

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta



Studijní program: Fyziologie a patofyziologie člověka

Vliv nádorového mikroprostředí, buněčné a humorální imunity na patogenezi nádorových onemocnění

MUDr. Jan Špaček

Praha 2020

Školitel: doc. MUDr. Eva Zavadová CSc.

Prohlášení autora

Prohlašuji, že jsem disertační práci na téma „Vliv nádorového mikroprostředí, buněčné a humorální imunity na patogenezi nádorových onemocnění“ vypracoval samostatně za použití v práci uvedených pramenů a literatury pod vedením svého školitele. Dále prohlašuji, že tato disertační práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Datum podpis

Poděkování

Rád bych poděkoval doc. MUDr. Evě Zavadové, CSc., prof. MUDr. Luboši Petruželkovi, CSc., a doc. MUDr. Bohuslavu Konopáskovi, CSc., za cenné rady, věcné připomínky a vstřícnost při konzultacích ohledně mé disertační práce.

Identifikační záznam

MUDr. Jan Špaček. Vliv nádorového mikroprostředí, buněčné a humorální imunity na patogenezi nádorových onemocnění. (Influence of tumor microenvironment, cellular and humoral immunity on cancer pathogenesis). Praha, 2020. Počet stran: 102. Disertační práce (Ph.D.). Onkologická klinika 1. lékařská fakulta, Univerzita Karlova a Všeobecná fakultní nemocnice v Praze. Vedoucí závěrečné práce doc. MUDr. Zavadová, Eva, CSc.

ABSTRAKT

Onkologická onemocnění jsou druhou nejčastější příčinou úmrtí v České republice. Na předních příčkách příčiny úmrtí stojí karcinom prsu a kolorektální karcinom. Jednou ze základních oblastí současného klinického výzkumu v onkologii, který má za cíl optimalizovat rozhodování o dalším terapeutickém postupu u konkrétního nemocného, je studium prognostických biomarkerů. Imunitní reakce a procesy v nádorovém mikroprostředí podle posledních poznatků do značné míry ovlivňují biologickou povahu nádoru ve smyslu jeho agresivity a schopnosti metastazovat v organismu hostitele. Existují určité nádory, které mají schopnost indukovat silnou imunitní reakci a jiné naproti tomu nikoli. Ukazuje se, že schopnost navodit protinádorovou buněčnou reakci a atrahovat specifické subpopulace T lymfocytů přímo do nádorové tkáně je velmi úzce spojena s prognózou onkologických pacientů. Existují důkazy o vzájemném vztahu přítomnosti tumor infiltrujících lymfocytů v nádorové tkáni a délkou přežití onkologického pacienta, tedy mírou agresivity primárního tumoru. Stratifikace pacientů s onkologickým onemocněním na základě imunoprediktorů jak v séru, tak přímo v nádorovém mikroprostředí umožňuje identifikovat vhodné kandidáty pro moderní protinádorovou imunoterapii, která je již v současnosti standardní terapeutickou modalitou. Ve své disertační práci jsem se proto zaměřil na identifikaci biomarkerů, jež umožní rozdělit pacienty podle jejich schopnosti vytvořit kvalitativně i kvantitativně potenciálně úspěšnou protinádorovou imunitní odpověď. U pacientů s lokálně pokročilými kolorektálními karcinomy jsem participoval na analýze a vyhodnocení přítomnosti tumor infiltrujících lymfocytů (Immunoscore), které jsou důležitým prognostickým ukazatelem odhadu rizika relapsu onemocnění (PAGES, F. et al., 2018). U pacientek s hormonálně dependentním karcinomem prsu a pacientů s lokálně pokročilým kolorektálním karcinomem jsme pak hodnotili celkový stav imunitního systému a jednotlivých cytokinů, jež se podílejí na jeho regulaci. Cílem bylo identifikovat potenciální biomarkery, které korelují se schopností organismu vytvořit efektivní protinádorovou buněčnou odpověď, a tím i příznivý klinický vývoj onkologického onemocnění.

Klíčová slova: karcinom prsu, kolorektální karcinom, imunoterapie, prediktivní biomarkery, T lymfocyty, Immunoscore

ABSTRACT

Cancer is the second leading cause of death in the Czech Republic. Breast cancer and colorectal cancer have relatively high mortality rate. One of the areas of current clinical research in oncology is the study of prognostic biomarkers, which aims to optimize the decision-making process for a patient. Immune response and processes in the tumor microenvironment have been shown to influence to a large extent the biological nature of the tumor in terms of its aggressiveness and ability to metastasize in the host's body. There are certain tumors that could induce a strong immune response, while others do not. The ability to induce an anti-tumor cell response and to attract specific lymphocyte subpopulations directly into tumor tissue has been shown to be very closely related to the prognosis of cancer patients. There is evidence and correlation of the presence of so-called tumor infiltrating lymphocytes in tumor tissue and overall patient survival. Stratification of cancer patients based on immuno-predictors both in the plasma and directly in the tumor microenvironment makes it possible to identify suitable candidates for rediscovered modern anti-tumor immunotherapy, which can already be considered a standard therapeutic modality. In our projects, we focused on the identification of biomarkers that will allow patients to be stratified according to their ability to produce a qualitatively and quantitatively potentially successful anti-tumor immune response. In patients with locally advanced colorectal carcinomas, we participated in the analysis and evaluation of the presence of tumor infiltrating lymphocytes (Immunoscore), which is an important prognostic indicator of estimating the risk of disease relapse (PAGES, F. et. al., 2018). In patients with hormone-dependent breast cancer and patients with locally advanced colorectal cancer, we evaluated the overall state of the immune system and the individual cytokines involved in its regulation. The aim was to identify potential biomarkers that correlate with the ability of the patient to create a high-quality antitumor cell response and thus a favorable clinical development of cancer.

Keywords: breast cancer, colorectal cancer, immunotherapy, predictive biomarkers, T lymphocytes, Immunoscore

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK	5
1 ÚVOD	9
2 NÁDOROVÁ IMUNOLOGIE.....	11
2.1 Mechanismy protinádorové imunity.....	11
2.1.1 Vrozená imunita	11
2.1.2 Adaptivní imunita.....	13
2.2 Dendritické buňky	14
2.3 Imunitní systém onkologického pacienta	17
2.4 Prediktivní markery imunoterapie	21
2.4.1 Mutační nálož.....	21
2.4.2 MSI	23
2.4.3 Expres PD-L1.....	23
2.4.4 Tumor infiltrující lymfocyty (TILs)	24
2.5 Nádorové mikroprostředí	26
2.6 Stav imunitního systému onkologického pacienta před zahájením imunoterapie	30
3 EPIDEMIOLOGIE	32
3.1 Karcinom prsu	32
3.2 Kolorektální karcinom	33
4 KOLOREKTÁLNÍ KARCINOM	34
4.1 Rizikové faktory.....	34
4.2 Molekulární markery choroby.....	34
4.3 Základy terapie kolorektálního karcinomu	35
4.3.1 Léčba lokální.....	35
4.3.1.1 Chirurgická léčba	35
4.3.1.2 Radioterapie	36
4.3.2 Systémová farmakoterapie	36
4.3.2.1 Paliativní léčba metastazujícího onemocnění.....	37
4.3.2.2 Cílená léčba	38
4.3.2.3 Imunoterapie.....	41
5 KARCINOM PRSU	43
5.1 Histologická verifikace karcinomu prsu	44
5.2 Základy terapie karcinomu prsu.....	45
5.2.1 Léčba lokální.....	45

5.2.1.1	Chirurgická léčba	45
5.2.1.2	Radioterapie	45
5.2.2	Systémová farmakoterapie	45
5.2.2.1	Chemoterapie.....	45
5.2.2.2	Hormonální terapie	46
5.2.2.3	Cílená terapie	47
5.2.3	Imunoterapie.....	52
6	VÝCHODISKA A CÍLE PRÁCE	56
6.1	Hypotéza	57
6.2	Primární cíle	57
6.3	Budoucí cíle	57
7	METODIKA.....	58
7.1	Skupiny pacientů.....	58
7.2	Laboratorní metody	61
7.2.1	Vyšetření plazmy onkologických pacientů	61
7.2.2	Vyšetření nádorového mikroprostředí.....	63
7.3	Statistická analýza	65
8	VÝSLEDKY	66
8.1	Výsledky vyšetření pacientů s lokalizovaným kolorektálním karcinomem (soubor č. 1)..	66
8.2	Výsledky vyšetřování pacientek s karcinomem prsu (soubor č. 2)	69
8.3	Výsledky projektu Immunoscore (soubor č. 3)	71
9	DISKUZE	76
10	SHRNUTÍ.....	82
11	ZÁVĚR	84
12	SEZNAM PRACÍ STUDENTA	85
13	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	86
	SEZNAM GRAFŮ	101
	SEZNAM OBRÁZKŮ.....	101
	SEZNAM TABULEK.....	102

SEZNAM ZKRATEK

Zkratka	Význam
5-FU	5- flouorouracil
ACP	antigen prezentující buňka (<i>antigen presenting cell</i>)
ADCC	buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách (<i>antibody-dependent cellular cytotoxicity</i>)
ADP	adenosindifosfát
ATM	<i>ataxia teleangiectasia mutated</i>
AUC	plocha pod křivkou (<i>area under the curve</i>)
B7-1	B7-1 membránový protein
B7-2	B7-2 membránový protein
BCR	receptor B lymfocytu
BMDc	dendritické buňky z kostní dřeně
BRAF	lidský gen, který kóduje protein nazývaný B-Raf
BRCA	tumorsupresorový gen breast cancer
BRCA1	<i>gen breast cancer 1</i>
BRCA2	<i>gen breast cancer 2</i>
BSA	hovězí sérový albumin
C1q	složka komplementu C1q
CD3+	diferenciační skupina CD3+
CD4+	diferenciační skupina CD4+
CD8+	diferenciační skupina CD8+
CD14+	diferenciační skupina CD14+
CD19+	diferenciační skupina CD19+
CD20+	diferenciační skupina CD20+
CD25+	diferenciační skupina CD25+
CD68+	diferenciační skupina CD68+
CD80+	diferenciační skupina CD80+
CD86+	diferenciační skupina CD86+
CD137+	diferenciační skupina CD137+
CD152+	diferenciační skupina CD152+
CD273+	diferenciační skupina CD273+
CD274+	diferenciační skupina CD274+
CD279+	diferenciační skupina CD279+
CD45RO+	diferenciační skupina CD45RO+
CDH1	gen pro cadherin 1

Zkratka	Význam
CMF	cyklofosamid
CTAG1B	nádorový antigen varlete 1B (<i>cancer/testis antigen 1B</i>)
CTC	circulující nádorové buňky
CTLA-4	cytotoxický antigen T lymfocytu
DC	dendritické buňky (dendritic cells)
DCIS	duktální karcinom <i>in situ</i> (ductal carcinoma in situ)
DEC-205	povrchový receptor dendritických buněk 205
DNA	kyselina deoxyribonukleová (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
EGFR	receptor pro lidský epidermální růstový faktor ErbB-1 čili HER1 (<i>epidermal growth factor receptor</i>)
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
ER	estrogenový receptor
FAP	familiární adenomatózní polypóza
Fc	Fc oblast protilátek
FcR	receptor pro Fc fragment protilátek
FOLFIRI	chemoterapeutický režim (5 – Fluorouracil, Leukovorin, Irinotecan)
FOLFOX	chemoterapeutický režim (5 – Fluorouracil, Leukovorin, Oxaliplatin)
FoxP3+	protein (<i>forkhead box P3</i>)
FSH	folikulostimulační hormon
GM-CSF	granulocyty-makrofágy kolonie stimulující faktor
HER1	receptor pro lidský epidermální růstový faktor, též EGFR či ErbB-1 (<i>human epidermal growth factor receptor</i>)
HER2	receptor pro lidský epidermální růstový faktor 2 čili ErbB-2 (<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>)
HER2/neu	protoonkogen HER2/neu
hMLH1	reparační gen (MutL homolog 1)
hMSH2	reparační gen (MutL homolog 2)
hMSH6	reparační gen (MutL homolog 3)
hPMS2	reparační gen (PMS homolog 2)
CHEK2	gen pro checkpoint kinase 2
IgA	imunoglobulin A
IgD	imunoglobulin D
IgE	imunoglobulin E
IgG	imunoglobulin G
IgG1	imunoglobulin G1

