatic, S. & other authors. (2005).** Intraepithelial CD8(+) tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8(+)/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 18538–18543.
- Satterwhite, C. L., Torrone, E., Meites, E., Dunne, E. F., Mahajan, R., Ocfemia, M. C. B., Su, J., Xu, F. & Weinstock, H. (2013).** Sexually transmitted infections among US women and men: prevalence and incidence estimates, 2008. *Sex Transm Dis* **40**, 187–193.
- *Sautès-Fridman, C., Cherfils-Vicini, J., Damotte, D., Fisson, S., Fridman, W. H., Cremer, I. & Dieu-Nosjean, M. C. (2011).** Tumor microenvironment is multifaceted. *Cancer Metastasis Rev* **30**, 13–25.
- Seiwert, T. Y., Burtneess, B., Mehra, R., Weiss, J., Berger, R., Eder, J. P., Heath, K., McClanahan, T., Lunceford, J. & other authors. (2016).** Safety and clinical activity of pembrolizumab for treatment of recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-012): an open-label, multicentre, phase 1b trial. *Lancet Oncol* **17**, 956–965.

*sekundární citace

- van Seters, M., van Beurden, M., ten Kate, F. J. W., Beckmann, I., Ewing, P. C., Eijkemans, M. J. C., Kagie, M. J., Meijer, C. J. M., Aaronson, N. K. & other authors. (2008). Treatment of vulvar intraepithelial neoplasia with topical imiquimod. *N Engl J Med* **358**, 1465–1473.
- Sheu, B.-C., Lin, R.-H., Lien, H.-C., Ho, H.-N., Hsu, S.-M. & Huang, S.-C. (2001). Predominant Th2/Tc2 Polarity of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Human Cervical Cancer. *J Immunol* **167**, 2972–2978.
- Shresta, S., MacIvor, D. M., Heusel, J. W., Russell, J. H. & Ley, T. J. (1995). Natural killer and lymphokine-activated killer cells require granzyme B for the rapid induction of apoptosis in susceptible target cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 5679–5683.
- Scheffner, M., Werness, B. A., Huibregtse, J. M., Levine, A. J. & Howley, P. M. (1990). The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* **63**, 1129–1136.
- Schioppa, T., Moore, R., Thompson, R. G., Rosser, E. C., Kulbe, H., Nedospasov, S., Mauri, C., Coussens, L. M. & Balkwill, F. R. (2011). B regulatory cells and the tumor-promoting actions of TNF- α during squamous carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 10662–10667.
- Sica, A., Straus, L. & Allavena, P. (2014). Tumor-Associated Macrophages. In *Macrophages Biol Role Pathol Dis*, pp. 425–443. Edited by S. K. Biswas & A. Mantovani. Springer New York.
- Slade, H. B. (1998). Cytokine induction and modifying the immune response to human papilloma virus with imiquimod. *Eur J Dermatol* **8**, 12–13.
- Smith, J. S., Herrero, R., Bosetti, C., Muñoz, N., Bosch, F. X., Eluf-Neto, J., Castellsagué, X., Meijer, C. J., Van den Brule, A. J. & other authors. (2002). Herpes Simplex Virus-2 as a Human Papillomavirus Cofactor in the Etiology of Invasive Cervical Cancer. *J Natl Cancer Inst* **94**, 1604–1613.
- Someya, M., Sakata, K., Matsumoto, Y., Yamamoto, H., Monobe, M., Ikeda, H., Ando, K., Hosoi, Y., Suzuki, N. & Hareyama, M. (2006). The association of DNA-dependent protein kinase activity with chromosomal instability and risk of cancer. *Carcinogenesis* **27**, 117–122.
- Stamenkovic, I. (2000). Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *Semin Cancer Biol* **10**, 415–433.
- Steele, J. C., Mann, C. H., Rookes, S., Rollason, T., Murphy, D., Freeth, M. G., Gallimore, P. H. & Roberts, S. (2005). T-cell responses to human papillomavirus type 16 among women with different grades of cervical neoplasia. *Br J Cancer* **93**, 248–259.