Zkratka	Význam
IgG2	imunoglobulin G2
IgG3	imunoglobulin G3
IgG4	imunoglobulin G4
IgM	imunoglobulin M
IHC	imunohistochemie
IL-1	interleukin-1
IL-2	interleukin-2
IL-4	interleukin-4
IL-6	interleukin-6
IL-10	interleukin-10
IL-12	interleukin-12
IL-23	interleukin-23
Ki67	antigen Ki67
KRK	kolorektální karcinom
K-RAS	protein kódovaný genem <i>Kras</i> (<i>K rat sarcoma oncogene</i>)
LV	Leukovorin
MAC	<i>membrane attack complex</i>
MDSC	<i>myeloid-derived suppressive cells</i>
MHC	hlavní histokompatibilní komplex
MHC-I	hlavní histokompatibilní komplex-I
MIB1	antigen MIB1
mKRK	metastazující kolorektální karcinom
MMR	oprava chybného párování bazí (<i>mismatch repair</i>)
MSH2	reparační gen MSH2 (<i>MutS protein homolog 2</i>)
MSH6	reparační gen MSH6 (<i>MutS protein homolog 6</i>)
MSI	mikrosatelitová instabilita
MSI-H	mikrosatelitově vysoce nestabilní
MMS	mikrosatelitově stabilní
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
MUTYH	gen <i>MutY DNA Glycosylase</i>
NCCN	<i>National Comprehensive Cancer Network</i>
neo-Ag	neoantigen
NK	přírozený zabíječ (<i>natural killer</i>)
N-RAS	protein kódovaný genem <i>Nras</i> (<i>N rat sarcoma oncogene</i>)
ORR	celková četnost léčebných odpovědí (<i>overall response rate</i>)
OS	celkové přežití (<i>overall survival</i>)

Zkratka	Význam
OX40	molekula OX40 (známá také pod názvy CD134 nebo TNFRSF4)
p-hodnota	signifikance, číselná hodnota užívaná při statistickém testování hypotéz
PAMP	molekulární struktury na povrchu buňky (<i>pathogen-associated molecular patterns</i>)
PARP	poly (ADP-ribosa) polymeráza
PALB2	protein kódovaný genem <i>PALB2</i> (<i>Partner and Localiser of BRCA2</i>)
PCR	polymerázová řetězová reakce (<i>polymerase chain reaction</i>)
PD-1	receptor programované smrti 1 (<i>programmed cell death 1</i>)
PD-L1	ligand receptoru PD-1 (<i>programmed cell death ligand 1</i>)
PFS	přežití bez progresu
PI3K	fosfatidylinositol-3kináza
PMS2	reparační gen (<i>PMS1 Homolog 2</i>)
PR	progesteronový receptor
PS	celkový stav (<i>performance status</i>)
PTEN	protein kódovaný genem <i>PTEN</i> (<i>phosphatase and tensin homolog</i>)
RAS	protein kódovaný genem <i>Ras</i> (<i>rat sarcoma oncogene</i>)
TAM	<i>tumor-associated macrophages</i>
TAS-102	cytostatikum Trifluridine/Tipiracil
TGF-β	<i>transforming growth factor beta</i>
TH1	pomocné T lymfocyty 1
TH2	pomocné T lymfocyty 2
TILs	tumor infiltrující lymfocyty
TKI	tyrosinkinázové inhibitory
TLR6	<i>toll like receptor 6</i>
TMB	mutační nálož nádoru
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
TNM	klasifikace nádorů podle tumoru, uzlin a metastáz (tumor, nodi, metastasis)
TP53	protein kódovaný genem <i>TP53</i> (<i>tumor protein p53</i>)
Tregs	T regulační lymfocyty
VEGF	vaskulární endoteliální faktor
VEGF-1	vaskulární endoteliální faktor-1
VEGF-2	vaskulární endoteliální faktor-2

1 ÚVOD

Podání specifické onkologické léčby nevhodně zvolenému nemocnému může u pacientů s nízkou pravděpodobností léčebného efektu vést ke zbytečným nežádoucím účinkům, dále k promeškání času pro podání vhodnější léčby a v konečném důsledku pak k neefektivnímu využívání finančních zdrojů. Pro smysluplné a efektivní podání cílené terapie však u řady léků stále chybějí spolehlivé prediktory účinnosti. Jejich identifikace je proto předmětem intenzivního klinického výzkumu. Nepřehlédnutelnou skupinou nových léků z kategorie protinádorové imunoterapie jsou v současnosti protilátky proti inhibičním molekulám imunologické synapse (CTLA-4 a PD-1/PD-L1), které přinášejí novou naději i značně předléčeným pacientům napříč onkologickými diagnózami. S jejich nástupem nabývá na významu poznání fundamentálních vztahů mezi jednotlivými subpopulacemi buněk imunitního systému a cytokinových poměrů nádorového mikroprostředí i studium chování nádorových buněk a imunitního systému obecně. Protilátky vůči výše jmenovaným receptorům se již klinicky osvědčily v řadě onkologických diagnóz (zejména u maligního melanomu, nemalobuněčných karcinomů plic, karcinomu prsu atd.). Na rozdíl od těchto diagnóz jsou však klinické studie s těmito preparáty u pacientů s kolorektálním karcinomem zatím pouze ve fázích I až III. Vzhledem k velmi specifickému mechanismu protinádorového působení těchto protilátek cestou odblokování efektorových buněk imunitního systému je nutné počítat s tím, že odpověď na léčbu přichází s delším časovým odstupem od podání, než na jaký jsme zvyklí při konvenční terapii. Rovněž nežádoucí účinky jsou jiné než u běžné onkologické terapie a jsou způsobeny nadměrnou aktivitou imunitního systému (autoimunitní nežádoucí účinky). K nejčastěji postiženým orgánům patří kůže (vyrážka se svěděním nebo bez, eventuálně až puchýře) a gastrointestinální trakt (průjemy). Dalšími nežádoucími účinky mohou být postižení jater (což může vést až k jaternímu selhávání s ikterem) nebo zánětlivé postižení očí či žláz s vnitřní sekrecí (zánět hypofýzy, nadledvin a štítné žlázy). S rozvojem moderní imunoterapie bylo nutné upravit i kritéria pro hodnocení výsledků terapie, protože se ukazuje, že k odpovědi může dojít s delším odstupem po zahájení terapie ve srovnání se standardní cytostatickou léčbou, jak bylo popsáno již výše. Hlubší poznání imunitního systému přineslo v posledních letech řadu novinek jak v terapii maligních onemocnění, tak v predikci prognózy onkologických pacientů s kolorektálním karcinomem či karcinomem prsu. Hodnocení množství

a konkrétního typu tumor infiltrujících lymfocytů se zdá být vhodným doplněním standardní TNM klasifikace nádorových onemocnění, a to zejména při rozhodování o adjuvantní terapii. Multicentrický projekt Immunoscore, zkoumající infiltrace CD3+ a CD8+ T lymfocytů v centru a v invazivním okraji tumoru za pomoci počítačového softwaru, jehož byl náš tým spoluřešitelem, potvrdil klinický význam tohoto postupu. Imunologické vyšetření a monitorování imunitního stavu onkologických pacientů by proto měly být součástí standardní péče, zvláště při nasazení moderní imunoterapie.

2 NÁDOROVÁ IMUNOLOGIE

Vrozený a adaptivní imunitní systém fungují komplementárně tak, že chrání hostitele před cizími patogeny a jsou obecně tolerantní vůči antigenům těla vlastním. V prostředí vyvíjejícího se nádoru je imunitní systém vystaven frekventovaně stále novým antigenům (neoantigenům), což je způsobeno genetickými abnormalitami nádorové tkáně. Je zajímavé, že imunitní systém je schopen tyto stimuly registrovat a některé nádory na počátku jejich vývoje přímo eliminovat. Teorie imunoeditingu, jež vysvětluje proces imunitního dohledu, naznačuje, že některé nádorové buňky unikají z rovnovážného stavu, který byl dříve imunitním systémem udržován, a stávají se tak klinicky významnými. (DUNN, G. P. et al., 2004). Kliničtí onkologové a vědci v oblasti nádorové imunologie se snaží tyto mechanismy popsat precizněji a stanovit příčinu odlišností imunitních reakcí u konkrétních pacientů s konkrétním maligním onemocněním. Přestože jsou fakta o významu imunitního systému a jeho vlivu na průběh a vývoj nádorových onemocnění známa více než 120 let, teprve v důsledku poznání buněčných a molekulárních mechanismů imunitního systému se imunoterapie ve smyslu zapojení imunitního systému pacienta do eradikace maligních buněk dočkala poměrně recentně svého znovuzrození. V současnosti se imunoterapie – jakožto léčebná modalita spočívající mimo jiné v ovlivnění regulačních signálů udržujících imunologickou homeostázu – jeví jako velice perspektivní a nadějný směr terapie nádorových onemocnění. Kromě maligního melanomu je protinádorová imunoterapie prokazatelně efektivní též u nádorů ledvin, močového měchýře, plic, nádorů hlavy a krku a další výzkum v současnosti probíhá napříč téměř všemi onkologickými diagnózami.

2.1 Mechanismy protinádorové imunity

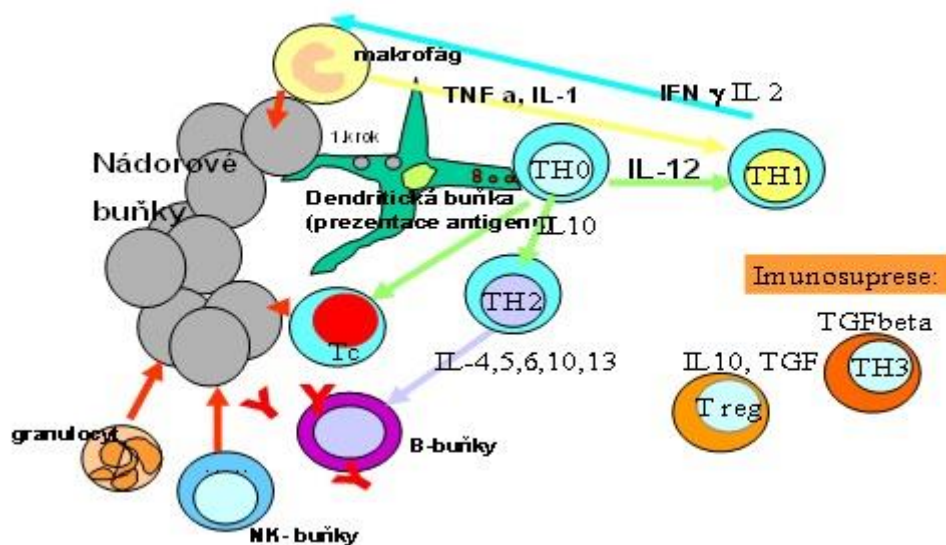
Imunoterapie představuje kompletně odlišný způsob léčby nádorových onemocnění. Necílí totiž na nádor samotný, ale na imunitní systém pacienta a snaží se ho podpořit tak, aby mohl nádorové buňky úspěšně eliminovat. Cílem moderní imunoterapie je posílit specifickou část buněčné imunity a zapojit ji tak do efektivnější destrukce buněk zhoubného nádorového onemocnění. Imunitní obrana organismu je zajišťována složitou spoluprací imunitních buněk vrozené i adaptivní imunity.

2.1.1 Vrozená imunita

Vrozený imunitní systém působí jako první linie obrany proti cizím patogenům, reaguje po krátkou dobu během několika minut až hodin, má řadu efektorových mechanismů a je fylogeneticky starší. Existuje celá řada různých mechanismů vrozené imunity včetně fyzických bariér (kožní epitel a mukózní membrány), efektorových buněk (makrofágy,

NK buňky, dendritické buňky, žírné buňky, neutrofilů a eosinofilů) a humorálních mechanismů (komplementové proteiny nebo cytokiny). Na rozdíl od konkrétnější, ale pomalejší adaptivní imunitní odpovědi, kterou představuje činnost B a T lymfocytů, je rychlejší vrozená imunitní odpověď obvykle charakterizována zánětem tkáně (s fyzikálními charakteristikami obvykle projevovanými teplem, bolestí, otokem a erytémem). Zánět tkáně jako součást vrozené imunitní odpovědi slouží k eliminaci invazivních cizích patogenů, k iniciaci opravy tkáně a může sloužit ke stimulaci adaptivní imunitní odpovědi prostřednictvím B a T lymfocytů. Existuje však značné množství důkazů, že jak akutní, tak chronický zánět mohou podporovat vznik genetických abnormalit a následně i rozvoj maligního onemocnění (SIEMENS, C. et al., 2006), (BALKWILL, F. et al., 2001).

V prostředí chronického zánětu může být diferenciací myeloidních buněk vychýlena směrem k expanzi supresorových buněk odvozených od buněk myeloidní řady (MDSC). Tyto buňky tvoří heterogenní populace imunitních buněk (včetně makrofágů, neutrofilů a dendritických buněk), které mohou mít silnou imunosupresivní aktivitu (GABRILOVICH, D. I. et al., 2012). Mezi těmito účinky mohou MDSC například inhibovat proliferaci a aktivaci T lymfocytů. V zánětlivém prostředí, jakým jsou i nádory, mohou tyto buňky inhibovat protinádorové imunitní odpovědi prostřednictvím potlačení T lymfocytů i NK buněk. (GABRILOVICH, D. I. et al., 2012). Obecněji se ukazuje, že MDSC mohou podporovat neoangiogenezi, remodelaci stromálních nádorů, a dokonce vznik metastáz. Je zajímavé, že mutace v nádorech, např. mutace BRAF, mohou tyto buňky pohánět k produkci prozánětlivých cytokinů, jako jsou IL-6, IL-10 a VEGF, které se podílejí na vývoji a regulaci MDSC (GABRILOVICH, D. I. et al., 2012), (SUMIMOTO, H. et al., 2006). Nalezení způsobů, jak snížit chronický zánět nebo konkrétněji prozkoumat cesty k omezení funkce MDSC, jsou tedy oblastmi intenzivního onkologického výzkumu. Vrozená imunita je zajišťována především makrofágy, granulocyty a tzv. NK (*natural killer*) buňkami. Tyto buňky disponují řadou enzymů a cytokinů, jako je např. faktor nekrotizující nádory (*TNF-tumor necrosis factor*), jakož i schopností produkovat kyslíkové radikály. Tyto cytokiny jsou za normálních okolností schopny nádorovou buňku usmrtit.



Obr 1: Mechanismy protinádorové imunity

„Nádorové buňky jsou eliminovány buňkami nespecifické i specifické imunity. Mezi buňky nespecifické imunity patří granulocyty, NK buňky a makrofágy, které nádorovou buňku zabijí buď přímo pomocí enzymů, kyslíkových radikálů či jiných působků (TNF) nebo v závislosti na označení nádorové buňky protilátkou (ADCC-antibody dependent cell-mediated cytotoxicity). Po odprezentování nádorového antigenu dendritickou buňkou jsou aktivovány buňky specifické imunity (T a B lymfocyty). Podskupina T buněk, tzv. T cytotoxické lymfocyty, jsou charakterizované antigenem CD 8+ a dokáží nádorovou buňku přímo eliminovat. Ostatní buňky specifické imunity mohou protinádorovou odpověď podpořit (např. produkcí cytokinů IL-1, TNF, IL-2, IL-12) nebo na druhou stranu protinádorovou odpověď utlumit. Tak je tomu např. u T regulačních buněk, které produkují mimo jiné i imunosupresivní transformační růstový faktor beta (TGF-β)“ (ZÁVADOVÁ, E. et al., 2014).

2.1.2 Adaptivní imunita

Adaptivní část imunitního systému reprezentují zejména T a B lymfocyty. Na rozdíl od vrozené imunitní odpovědi, která rozpoznává patogeny na základě nespecifických molekulárních vzorců, jako je jednovláknová RNA nebo lipopolysacharid, je adaptivní imunitní reakce zprostředkována díky velkému množství velice rozmanitých a vysoce specifických antigenních receptorů na T lymfocytech (TCR) a B lymfocytech (BCR). Diverzita a specifita těchto antigenově specifických receptorů je výsledkem genetické rekombinace, která náhodně kombinuje genové segmenty V, D a J (*Variable, Diversity a Joining*) a umožňuje generování milionů různých vysoce specifických receptorů. Účinná imunitní odpověď je zahájena, když B lymfocyt nebo T lymfocyt detekuje antigen v stimulačním kontextu a následně podléhá selektivní aktivaci a proliferaci. Tento proliferativní proces je označován jako klonální selekce a podporuje robustní imunitní reakce specifické pro antigen, jakož i vznik dlouhotrvajících paměťových buněk. Tento jev umožňuje rychlejší a rozsáhlejší imunitní reakci po opětovné expozici stejnému patogenu.

Vazebná část receptoru B lymfocytů (BCR) je buněčný povrchový imunoglobulin, který je schopen rozpoznávat rozpustný antigen na základě svého jedinečného místa vázacího antigen. Jakmile je na BCR navázán specifický rozpustný antigen, buňka podléhá růstu, dělení a další diferenciaci na plazmatickou buňku. To vede k proliferaci souboru plazmatických buněk ze stejného klonu, který kolektivně vylučuje velká množství vysoce specifických protilátek v procesu podobném klonální selekci T lymfocytů. Protilátky jsou glykoproteiny ve tvaru písmene Y obsahující variabilní (vázání antigenu) a konstantní oblast. Konstantní oblast specifikuje třídu protilátky (u lidí: IgA, IgD, IgE, IgG a IgM). Protilátky mají několik efektorových mechanismů včetně neutralizace antigenu, aglutinace mikrobů, srážení rozpuštěných antigenů, aktivace komplementové kaskády a buněčné cytotoxicity závislé na protilátkách (ADCC). Aby mohly správně T a B lymfocyty fungovat, musí jim být prezentován již výše zmíněný antigen.

2.2 Dendritické buňky

Mezi profesionální buňky prezentující antigen patří dendritické buňky (DC), makrofágy a B lymfocyty. Z těchto buněk jsou vzhledem ke svým morfologickým a fenotypovým vlastnostem nejúčinnějšími předkladací antigenů právě buňky dendritické. DC v kůži byly původně objeveny Paulem Langerhansem a později je Ralph Steinman kvůli četným dendritům, které slouží ke zvětšení povrchové plochy pro prezentaci antigenu a mezibuněčné interakci, označil jako dendritické buňky (IGYARTO, B. Z. et al., 2013). Tyto dendrity, jež jsou důležité pro svou funkci, umožňují vysoké koncentrace komplexů MHC-antigenů a kostimulačních molekul na povrchu buněk, které jsou následně potřebné pro robustní aktivaci T lymfocytů. Tímto způsobem DC slouží jako klíčové spojení mezi vrozenou a adaptivní částí imunitního systému. DC se mohou vyvinout z myeloidních nebo lymfoidních hematopoetických linií, což může vést k vzniku různých podmnožin DC s různými funkcemi. Dále mohou mít DC různé efektorové funkce v závislosti na jejich tkáňové distribuci a mikroprostředí, ve kterém se nacházejí. Langerhansovy buňky jsou podmnožinou DC, jež sídlí v epidermálních vrstvách kůže a fungují tak, aby nepřetržitě hlídaly a vyhledávaly patogeny (IGYARTO, B. Z. et al., 2013). Kožní DC neobsahující protein Langerin jsou podskupinou pobývajících v *dermis* a také hrají klíčovou roli při vytváření buněčné imunity. Intersticiální CD14+ DC jsou považovány za méně účinné při aktivaci naivních T lymfocytů a prokázaly tolerogenní funkce (CHU, C. C. et al., 2012). Plasmacytoidní DC jsou nejčastějšími DC v krvi a hrají klíčovou roli v sekreci interferonů při setkání organismu s virem (SIEGAL, F. P. et al., 1999). Důležité je, že CD8+ T lymfocyty s DC u myši a CD14+ DC u lidí hrají hlavní roli při zkřížené prezentaci antigenu a aktivaci protinádorové imunitní odpovědi (HASHIMOTO, D. et al., 2011), (BACHEM, A. et al., 2010). Za zmínku stojí, že DC odvozené z kostní dřeně (BMDC) nebo DC odvozené z periferní krve (PBDC) generované kultivací monocytů v IL-4 a GM-CSF se běžně používají pro výzkum a jako vakcíny v klinických studiích. Nedávno byly vyvinuty buněčné linie DC, které mohou

usnadnit další výzkum mechanismů funkce DC (FUERTES MARROCO, S. A. et al., 2012). Stále však existují významné fenotypové rozdíly mezi podskupinami myších a lidských DC, které by neměly být přehlíženy (COLLIN, M. et al., 2013).

V nepřítomnosti patogenů jsou DC obvykle v klidovém stavu. Avšak při expozici zánětlivými „nebezpečnými“ signály, molekulárními vzory spojenými s patogenem (PAMP), fagocytózou patogenů nebo pinocytózou prozánětlivých buněčných zbytků, podléhají DC procesu řízené aktivace a zrání, který je stěžejní pro jejich funkci. Aktivace DC zvyšuje jejich buněčnou povrchovou expresi MHC třídy I, MHC třídy II, CD80+, CD86+ a dalších pozitivních a negativních kostimulačních povrchových molekul. Kromě toho mohou DC vylučovat nesčetné množství cytokinů a chemokinů (včetně interferonů, TNF- α , IL-1, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 a IL-23), které mohou přispět k reaktivitě T lymfocytů (CURTSINGER, J. M. et al., 2003). Například signalizace prostřednictvím TLR4 obecně vede k produkci IL-12, jež může měnit T lymfocyty směrem k fenotypu TH1, zatímco signalizace pomocí TLR6 může vést k produkci IL-10, který může T lymfocyty měnit směrem k fenotypu TH2 T lymfocytů (VALENZUELA, J. et al., 2002), (MOORE, K. W. et al. 2001). Po aktivaci určité DC up-regulují specifické buněčné adhezni molekuly, jež migrují ze své tkáně pobytu zpět do lymfatických uzlin nebo lymfoidních folikulů, aby prezentovaly antigen tamějším T lymfocytům. Důležité je, že typ procesu zrání, kterým DC prochází, může mít zřetelný vliv na vyvolanou imunitní odpověď. Vytváření diverzity antigenového receptoru je stochastickou zárodečnou událostí, která zahrnuje somatickou rekombinaci genových segmentů a je nezbytná k řešení obrovského množství potenciálních patogenů. Musí však existovat mechanismy, jež zabrání těmto receptorům v identifikaci a v reakci s hostitelskými tkáněmi. Souhrnně je imunologické sebepojetí generováno procesy centrální a periferní tolerance. Obecně řečeno, centrální tolerance zahrnuje proces klonální delecce auto-reaktivních T lymfocytů v brzlíku, zatímco periferní tolerance zahrnuje mnoho mechanismů potlačování imunitních odpovědí v tkáních mimo brzlík a kostní dřeň. Například jedna forma tolerance je známá jako anergie a nastává, když receptor T lymfocytu rozpoznává svůj příbuzný antigen v nepřítomnosti vhodných kostimulačních molekul (tj. přenáší se pouze signál 1). Toto je často případ rozpoznávání nádorových buněk CD8+T lymfocyty, protože nádorové buňky na svém povrchu neexprimují vhodné kostimulační molekuly. Alternativně se u aktivovaných T lymfocytů, které dostávají opakovanou nadměrnou stimulaci, může vyvinout „vyčerpaný“ fenotyp, který se stane neschopným další aktivace nebo dělení, ačkoli je vystaven antigenu v stimulačních podmínkách. Antigen prezentující buňky mohou hrát v protinádorové buněčné imunitě roli v imunitní toleranci prezentací antigenů přímo v imunosupresivním nádorovém mikroprostředí, což vede k nedostatečné aktivaci T lymfocytů a potenciálnímu vyčerpání. Vyčerpané T lymfocyty nejsou obvykle schopné aktivace, a to ani v přítomnosti plně funkčních DC. Podobně jako diferenciaci a zrání T lymfocytů je aktivace T lymfocytů také jasně ovlivněna mikroprostředím během rozpoznávání antigenu a čistá suma signálů určuje imunitní odpověď. Potenciální strategie pro vyvolání trvalé protinádorové imunitní odpovědi se často zaměřují na modifikaci kostimulační a inhibiční dráhy. Ideální imunoterapie nádorových onemocnění by měla vyvolat vysoce specifickou a trvalou

imunitní odpověď, což jsou dvě vlastnosti jedinečné pro adaptivní imunitu. Další pochopení imunitní tolerance a řady kostimulačních a inhibičních signálních sítí, které regulují protinádorové imunitní odpovědi, bude rozhodující pro optimalizaci současných léčebných strategií a pro podporu objevů nových imunomodulačních činidel.