- Sznurkowski, J. J., Zawrocki, A. & Biernat, W. (2014). Subtypes of cytotoxic lymphocytes and natural killer cells infiltrating cancer nests correlate with prognosis in patients with vulvar squamous cell carcinoma. *Cancer Immunol Immunother* **63**, 297–303.
- Sznurkowski, J. J., Zawrocki, A., Emerich, J. & Biernat, W. (2011). Prognostic significance of CD4+ and CD8+ T cell infiltration within cancer cell nests in vulvar squamous cell carcinoma. *Int J Gynecol Cancer* **21**, 717–721.
- Szostek, S., Zawilinska, B., Kopec, J. & Kosz-Vnenchak, M. (2009). Herpesviruses as possible cofactors in HPV-16-related oncogenesis. *Acta Biochim Pol* **56**, 337–342.

- Tainio, K., Jakobsson, M., Louvanto, K., Kalliala, I., Paavonen, J., Nieminen, P. & Riska, A. (2016).** Randomised trial on treatment of vaginal intraepithelial neoplasia—Imiquimod, laser vaporisation and expectant management. *Int J Cancer* **139**, 2353–2358.
- Tanaka, M., Kataoka, H., Yano, S., Sawada, T., Akashi, H., Inoue, M., Suzuki, S., Inagaki, Y., Hayashi, N. & other authors. (2016).** Immunogenic cell death due to a new photodynamic therapy (PDT) with glycoconjugated chlorin (G-chlorin). *Oncotarget* **7**, 47242–47251.
- Tang, A., Dadaglio, G., Oberkamp, M., Di Carlo, S., Peduto, L., Laubreton, D., Desrues, B., Sun, C. M., Montagutelli, X. & Leclerc, C. (2016).** B cells promote tumor progression in a mouse model of HPV-mediated cervical cancer. *Int J Cancer* **139**, 1358–1371.
- Taniguchi, M., Seino, K.-I. & Nakayama, T. (2003).** The NKT cell system: bridging innate and acquired immunity. *Nat Immunol* **4**, 1164–1165.
- Terlou, A., Van Seters, M., Ewing, P. C., Aaronson, N. K., Gundy, C. M., Heijmans-Antonissen, C., Quint, W. G. V, Blok, L. J., Van Beurden, M. & Helmerhorst, T. J. M. (2011).** Treatment of vulvar intraepithelial neoplasia with topical imiquimod: Seven years median follow-up of a randomized clinical trial. *Gynecol Oncol* **121**, 157–162.
- Tewari, K. S., Sill, M. W., Penson, R. T., Huang, H., Ramondetta, L. M., Landrum, L. M., Oaknin, A., Reid, T. J., Leitao, M. M. & other authors. (2017).** Bevacizumab for advanced cervical cancer: final overall survival and adverse event analysis of a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial (Gynecologic Oncology Group 240). *Lancet* **6736**, 1–10.
- Tewari, K. S., Sill, M. W., Long, H. J., Penson, R. T., Huang, H., Ramondetta, L. M., Landrum, L. M., Oaknin, A., Reid, T. J. & other authors. (2014).** Improved Survival with Bevacizumab in Advanced Cervical Cancer. *N Engl J Med* **370**, 734–743.
- Thomas, M. & Banks, L. (1998).** Inhibition of Bak-induced apoptosis by HPV-18 E6. *Oncogene* **17**, 2943–2954.
- Torelli, T., Catanzaro, M. A., Nicolai, N., Giannatempo, P., Necchi, A., Raggi, D., Paolini, B., Colecchia, M., Piva, L. & other authors. (2017).** Treatment of Carcinoma In Situ of the Glans Penis With Topical Imiquimod Followed by Carbon Dioxide Laser Excision. *Clin Genitourin Cancer* **15**, e483–e487.
- Tsujikawa, T., Yaguchi, T., Ohmura, G., Ohta, S., Kobayashi, A., Kawamura, N., Fujita, T., Nakano, H., Shimada, T. & other authors. (2013).** Autocrine and paracrine loops between cancer cells and macrophages promote lymph node metastasis via CCR4/CCL22 in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* **132**, 2755–2766.
- Vávrová, K., Bartůňková, J. & Horváth, R. (2015).** Adoptivní buněčná terapie pomocí lymfocytů T v léčbě nádorů. *Onkologie* **9**, 7–9.