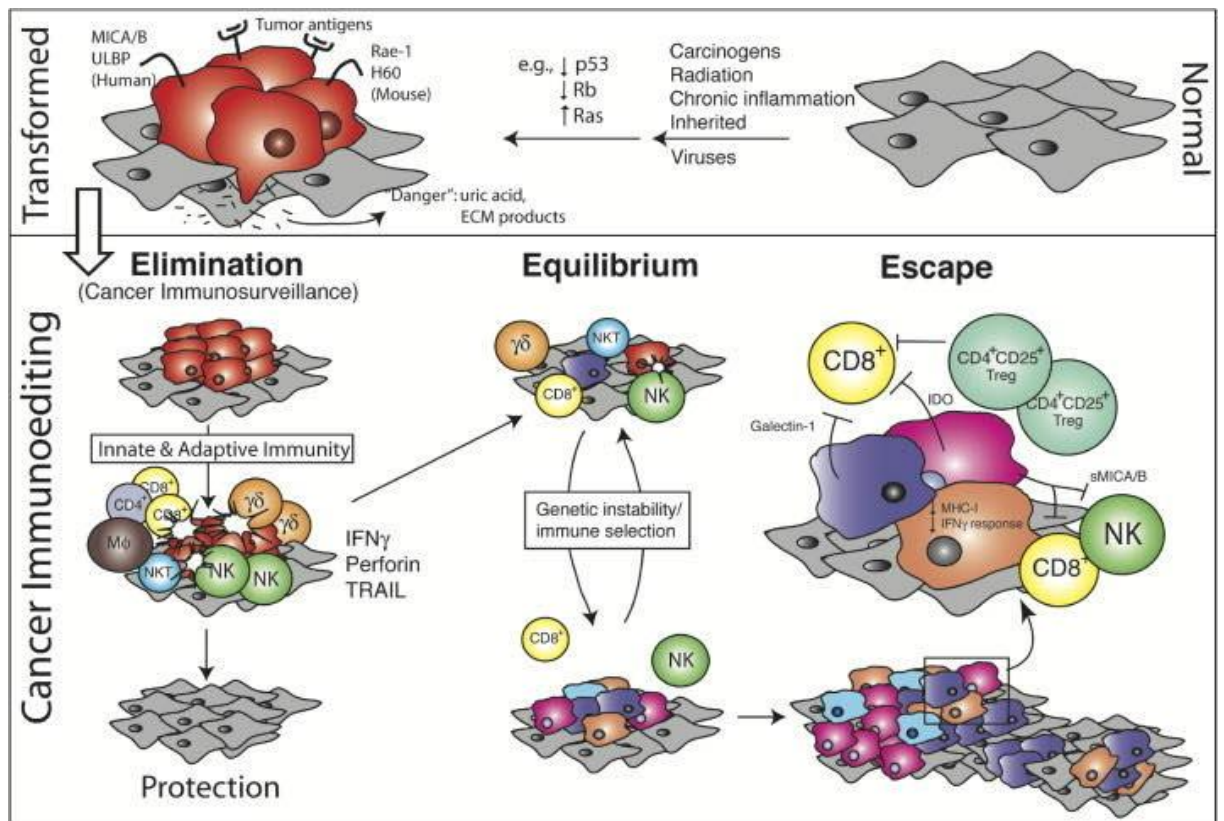
Imunoterapie je paradoxně jednou z nejstarších modalit onkologické terapie. Již koncem 19. století americký lékař William B. Coley díky svému klinickému pozorování zaregistroval „spontánní“ regresi solidních nádorů (měkkotkáňových sarkomů), a to u pacientů, kteří přežili septický šok. Sám tedy použil v léčbě inoperabilních pokročilých sarkomů jako alternativu k chirurgickému výkonu podání toxinů bakterie *Streptococcus pyogenes*. Coley byl také průkopníkem na poli adjuvantní terapie s aplikací toxinu následně po kompletní resekci nádoru s cílem zabránit vzniku recidivy onemocnění. (COLEY, W.B., 1910). Časem se pak ukázalo, že myšlenka a principy Coleyovy imunoterapie jsou správné a že léčba některých nádorů skutečně může být imunitním systémem pozitivně ovlivněna. Dále se imunoterapie v oblasti klinické onkologie postupně vyvíjela a pevně etablovala mezi terapeutickými modalitami nádorových onemocnění. Přes fázi skepticismu vyvolanou užitím řady imunomodulačních a zejména proinflamatorních cytokinů bez většího klinického efektu dospěla – především díky vývoji monoklonálních protilátek ovlivňujících molekuly imunologické synapse čili tzv. checkpoint inhibitorů – do fáze své renesance. Vzhledem k tomu, že dominantní strategií imunoterapie představuje modifikování kontrolních bodů imunitní reakce, je zřejmé, že klíčovou roli zde sehrává specifická imunitní odpověď T lymfocytů.

„T-buněčná protinádorová reakce je zahájena procesem, kdy nádorová buňka nebo jen její antigeny, které se z umírající buňky uvolňují, jsou v periferní krvi fagocytovány některou z profesionálních APC, zejména výše zmíněnou buňkou dendritickou. Ta pohlcené nádorové antigeny následně rozštěpí, zpracuje a vystaví na svém povrchu v komplexu s MHC molekulami I. a II. třídy. Z profesionálních antigen prezentujících buněk má tuto schopnost pouze dendritická buňka. Extracelulární antigeny se intracelulárně zpracovávají a vystavují na povrchu APC v komplexu s MHC molekulami II. třídy a jsou rozpoznávány pomocnými T lymfocyty (CD4+). Endogenně syntetizované antigeny jsou intracelulárně zpracovány a vystaveny na povrchu v komplexu s MHC molekulami I. třídy. Rozpoznávány jsou cytotoxickými T lymfocyty (CD8+), jež následně vykonávají exekutivní funkci. Jako patologické vyhodnotí ty buňky, které na svém povrchu exprimují MHC molekuly I. třídy v komplexu s nádorovými antigeny. K získání cytotoxické schopnosti se potřebují T naivní lymfocyty diferencovat do efektorových cytotoxických T lymfocytů, a to za pomoci cytokinů a kostimulátorů poskytovaných dendritickými buňkami a IL-2, který produkují současně aktivované TH lymfocyty.“ (ŘÍHOVÁ, B. et al., 2015) K aktivaci T lymfocytů však tento první signál není dostačující. Zapotřebí je i druhý, tzv. kostimulační signál, který reakci na první signál verifikuje. Kostimulačních dvojic, tj. povrchových receptorů na straně

imunokompetentních buněk a ligandů na straně antigen prezentujících buněk, je celá řada a buďto jsou exprimovány konstitutivně, nebo jsou inducibilní. Inhibiční receptory jsou následně vesměs inducibilní a patří k nim molekuly CTLA-4 (CD152+) s ligandem B7-1/B7-2 (CD80+/ CD86+) a PD-1 (CD279+) s ligandy PD-L1 (CD274+) a PD-L2 (CD273+). Oba receptory se vyskytují na povrchu T lymfocytů. PD-1 je exprimován také na B lymfocytech a myeloidních buňkách. Jakmile efektorové nádorově specifické T lymfocyty jednou vzniknou, rozpoznávají a zabíjejí nádorové buňky již bez pomoci kostimulátorů. Aktivované pomocné T lymfocyty zvyšují expresi kostimulačních molekul CD80+/CD86+ a indukují produkci IL-12 dendritickými buňkami. Tím přispívají k efektivnímu primingu a následnému vývoji a diferenciaci cytotoxických T lymfocytů do efektorových T lymfocytů. Na rozdíl od CD4+ „pomocných“ T buněk jsou CD8+ T buňky zodpovědné za přímou buněčnou cytotoxicitu po aktivaci APC a předpokládá se, že hrají ústřední roli v protinádorové imunitní odpovědi. Po aktivaci a uplatnění jejich cytotoxických účinků podléhá většina CD8+ T lymfocytů programované buněčné smrti jako kompenzačnímu mechanismu, aby se zabránilo nadměrné aktivaci imunitního systému a tím se omezilo možné kolaterální poškození. Menšina (5-10 %) aktivovaných terminálně diferencovaných CD8+ T buněk se však stane paměťovými buňkami s dlouhou životností. Tyto T buňky vykazují zesílené funkční odpovědi po opětovné expozici antigenu ve srovnání s naivními T lymfocyty. Z hlediska moderní imunoterapie nádorových onemocnění je prozatím nejdůležitější blokáce inhibičních signálů vedoucích přes receptory CTLA-4 a PD-1.

2.3 Imunitní systém onkologického pacienta

Hypotéza tzv. imunitního dozoru je formulována tvrzením, že nádorově transformované buňky jsou eliminovány imunitním systémem. Imunitní dohled nad nádorovým onemocněním (*cancer immunoediting*) je dynamický proces, který probíhá ve třech po sobě následujících fázích, a to fáze odstranění, rovnováhy a úniku. Z anglického názvu pro tyto fáze vznikl název „teorie 3E“ (*elimination, equilibrium, escape*) (DUNN, G.P. et al., 2004).

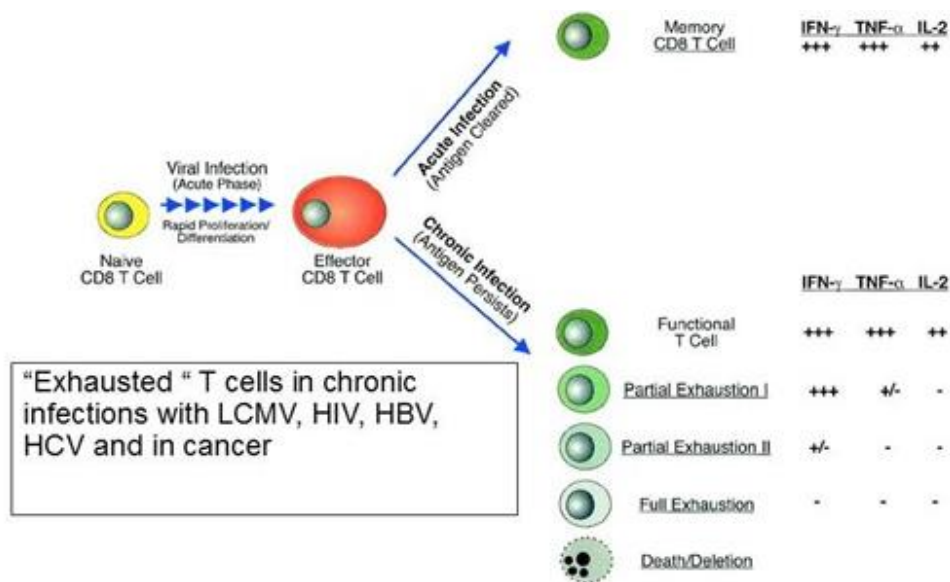


Obr 2: Tři fáze nádorového imunoeditačního procesu (teorie 3E)

Fyziologické buňky (šedé) vystavené kancerogenům procházejí transformací a stávají se nádorovými buňkami (červené; nahoře). I v časném stádiu kancerogeneze mohou tyto buňky exprimovat nádorově specifické markery a produkovat prozánětlivé signály, které zahájí imunoeditační proces (dole). V první fázi eliminace buňky a molekuly vrozené i adaptivní imunity, které se podílí na imunitním dozoru, mohou eradikovat vznikající nádor a ochránit tak organismus. Pokud není tento proces úspěšný, nádorové buňky vstoupí do druhé fáze – rovnováhy (equilibrium), kde mohou být utvářeny nové populace nádorových buněk. Tyto nové populace mohou případně uniknout imunitnímu systému pomocí různých mechanismů a stát se klinicky detekovatelné, a tím nastává poslední fáze vzniku nádoru, fáze úniku (escape). Převzato z (DUNN, GP. et al., 2004).

Eradikace sporadicky vzniklých nádorových buněk imunitním systémem však není dokonalá a s přibývajícím věkem pacienta pravděpodobně klesá. Imunitní obrana organismu je výsledkem spolupráce imunitních buněk nespecifické a specifické imunity. Nespecifická imunita je představována především makrofágy, granulocyty a tzv. NK buňkami, tedy přirozenými zabijáči. Tyto buňky disponují řadou enzymů a cytokinů – jako jsou např. perforiny, granzymy, faktor nekrotizující tumory (TNF) – jakož i schopností produkovat kyslíkové radikály. Tyto lytické enzymy jsou schopny za vhodných podmínek vytvořených příslušnými cytokiny nádorovou buňku usmrtit. Oproti konzervativní nespecifické imunitě reagující konzistentně, velmi rychle a bez paměti, je to, zdá se, efektivnější strategie. Specifická imunita je v porovnání s vrozenou fylogeneticky novějším a sofistikovanějším systémem. K vykonání svých biologických funkcí však potřebuje antigen prezentující buňky (většinou buňky dendritické), díky kterým je schopna eradikovat cílové

patogen a současně vytvořit příslušné selektivní paměťové protilátky. Pro alteraci složek specifického imunitního systému u onkologického pacienta hledáme několik vysvětlení. Jedná se bezesporu o kombinaci více vlivů, a to podmíněných jak nádorem samotným, tak nádorovým mikroprostředím, tedy cytokinovým laděním v bezprostředním okolí nádoru. Jedním z důvodů defektů specifické imunity na úrovni buněčné protinádorové imunity je chronická stimulace T lymfocytů nádorovými neoantigeny, které jsou nádorem kontinuálně uvolňovány do krevního řečiště pacienta. Míra vyčerpanosti imunitního systému je přímo úměrná délce trvání jeho stimulace a intenzitě T lymfocytární aktivity. Tento jev je prokazatelně měřitelný úbytkem proinflammatorních cytokinů v plazmě pacientů. U pacientů s chronickou stimulací imunitního systému můžeme v periferní krvi pozorovat snížené koncentrace proinflammatorních cytokinů jakožto projev protrahovaného působení efektorového aparátu buněčné imunity a selhání proteosyntetických funkcí Th1 mediované cytotoxické protinádorové imunity (WHERRY, E.J. et al., 2011), (ZAJAC, A.J. et al., 1998).



Obr 3: Vyčerpané a nefunkční T lymfocyty

Chronická stimulace imunitního systému infekcí či právě nádorovým onemocněním způsobuje vyčerpanost proteosyntetického aparátu T lymfocytů, které jsou následně dysfunkční (ZAJAC, A.J. et al., 1998).

Dalším negativním jevem v imunitním systému onkologického pacienta je jak nedostatečná funkce buněk nespecifické imunity, tak i defekty specifické imunity prakticky na všech úrovních (prezentace antigenu, součinnost jednotlivých subpopulací lymfocytů, nedostatečná funkce a někdy i snížené zastoupení CD8+ cytotoxických T lymfocytů, převaha vlivu imunosupresivních subpopulací lymfocytů T-regulačních buněk atd.) (ZÁVADOVÁ, E. et al., 2014). Důvodem je jistě i to, že nádorové buňky – ale nejen ony – produkují celou řadu cytokinů, které tlumí imunitní systém. U velké části nádorů se vyvíjejí mechanismy, jimiž nádorové buňky unikají imunitnímu systému hostitele a modulují imunitní systém

ve svůj prospěch. Mezi nejdůležitější únikové mechanismy patří snížená exprese molekul MHC I. třídy (MHC-I) na povrchu nádorových buněk a snížená produkce nádorových neoantigenů. Imunosupresivní a neoangiogenetické faktory jsou však produkovány nejen nádorovými buňkami, ale i buňkami imunitního systému. Imunitní systém onkologických pacientů tak nejen nepomáhá k potlačení nádorového růstu, ale dokonce ho podporuje. Nedostatečná imunitní odpověď velmi pravděpodobně koreluje se špatnou prognózou onkologických pacientů.

Tab 1: Faktory podílející se na malfunkci imunitního systému u onkologických pacientů

1.	chronická stimulace imunitních buněk nádorem (neo-Ag) – následné vyčerpání CD8+ T lymfocytů
2.	makrofágy typu M2 produkující supresivní mediátory typu IL10 a prostaglandinu E, které snižují T buněčnou aktivaci a jejich efektorové funkce a rovněž podporují růst nádorů produkcí proangiogenních cytokinů, jako jsou TGF-β a VEGF
3.	nádorovými buňkami produkováné imunosupresivní cytokiny typu TGF-β, které inhibují proliferaci a efektorové funkce lymfocytů a makrofágů
4.	rezistence nádorových buněk k apoptotickým stimulům
5.	přítomnost T regulačních buněk v nádorovém mikroprostředí
6.	zvýšená exprese inhibičních receptorů na povrchu T lymfocytu

Na akcentaci snížené buněčné protinádorové imunitní odpovědi onkologických pacientů se významně podílí zvýšená exprese inhibičních receptorů na imunologické synapsi, mezi jinými i molekul CTLA-4 a PD-1. Monoklonální protilátky ovlivňující tyto dvě molekuly se již běžně používají v klinické praxi. Zrušení inhibičního signálu u CTLA-4 a vyřazení negativní regulace PD-1 či PD-L1 molekuly zajišťuje udržení T cytotoxických lymfocytů v aktivním, tj. efektivním stavu. Chronická stimulace imunitního systému (neléčené alergické onemocnění, autoimunitní onemocnění, chronický zánět) způsobuje po určité době jednak jeho vyčerpání, ale i neschopnost řádně rozpoznat, prezentovat a finálně eradikovat patologické antigeny. Předmětem výzkumného zájmu posledních let je mapování imunitní odpovědi a imunitního systému u nemocných s nádorovou chorobou jak z prediktivního, tak prognostického hlediska. Dnešní imunoterapie totiž nepomáhá každému a stále zůstává otázkou, proč z ní netěží více pacientů. Hledá se proto způsob, jak najít prediktivní biomarkery, které pomohou učinit imunoterapii efektivnější. Zdá se, že hodnocení stavu

imunitního systému onkologického pacienta je pro efektivní imunoterapii velmi významné, neboť bez správné interakce mezi antigen prezentujícími buňkami a T-lymfocyty nelze očekávat dobré terapeutické výsledky. Záměrem klinického onkologa by ve světle recentních objevů mělo být zregenerovat (restaurovat) imunitní systém onkologického pacienta a zapojit jej tak do vlastní léčby nádorového onemocnění.

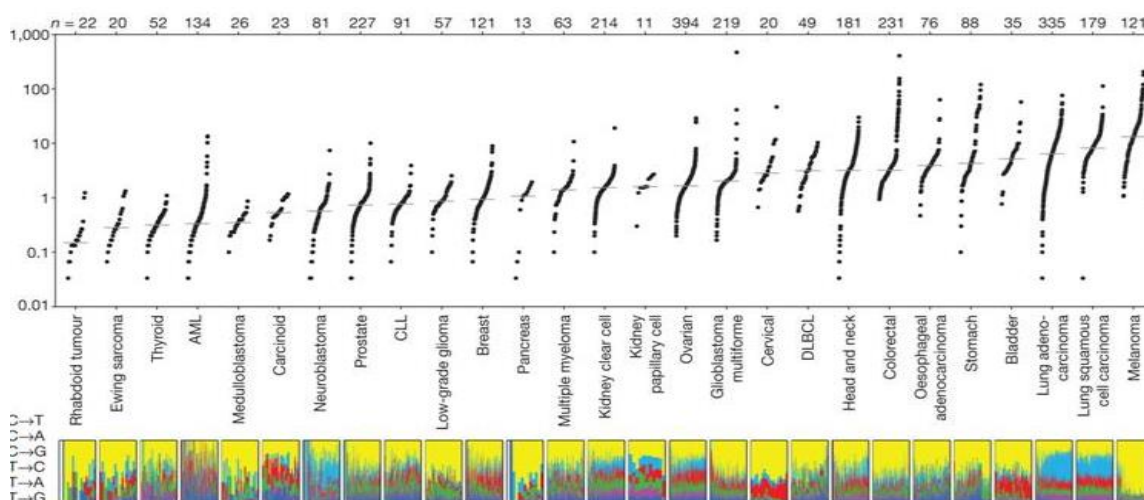
2.4 Prediktivní markery imunoterapie

Doposud existuje v běžné klinické praxi pouze jeden efektivní prediktor imunoterapie, a to imunohistochemicky měřitelný biomarker PD-L1. Jenže v klinické praxi užívaná míra exprese ligandu PD-L1 je sice vítaným, ale zjevně insuficientním parametrem. Jsou totiž známé případy léčebné odpovědi na imunoterapii i u PD-L1 negativních nádorů (PATEL, S.P. et al., 2015), (WOLCHOK, J.D. et al., 2013). V rámci precizace a vyšší spolehlivosti imunotypizace nádoru bude nutné přihlédnout k více parametrům, jednak k charakteristikám vlastního tumoru (velikost nádorové masy, mutační nálož, MSI status) i nádorového mikroprostředí (TILs, immunoscore, cytokinové poměry), ale také k vlastnímu stavu imunitního systému pacienta, včetně složení střevního mikrobiomu (ZITVOGEL, L. et al., 2018), (VETIZOU, M. et al., 2015), (GOPALAKRISHNAN, V. et al., 2017). Znalost těchto parametrů je logicky potřebná ke stanovení konkrétního imunitního profilu, který by pak měl sloužit k racionálnímu výběru imunoterapie jakožto ideální terapeutické modality. Postupným utvořením škály pravděpodobnosti léčebné odpovědi na imunoterapii bychom tak mohli vytvořit klasifikaci nádorů od imunosenzitivních až po imunorezistentní. Kromě zjevné snahy o identifikaci pacientů, kteří budou z imunoterapie profitovat, je tu i preventivní aspekt, kdy zabráníme zbytečné toxicitě u nevhodných kandidátů. Míra imunosenzitivity by měla mít v budoucnosti jistě význam i při rozhodování o zařazení imunoterapie do příslušné linie léčby. Dá se tedy předpokládat, že k již existujícím klasifikačním kritériím určujícím charakter nádoru přibude brzy další, které můžeme nazvat nádorovým imunofenotypem.

2.4.1 Mutační nálož

Somatické mutace vedou k produkci atypických proteinů, které představují vysoce imunogenní antigeny. Například pro maligní melanom je typická vysoká míra poškození DNA. Nádor uložený v kůži je obklopen antigen prezentujícími dendritickými buňkami, a za vhodných podmínek by tak mělo docházet k aktivaci cytotoxických T lymfocytů a následné likvidaci tumoru. Obecně lze konstatovat, že moderní imunoterapie dobře funguje u nádorů s vysokým množstvím somatických mutací a vysoká mutační nálož je spojena s delším přežíváním těchto pacientů. Nejedná se však jen o maligní melanom, ale též o bronchogenní karcinom či metastatický kolorektální karcinom, kde mutační nálož

hraje velkou roli. Pravděpodobnost odpovědi na léčbu PD-1, respektive PD-L1 inhibitory je například nižší u nekuřáků v porovnání s kuřáky nebo exkuřáky. To pravděpodobně souvisí s vlivem, který má kouření na četnost mutací detekovatelných v nádorové tkáni, a tedy i na imunogenicitu nádoru. Obecně platí, že imunoterapie dosahuje o něco lepších výsledků u kuřáků, jelikož mají větší mutační nálož a díky tomu jejich nádor prezentuje více antigenů.



Obr 4: Mutační nálož u solidních tumorů

Větší frekvence a různorodost mutací jednotlivých malignit vytváří více možností k zacílení imunoterapie checkpoint inhibitory. Alterovaná proteosyntéza totiž vytváří nové epitopy obsahující mutované sekvence a předkládá je k detekci imunitnímu systému, pro který slouží jako vhodný cíl při následné imunoterapii (LAWRENCE, M.S. et al., 2013).

Studie od Van Allena u pacientů s metastatickým melanomem jasně ukázala korelaci léčebné odpovědi na ipilimumab (anti-CTLA 4 monoklonální protilátka) s mutační náloží ($p = 0,0076$). Pacienti s vyšší mutační, či jinak řečeno neoantigenovou zátěží, měli s větší pravděpodobností klinický přínos z léčby ipilimumabem. Nicméně u 40 pacientů, u nichž byly analyzovány údaje z transkriptomu, nebyl nalezen žádný neoantigen, který by mohl být použit jako biomarker při výběru pacientů pro léčbu ipilimumabem (VAN ALLEN, E.M. et al., 2015). Studie nádorové tkáně ukázaly, že nádory s vysokou somatickou mutační frekvencí (nad 10 somatických mutací na megabázi kódující DNA), jako jsou melanomy, nejlépe odpovídají na terapii anti-PD-1 protilátkami (LAWRENCE, M.S. et al., 2013). Problematiku mutační nálože lze shrnout konstatováním, že somatické mutace genetické informace vytvářejí alterované proteiny v podobě neoantigenů, které mohou poskytovat četné cíle antigen prezentujícím buňkám, a tím zvýšit pravděpodobnost efektivity imunoterapie.

2.4.2 MSI

Geny zodpovědné za opravy replikačních chyb v DNA jsou označovány jako „mismatch repair“ geny (MMR geny). Tyto takzvané mutátorové geny tímto mechanismem udržují stabilitu buněčného genomu. Jsou odpovědné za reparaci poškození DNA. Mutace nebo inaktivace těchto genů vedou k hromadění a udržování mutací v buňce a nestabilitě genomu. Zvýšená frekvence a kumulace mutací v buňce je jednou z příčin maligní transformace. Produkty těchto genů se uplatňují v opravných mechanismech poškozené DNA. Mutátorové geny, na rozdíl od onkogenů a tumor supresorových genů, neposkytují buňce schopnost nekontrolované proliferace samy o sobě. Tedy mutace mutátorových genů vede ke zvýšené frekvenci (100-1000x) mutací onkogenů a tumor supresorových genů. Vodítkem k nalezení mutovaného genu je imunohistochemické vyšetření exprese MMR proteinů (hMLH1, hMSH2, hMSH6 a hPMS2) a analýza repetitivních sekvencí. Přítomnost mutovaných genů má za následek vznik nádorů charakteristických vysokým stupněm nestability v krátkých tandemových repeticích molekuly DNA (mikrosatelitech). Tyto tumory jsou proto označovány jako MSI-H (*microsatellite instability-high*). MSI nádory jsou spojeny s vysokým výskytem mutací (mutační náloží). Mutované geny kódují proteiny, které jsou rozpoznány imunitním systémem jako neoantigeny. U zhoubných nádorů s MSI je tedy vyšší pravděpodobnost, že budou mít v nádorovém mikroprostředí více cytotoxických T lymfocytů a vyšší míru PD-L1 exprese. U zhoubných nádorů s MSI je PD-L1 blokáda většinou vysoce účinná. Klinický efekt PD-L1 inhibitorů byl doložen i u pacientů s MSI-H metastazujícím kolorektálním karcinomem. Klinický efekt PD-L1 inhibitorů byl prokázán též u MSI-H nádorů jiného původu (ca žaludku, duodena, žlučových cest, dělohy a prostaty) (LE, D.T. et al., 2015). Existuje spojitost mezi PD-1 expresí, která působí supresi imunitní odpovědi, a mutační náloží. Vazba ligandu na PD-L1 receptor vede k úniku imunitní odpovědi.