- Villegas, F. R., Coca, S., Villarrubia, V. G., Jiménez, R., Chillón, M. J., Jareño, J., Zuñiga, M. & Callol, L. (2002).** Prognostic significance of tumor infiltrating natural killer cells subset CD57 in patients with squamous cell lung cancer. *Lung Cancer* **35**, 23–28.
- Vinokurova, S., Wentzensen, N., Kraus, I., Klaes, R., Driesch, C., Melsheimer, P., Kisseljov, F., Dürst, M., Schneider, A. & Doeberitz, M. V. K. (2008).** Type-dependent integration frequency of human papillomavirus genomes in cervical lesions. *Cancer Res* **68**, 307–313.

- Visser, J., Nijman, H. W., Hoogenboom, B. N., Jager, P., Van Baarle, D., Schuurin, E., Abdulahad, W., Miedema, F., Van Der Zee, A. G. & Daemen, T. (2007).** Frequencies and role of regulatory T cells in patients with (pre)malignant cervical neoplasia. *Clin Exp Immunol* **150**, 199–209.
- de Vos van Steenwijk, P. J., Heusinkveld, M., Ramwadhoebe, T. H., Löwik, M. J., van der Hulst, J. M., Goedemans, R., Piersma, S. J., Kenter, G. G. & van der Burg, S. H. (2010).** An unexpectedly large polyclonal repertoire of HPV-Specific T cells is poised for action in patients with cervical cancer. *Cancer Res* **70**, 2707–2717.
- Wagner, S., Wittekindt, C., Reuschenbach, M., Hennig, B., Thevarajah, M., Würdemann, N., Prigge, E. S., von Knebel Doeberitz, M., Dreyer, T. & other authors. (2016).** CD56-positive lymphocyte infiltration in relation to human papillomavirus association and prognostic significance in oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* **138**, 2263–2273.
- Warburg, O. (1956).** On the Origin of Cancer Cells. *Science (80-)* **123**, 309–314.
- Watanabe, Y., Katou, F., Ohtani, H., Nakayama, T., Yoshie, O. & Hashimoto, K. (2010).** Tumor-infiltrating lymphocytes, particularly the balance between CD8+ T cells and CCR4+ regulatory T cells, affect the survival of patients with oral squamous cell carcinoma. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology* **109**, 744–752.
- White, A. E., Livanos, E. M. & Tlsty, T. D. (1994).** Differential disruption of genomic integrity and cell cycle regulation in normal human fibroblasts by the HPV oncoproteins. *Genes Dev* **8**, 666–677.
- Wilk, M., Liszka, Ł., Paleń, P., Gabriel, A. & Ludański, P. (2010).** Intensity of angiogenesis and mast cell infiltration in cervical intraepithelial and invasive lesions - Are they correlated? *Pathol Res Pract* **206**, 217–222.
- Wolf, D., Wolf, A. M., Rumpold, H., Fiegl, H., Zeimet, A. G., Muller-Holzner, E., Deibl, M., Gastl, G., Gunsilius, E. & Marth, C. (2005).** The expression of the regulatory T cell-specific forkhead box transcription factor FoxP3 is associated with poor prognosis in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* **11**, 8326–8331.
- Woo, E. Y., Chu, C. S., Goletz, T. J., Woo, E. Y., Chu, C. S., Goletz, T. J., Schlienger, K., Yeh, H., Coukos, G. & other authors. (2001).** Regulatory CD4 + CD25 + T Cells in Tumors from Patients with Early-Stage Non-Small Cell Lung Cancer and Late-Stage Ovarian Cancer. *Cancer Res* **61**, 4766–4772.
- Zhang, L., Conejo-Garcia, J. R., Katsaros, D., Gimotty, P. A., Massobrio, M., Regnani, G., Makrigiannakis, A., Gray, H., Schlienger, K. & other authors. (2003).** Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med* **348**, 203–213.
- Zhang, Y., Li, J., Mo, H., Qiu, F., Zheng, L., Qian, C. & Zeng, Y. (2010).** Different subsets of tumor infiltrating lymphocytes correlate with NPC progression in different ways. *Mol Cancer* **9**, 4.