2.4.3 Exprese PD-L1

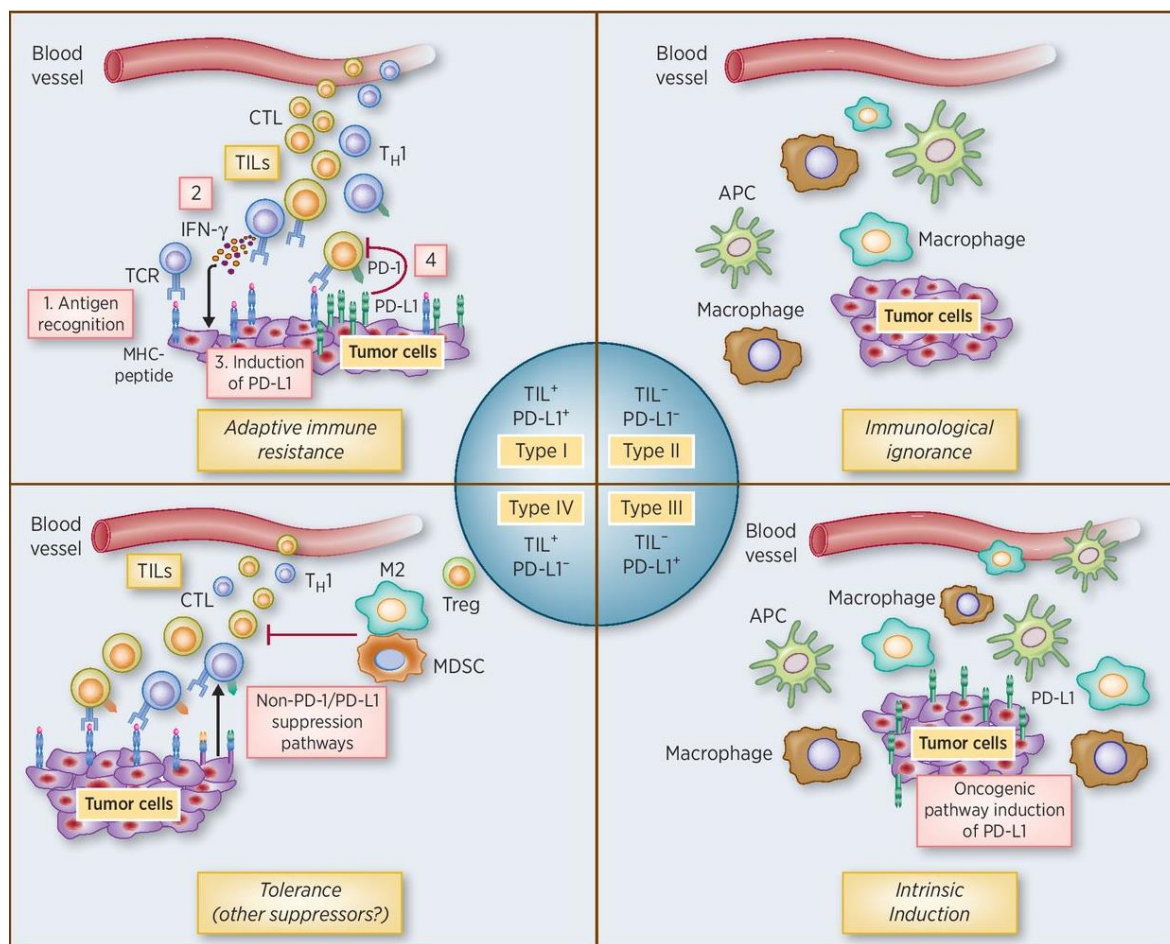
Míra exprese PD-L1 je sice nedokonalým markerem, ale zatím tím nejlepším. Je známo, že pacienti s lepší odpovědí na imunoterapii jsou ti, kteří exprimují vysoké koncentrace PD-L1 receptoru a mají vyšší infiltrace T lymfocytů v nádorové tkáni. Proto hodnocení exprese PD-L1 pomocí imunohistochemie (IHC) společně s měřením infiltrace nádoru imunitními buňkami mohou být dobrými prediktory odpovědi nádorů na anti-PD-L1 monoklonální protilátky. (SZNOL, M. et al., 2013) Renesance imunoterapie nádorových onemocnění vychází z lepšího porozumění nádorovému mikroprostředí. Osa PD-1 / PD-L1 je obzvláště zajímavá vzhledem k slibným údajům, které jsou demonstrovány obnovením hostitelské protinádorové buněčné imunity s perspektivou možné trvalé remise. Byly zaznamenány pozoruhodné klinické odpovědi u několika různých maligních nádorových

onemocnění, včetně melanomu, karcinomu plic, karcinomu ledvin a karcinomu močového měchýře. Přesto zjištění, u kterých pacientů je prospěšná imunoterapie zaměřená na PD-1 / PD-L1, zůstává důležitou klinickou otázkou, zejména s ohledem na autoimunitní toxicitu těchto látek. Použití imunohistochemického vyšetření PD-L1 (B7-H1) jakožto prediktivního biomarkeru je komplikováno několika nevyřešenými problémy, jako například variabilní detekční protilátky, odlišné limity pro imunohistochemická vyšetření, způsob přípravy tkáně, variabilita zpracování, primární versus metastatické biopsie a způsob barvení nádoru proti imunitním buňkám. Klinická data naznačují, že pacienti, jejichž nádory nadměrně exprimují PD-L1 pomocí IHC, mají lepší klinické výsledky s léčbou zaměřenou proti PD-1 receptoru, ale přítomnost robustních odpovědí u některých pacientů s nízkou úrovní exprese těchto markerů komplikuje přijetí PD-L1 jakožto exkluzivního prediktivního biomarkeru (PATEL, S.P. et al., 2015). Bylo pozorováno, že pacienti s PD-L1 negativními nádory mohou také reagovat na blokádu PD-1 a PD-L1 receptorů. (WOLCHOK, J.D. et al., 2013), (GROSSO, J. et al., 2013), (Hamid, O. et al., 2013). Další námitkou týkající se PD-L1 je měření exprese tohoto receptoru, jelikož jeho exprese je konstitutivní a jeho nadměrná exprese v odezvě na podněty se může lišit podle typu buňky. Kromě toho jsou nádory heterogenní a vzorek použitý pro test nemusí být reprezentativní pro celý nádor. Například různé úrovně exprese PD-L1 byly nalezeny v různých metastázách ve srovnání s primárním tumorem u renálního karcinomu světlobuněčného typu (CALLEA, M. et al., 2014). Lepší porozumění hostitelskému imunitnímu systému a nádorovému mikroprostředí nádorů by mohlo lépe objasnit, kteří pacienti by mohli profitovat z imunoterapie checkpoint inhibitory. Ze všech těchto důvodů je pro vyhodnocení exprese PD-L1 jakožto prediktivního faktoru pro blokádu PD-1 a / nebo PD-L1 potřebná standardizovaná definice PD-L1 positivity, díky níž by bylo možné sjednotit výsledky různých druhů testování.

2.4.4 Tumor infiltrující lymfocyty (TILs)

Recentně se hromadí silná data o významu nádorového mikroprostředí a přítomnosti tumor infiltrujících lymfocytů pro vývoj a biologické chování maligních onemocnění. Prognostický význam TILs je dlouhodobým tématem diskuse. Mnoho studií napříč celou řadou nádorových onemocnění ukázalo významnou souvislost mezi přítomností TILs a délkou přežití onkologických pacientů. Přítomnost lymfocytů v nádorové tkáni má stran prediktivních výsledků pozitivní data na největších souborech pacientů. Stanovení tzv. immunoscore, tedy kvantifikace určitých TILs je, jak již nyní víme, významným prognostickým faktorem u onkologických pacientů. Nicméně je důležité rozlišovat mezi různými typy T lymfocytů, protože v nádorovém mikroprostředí mají odlišnou biologickou funkci. Většina TILs má CD3+ fenotyp a dále je lze rozdělit na cytotoxické (CD8+) T lymfocyty, paměťové (CD45RO+) T lymfocyty a regulační (CD4+ CD25+) T lymfocyty, které mají imunosupresivní funkci. V případě kolorektálního karcinomu je v kvantifikaci tumor

infiltrujících lymfocytů prozatím jediná validovaná metoda Immunoscore, jež byla prověřena na velkých souborech pacientů a potvrdila svůj význam jako důležitý prognostický nástroj. Immunoscore je založena na kvantifikaci CD8+ a CD3+ T lymfocytů v centrální části nádoru a v jeho invazivním okraji. Na základě přítomnosti či absence lymfocytárních infiltrací rozděluje metoda Immunoscore pacienty do 5 skupin (immunoscore 0 – pacienti s velmi nízkou, až immunoscore 4 – pacienti s velmi vysokou hustotou sledovaných buněk). Pacienti s vysokou hodnotou immunoscore přežívají výrazně delší dobu, mají také vyšší expresi PD-1 receptoru, PD-L1 molekuly a snížený sklon k metastazování oproti pacientům s nízkým immunoscore, a to nezávisle na mikrosatelitové stabilitě (MLECNÍK, B. et al., 2016). U pacientů s metastazujícím melanomem mají tyto buňky (TILs) prokazatelný protinádorový efekt, dokumentovaný jak v preklinických, tak i klinických studiích. TILs mohou být získány přímo z nádorové tkáně, expandovány *in vitro* a poté využity jako buněčná imunoterapie. Mechanismus účinku je biologický a spočívá ve zničení nádorových buněk tumor infiltrujícími lymfocyty mechanismy protinádorové buněčné imunity. Vyšetření přítomnosti tumor infiltrujících lymfocytů se provádí zejména u epitelálních karcinomů (kolorektální karcinom, karcinom prsu). Toto vyšetření se zřejmě ale bude týkat i dalších druhů nádorů, a navíc okolnosti nasvědčují tomu, že imunitní systém může posílit účinky mechanismů chemoterapie. Avšak zásadním posunem v terapii onkologických onemocnění v oblasti nádorové imunologie je modifikace interakce molekul imunologické synapse inhibitory imunitních „kontrolních bodů“ (*check-points*). Hlavní mechanismus moderní imunoterapie spočívá v inhibici přirozeného odeznění imunitní reakce v nádorovém mikroprostředí zprostředkované buňkami nádoru exprimujícími na svém povrchu PD-L1 a CTLA-4 protein.



Obr 5: Imunofenotyp

Nádorové mikroprostředí bylo rozděleno do 4 různých typů na základě přítomnosti TILs a exprese PD-L1. Jsou to typ I (adaptivní imunitní rezistence), typ II (imunologické ignorance), typ III (vnitřní indukce) a typ IV (tolerance). Tento navrhovaný model stratifikace nádorů je zjednodušený, ale umožňuje rozhodovat o léčebných možnostech, které jsou nejvhodnější pro cílení na čtyři různá nádorová mikroprostředí. (Zkratky: APC: buňka prezentující antigen, MDSC: myeloidní supresorová buňka, M2, M2: makrofág; PD-L1: ligand 1 receptoru programované buněčné smrti, TCR: T buněčný receptor, TH1: pomocný T lymfocyt, TIL: nádor infiltruující lymfocyty), (TENG, W.L. et al., 2015).

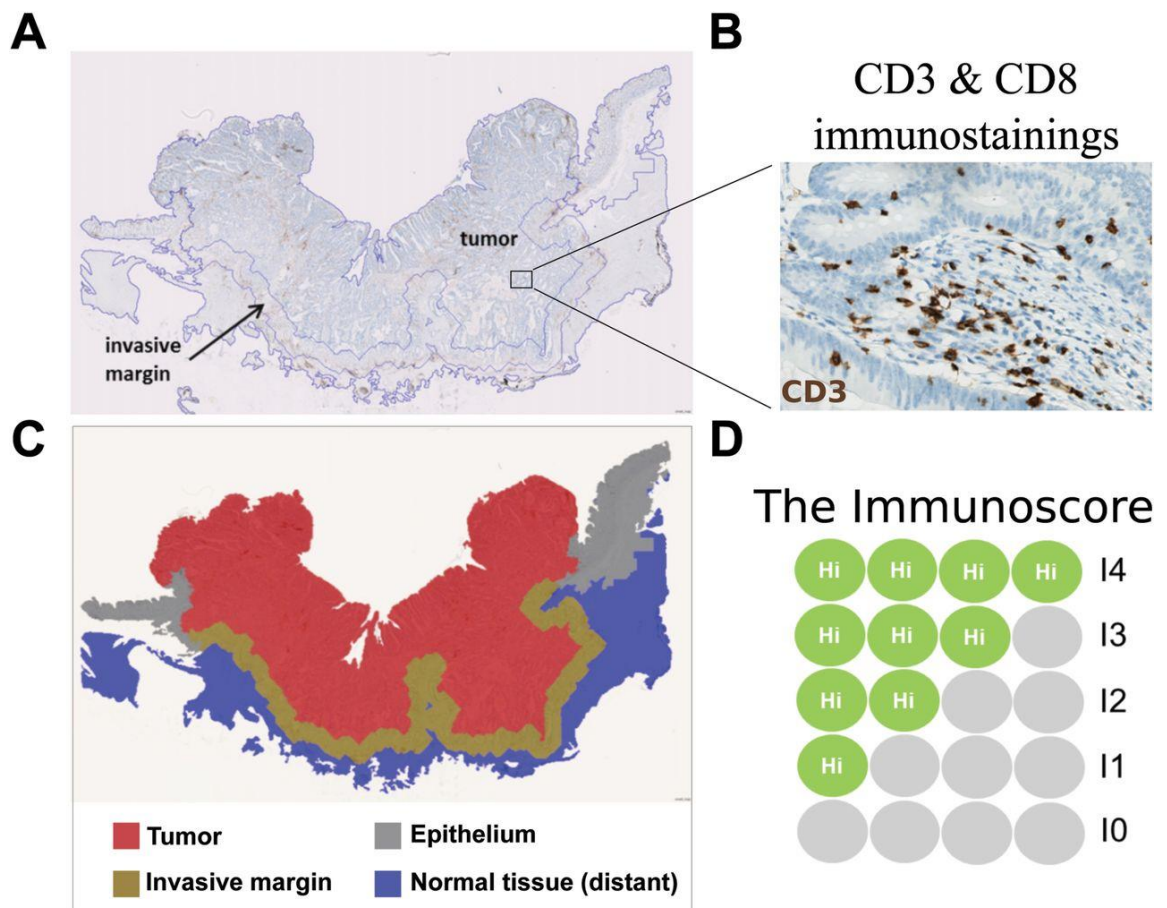
2.5 Nádorové mikroprostředí

Nádorové mikroprostředí se skládá z nádorového parenchymu (tedy vlastních nádorových buněk) a nádorového stromatu (fibroblasty, buňky imunitního systému, endoteliální buňky a cévy), které vytváří jakousi kostru nádoru a díky vaskularizaci zajišťuje výživu tumoru. Nádorové stroma hraje klíčovou úlohu při nádorové angiogenezi a metastazování primárního tumoru. Zcela jistě pozitivním faktorem z hlediska prognózy pacienta a možné léčebné odpovědi na imunoterapii je přítomnost určitých subpopulací takzvaných tumor infiltruujících lymfocytů (TILs) v nádorové tkáni. Prognostický význam a přirozená funkce jednotlivých subpopulací TILs je dlouhodobým tématem odborné diskuse. Mnoho studií napříč celou řadou maligních nádorů ukázalo významnou souvislost

mezi přítomností TILs a přežitím onkologických pacientů (GALON, J. et al., 2006), (LEFFERS, N. et al., 2009), (SATO, E. et al., 2005). V nádorovém mikroprostředí se vyskytují imunitní buňky mající široké spektrum funkcí. Většina TILs má CD3+ fenotyp a dále je lze rozdělit na cytotoxické (CD8+) T buňky, paměťové (CD45RO+) T buňky a regulační (CD4+ CD25+) T lymfocyty (SHEN, Z. et al., 2010), (DE LEEUW, R.J. et al., 2012). Vysoké koncentrace cytotoxických T lymfocytů v nádorové tkáni byly pozorovány u pacientů s lepším terapeutickým výsledkem a delším přežitím, proto se předpokládá, že cytotoxické (CD8+) T lymfocyty mají rozhodující úlohu v protinádorové imunitě (KAWAI, O. et al., 2008), (CHIBA, T. et al., 2004). Existující důkazy naznačují, že regulační T lymfocyty (Tregs) mají naopak schopnost potlačovat protinádorovou imunitu pacientů v mikroprostředí právě prostřednictvím inhibice fyziologických funkcí cytotoxických T lymfocytů (DE LEEUW, R.J. et al., 2012), (YOON, H.H. et al., 2012), (PENG, L.S. et al., 2012). Transkripční faktor P3 (FoxP3) je klíčová intracelulární molekula pro vývoj a funkci Tregs (HORI, S. et al., 2003), která je zatím považována za nejpřesnější biomarker pro stanovení Tregs v nádorovém mikroprostředí. Za fyziologických podmínek jsou FoxP3+ Tregs esenciálními supresory Th1 mediované imunitní buněčné odpovědi, a tak udržují imunologickou toleranci k hostitelským tkáním (SAKAGUCHI, S. et al., 2008). Vysoká infiltrace Tregs v nádorové tkáni by tedy logicky měla být spojena s nepříznivým výsledkem pro pacienta ve smyslu snížené imunitní kontroly hostitele nad nádorem. Tento vztah byl skutečně zaznamenán u široké škály lokalizovaných nebo metastatických karcinomů, včetně karcinomu prsu (BATES, G.J. et al., 2006), ovárií (CURIEL, T.J. et al., 2004), hepatocelulárních karcinomů (GAO Q. et al., 2007), bronchogenního karcinomu (PETERSEN, R.P. et al., 2006), karcinomu žaludku (PERRONE, G. et al., 2008) a karcinomu děložního čípku (SHAH, W. et al., 2011). Avšak některé studie uvádějí, že zvýšená frekvence výskytu Tregs byla u některých typů nádoru, jako je například kolorektální karcinom, spojena naopak s lepší prognózou těchto pacientů (BADOUAL, C. et al., 2006), (SALAMA, P. et al. 2009). Dosavadní výsledky jsou tedy konfliktní a prognostický přínos FoxP3+ Tregs zůstává nadále nejasný. Platí však, že z hlediska prognózy pacienta se zdají mít v nádorovém mikroprostředí největší přínos právě cytotoxické CD8+ T lymfocyty (KAWAI, O. et al., 2008), (CHIBA, T. et al., 2004). Zastoupení jednotlivých subpopulací lymfocytů v konkrétním nádorovém mikroprostředí může být určeno geneticky anebo nádorem přímo indukováno, a tím může být velmi dynamické.

Data nashádaná ze studií pacientů s kolorektálním karcinomem potvrdila, že klasifikace imunitního systému v nádorovém mikroprostředí (Immunoscore) má větší prognostický význam pro daného pacienta než TNM klasifikace. Detailní popis výsledků studie je uveden v kapitole výsledky, zde je však v rámci kapitoly nádorového mikroprostředí třeba zmínit některá základní data a souvislosti. TNM klasifikační systém slouží k jednoduchému popisu rozsahu nádoru a určení klinického stádia onkologického onemocnění v době diagnózy. Právě klinické stádium onemocnění je pak jedním z kritérií, podle kterých se lékař rozhoduje

při volbě léčby. TNM systém není univerzální, ale pro každou nádorovou lokalizaci je vypracována vlastní modifikace. TNM klasifikace nádorového onemocnění však nepredikuje odpověď pacienta na léčbu (délka přežití pacientů se stejným klinickým stadiem může být značně odlišná) a nijak nepopisuje biologické chování nádorových buněk (PAGES, F. et al., 2018). Metoda Immunoscore naproti tomu kvantifikuje a detekuje jednotlivé subtypy imunitních buněk a určuje též hustoty lymfocytárních infiltrátů a jejich lokalizaci v nádorové tkáni pacienta.



Obr 6: *Immunoscore*

A) řez nádorovou tkání karcinomu střeva s imunohistochemicky označenými CD3+ a CD8+ lymfocyty zobrazující invazivní okraj (IM) a centrální část tumoru (CT); B) bližší pohled (zvětšení 300x) na označené CD 3+ lymfocyty ve stromatu; C) barevně označené části CT - nádorová tkáň (červená) a IM - invazivní lem (hnědá) - připravené pro analýzu Immunoscore; D) Immunoscore založené na kvantifikaci CD3+ a CD8+ T lymfocytů umožňuje stratifikaci pacientů do skupin Immunoscore 0-4 (GALON, J. et al. 2016).

Immunoscore je založeno na detekci lymfocytární infiltrace, a to jak v centru, tak na okraji nádorové tkáně. Vysoké hustoty lymfocytárních infiltrátů (v centru i na okraji nádorové tkáně) jsou spojeny s delším přežitím pacientů bez nemoci, delším celkovým přežitím, nižším rizikem relapsu a nižším rizikem rozvoje metastatického postižení. Vzhledem k výsledkům analýzy vzorků tisíců pacientů s kolorektálním karcinomem se zdá

být vhodné doplnění TNM klasifikace kolorektálního karcinomu o immunoscore (PAGES, F. et al., 2018). Ačkoli kolorektální karcinom byl modelovou malignitou pro důkaz principu fungování metody immunoscore, význam fenotypu CD8+ byl prokázán také u jiných typů nádorů s vysokou hustotou cytotoxických a paměťových T lymfocytů spojených s delším celkovým přežitím (FRIDMAN, W.H. et al., 2012). Povaha TILs je mezi nádory heterogenní, proto je pro další validaci koncepce Immunoscore jakožto prognostického faktoru třeba charakterizovat TILs i u jiných typů nádoru, např. u maligního melanomu, renálního karcinomu, karcinomu prostaty, karcinomu vaječníků a karcinomu prsu. Studie zkoumající vztah mezi immunoscore a biologickým chováním maligních buněk v nádorovém mikroprostředí u jiných nádorů než kolorektálního karcinomu již proběhly. Například retrospektivní studie zahrnující 102 žen s histologicky potvrzenou diagnózou časného stadia invazivního karcinomu prsu ukázala, že zvýšený poměr CD68+ / (CD3+ CD20+) buněk v invazivním lemu karcinomu byl významně spojen s výskytem vzdáleného metastatického postižení (EIRÓ, N. et al., 2012). Přítomnost infiltrátů cytotoxických T lymfocytů zřetelně lokalizovaných v invazivním okraji nádoru u pacientů s maligním melanomem byla spojena s vyšší expresí inhibiční osy PD-1 / PD-L1. Bylo zjištěno, že se jedná o velmi dobrý prognostický parametr klinické odpovědi na imunoterapii blokující PD-1. Zatímco nejslabším prognostickým faktorem byla zvýšená přítomnost CD4+ T lymfocytů jak v nádorové tkáni, tak v invazivním lemu (TUMEH, P.C. et al., 2014). Charakter nádorového mikroprostředí lze popsat též pomocí RNA expresního profilu. Byla prokázána korelace mezi průměrnou expresí lytických enzymů (granzym A, perforin) s cytolytickou aktivitou lokálních imunitních infiltrátů a neoantigenovou zátěží (ROONEY, M.S. et al., 2015), (BROWN, S.D. et al., 2014). Mnoho genů indukovaných IFN gama a produkujících cytokiny asociované s Th1 buněčnou odpovědí vykazovalo vyšší expresi v mikroprostředí nádorů u pacientů s metastatickým melanomem, kteří měli prospěch z léčby ipilimumabem. Tento fakt naznačuje, že geny tohoto konkrétního typu T lymfocytů mohou sloužit jako časně prediktory léčebné odpovědi (JI, R.R. et al., 2012). Metoda Immunoscore poskytuje užitečné prognostické informace a má také potenciál pomáhat předpovídat léčebnou odpověď na imunoterapii, čímž pomáhá zlepšit terapeutický postup. Tento prognostický aspekt daný množstvím, typem a způsobem rozložení imunitních buněk nádorového mikroprostředí tvoří základ pro koncepci imunitního profilování, tedy precizní charakterizaci stavu imunitního systému jednotlivce a predikci odpovědi na terapii. K doplnění standardních klasifikačních kritérií nádoru se do klinické praxe v brzké budoucnosti velmi pravděpodobně připojí kombinace specifických biomarkerů z nádorového mikroprostředí a periferní krve, charakterizující individuální imunofenotyp daného nádorového onemocnění. Jednou z perspektivních metod stran predikce efektu imunoterapie bude tedy velmi pravděpodobně i přítomnost určitých subpopulací takzvaných tumor infiltrujících lymfocytů (TILs) v nádorové tkáni.

2.6 Stav imunitního systému onkologického pacienta před zahájením imunoterapie

Dalším faktorem potenciálně ovlivňujícím léčebnou odpověď imunoterapie může být vlastní stav imunitního systému onkologického pacienta. O důležitosti vstupního stavu imunitního systému před zahájením imunoterapie zatím nejsou dostatečně publikovaná data. Nicméně důkazy o imunitním dozoru nad nádorovým onemocněním jistě existují. Lze tedy předpokládat, že stav imunitního systému má vliv u takzvaných imunogenních nádorů dokonce i na samotnou kancerogenezi. Imunitní systém prostřednictvím NK buněk, T lymfocytů, makrofágů a dendritických buněk pomáhá předcházet malignímu onemocnění detekcí a eradikací mutovaných buněk, které by se staly nádorovými. Nádorovým buňkám se daří potlačit normální protinádorovou imunitní odpověď produkcí silných supresních mechanismů. Maligní buňky procházejí selekčním procesem, který preferuje buňky schopné se vyhnout imunitnímu systému získáním několika klíčových vlastností. Jsou to buňky, jež podporují metabolické pochody, neoangiogenezi a remodelaci nádorové matrix. Tyto buňky tak vytvářejí vysoce imunosupresivní nádorové mikroprostředí a tím i sníženou imunogenicitu nádoru (GOLDSZMID, R.S. et al., 2014).

Zvýšená incidence nádorových onemocnění u imunokompromitovaných pacientů užívajících chronicky kortikosteroidy po transplantaci ledviny (BIRKELAND, S.A. et al., 2000) nebo maligní melanom a další nádory čteněji se vyskytující v populaci pacientů užívajících chronicky metotrexát (BUCHBINDER, R. et al., 2008) ve srovnání se zdravou populací jsou důkazem o maligním potenciálu chronické imunosuprese. Jedním z klíčových typů buněk zapojených do imunitního dohledu nad nádorovým onemocněním jsou NK buňky, které mohou likvidovat nádorové buňky přímou cytotoxicitou. Nádorové buňky neexprimují žádné molekuly MHC-I třídy, což je činí zranitelnými vůči NK buňkám (ZAMAI, L. et al., 2007). Cytotoxické CD8+ T lymfocyty likvidují nádorové buňky rovněž přímým mechanismem a zároveň produkují cytokiny, jako je interferon gama (IFN- γ), které dále podporují cytotoxickou buněčnou odpověď (PARDOLL, D. 2002). Ukázalo se, že přítomnost paměťových T lymfocytů (CD3 + CD45RO +) Th1 buněk a cytotoxických CD8+ T lymfocytů předpovídá lepší klinické výsledky u pacientů s karcinomem jícnu, ledvin a mKrk (MÜZES, G. et al., 2012).

Nedostatečná imunitní odpověď tedy často koreluje se špatnou prognózou. Důvodem je jistě i to, že nádorové buňky produkují celou řadu faktorů, které suprimují imunitní systém, jak bylo popsáno výše. U velké části nádorů se vyvíjejí mechanismy, pomocí nichž nádorové buňky unikají imunitnímu systému hostitele a modulují imunitní systém ve svůj prospěch. Mezi nejdůležitější únikové mechanismy patří tvorba imunosupresivních faktorů, produkce neoangiogenetických faktorů (VEGF) a rezistence nádorových buněk k apoptotickým stimulům (LOGAN-COLLINS, J.M. et al., 2008). Faktorem přispívajícím k imunodeficitu může

být také *transforming growth* faktor beta (TGF- β), neoangiogenetický a silný imunosupresivní faktor potlačující buněčnou a protinádorovou imunitu (inhibicí antigen prezentujících buněk, NK buněk a stimulací T regulačních buněk). U pacientů s karcinomem prsu, kolorektálním karcinomem, glioblastomem, karcinomem žaludku a dalšími onkologickými onemocněními byla již naznačena korelace zvýšených koncentrací cytokinu TGF- β se špatnou prognózou. (LANGENSKIÖLD, M. et al., 2008), (SAITO, H. et al., 2000). Využití znalosti funkcí jednotlivých cytokinů se zdá být jednou z možností precizace profilování pacientů stran predikce efektu imunoterapie a odhadu biologického chování tumoru. Nepříliš pestrá, avšak účinná paleta nescifických imunomodulačních léků dostupných v České republice dává prostor k možnostem obnovení správné funkce imunitního systému ještě před zahájením vlastní moderní imunoterapie. Ipilimumab (anti-CTLA-4 monoklonální protilátka) byl prvním ze série imunomodulačních monoklonálních protilátek, u kterých bylo prokázáno prodloužení celkového přežívání u pacientů se solidním tumorem, konkrétně u pacientů s pokročilým maligním melanomem. V současné době v klinické praxi figurují již další imunomodulační monoklonální protilátky jako nivolumab, avelumab či pembrolizumab. Pro další imunoterapeutické preparáty, které ve vývoji zahrnují např. anti-CD137+ (urelumab), anti-OX40 a další, zatím mnoho dat nemáme. Vzhledem k léčebné odpovědi pouze u části pacientů je však nalezení spolehlivého biomarkeru efektu imunoterapie více než vhodné. Lze se domnívat, že klíčem k úspěchu bude kombinace hodnocení systémových a lokálních imunologických parametrů, které by mohly nabídnout užitečné prognostické a prediktivní informace a usnadnit klinické rozhodování. Úkolem bude identifikovat individuální imunoprofil každého pacienta, ale i jeho nádoru a následně zvolit optimální terapii. Teprve na základě výsledků imunologického vyšetření a výsledku genetické a počítačové analýzy nádorového mikroprostředí, stavu mikrosatelitů, mutační nálože, míry exprese PD-L1 a pravděpodobně i dalších receptorů imunologické synapse a histologické charakteristiky nádoru budeme moci racionálně zvolit imunoterapii v rámci precizované a personalizované onkologie jakožto potentní léčbu. Z předešlých kapitol je zřejmé, že imunitní systém onkologického pacienta je alterován na řadě funkčních úrovních. Lze tedy předpokládat, že pro efektivní imunoterapii je žádoucí restaurovat imunitní systém a zaléčit případné imunopatologie. Bylo by velmi vhodné vstupně vyloučit alergické stavy, klinické imunodeficiencie, a především vzhledem k možným nežádoucím účinkům zejména autoimunitní choroby. Tento ideální model by bylo vhodné dodržet před zahájením samotné imunoterapie prostřednictvím konzultací s pacientem v rámci specializované imuno-onkologické ambulance. Cílem podpůrné imunoterapie je znovu posílit sníženou protinádorovou imunitní odpověď u onkologických pacientů.

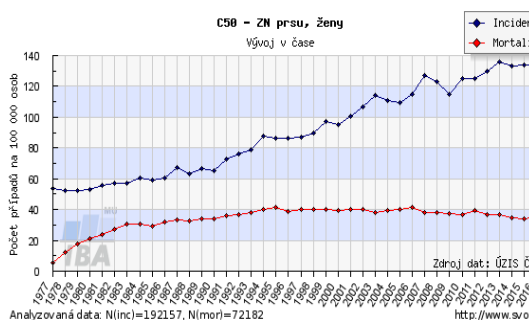
3 EPIDEMIOLOGIE

Nádorová onemocnění jsou v České republice druhou nejčastější příčinou úmrtí a zároveň druhou nejzávažnější příčinou nemocnosti ekonomicky aktivní části obyvatelstva. Ročně na maligní onemocnění zemře více než 27 tisíc osob, což představuje 23 % z celkové mortality populace České republiky.

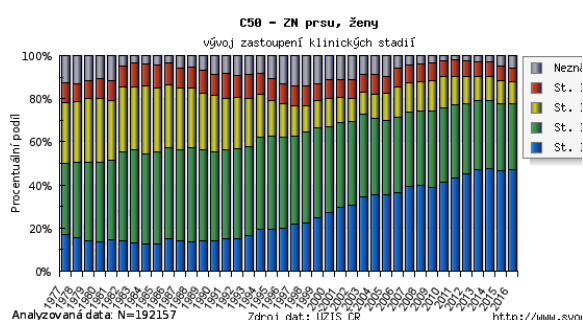
Každý rok onemocní v České republice více než 96 500 lidí nádorovým onemocněním (data za rok 2016) a zároveň více než 27 000 lidí zemře v souvislosti s malignitou. Zajímavým údajem je jistě i fakt, že v roce 2016 žilo v České republice téměř 562 329 osob, u kterých byla v průběhu jejich života diagnostikována nějaká forma onkologického onemocnění. Mezi nejfrekventovanější nádorová onemocnění patří u žen karcinom prsu (11,4 %) a u mužů karcinom prostaty (14,1 %), dále pak karcinom plic (10,0 %) a kolorektální karcinom (12,0 %) (www.SVOD.cz; data získaná 14. 6. 2019).

3.1 Karcinom prsu

Celosvětově bylo v roce 2018 diagnostikováno 2,09 milionu nových případů karcinomu prsu (což tvoří 11,6 % všech maligních onemocnění), zároveň bylo ve stejném roce zaznamenáno 630 tisíc úmrtí v souvislosti s touto diagnózou (BRAY, F. et al., 2018). V ČR bylo v roce 2016 diagnostikováno 7 220 nových případů (134,4 / 100 000 žen), tedy 11,4 % všech hlášených nádorových onemocnění. Incidence karcinomu prsu, podobně jako ve všech západních zemích, trvale roste (graf 1). Pozitivním trendem je zvyšující se podíl pacientek diagnostikovaných v časném klinickém stadiu. Klinická stadia I. a II. tvořila 62,0 % v roce 1996, zatímco v roce 2016 to bylo 77,6 % (graf 2). Pozitivní vývoj zastoupení časných klinických stadií je ovlivněn zavedením plošného mammografického screeningu v září 2002 (www.SVOD.cz; data získaná 14. 6. 2019).



Graf 1: Časový vývoj incidence (počet nových případů na 100 000 osob) a mortality (počet úmrtí v souvislosti s diagnózou na 100 000 osob) pro diagnózu karcinomu prsu u žen v České republice.



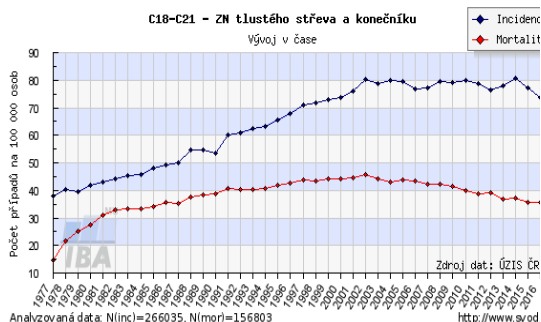
Graf 2: Časový vývoj zastoupení jednotlivých klinických stadií karcinomu prsu u žen v ČR.

www.svod.cz; data získaná 14.6.2019

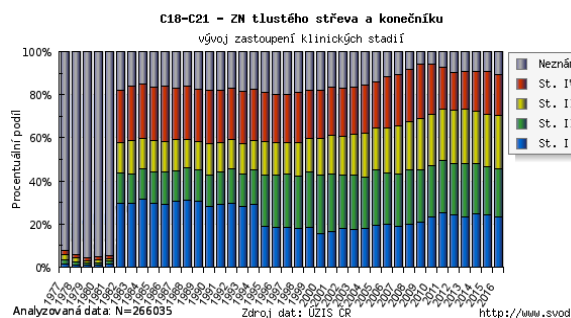
Mortalita na rozdíl od zvyšující se incidence však stagnuje (graf 1). V roce 2016 zemřelo v souvislosti s karcinomem prsu 1 907 pacientek (35,5 na 100 000 žen). Při dvojnásobném zvýšení incidence v posledních třiceti letech zůstala mortalita tohoto onemocnění prakticky stejná (www.SVOD.cz; data získaná 14. 6. 2019).

3.2 Kolorektální karcinom

Kolorektální karcinom je třetím nejfrekventovanějším maligním onemocněním. Celosvětově bylo v roce 2018 diagnostikováno 1,85 milionu nových pacientů (což tvoří 10,2 % všech maligních onemocnění). V témže roce bylo zaznamenáno 880 tisíc úmrtí v souvislosti s kolorektálním karcinomem (BRAY, F. et al., 2018). V České republice je KRK nejčastějším zhoubným nádorem trávicího ústrojí a druhou nejčastější orgánovou lokalizací nádorového bujení. V České republice bylo v roce 2016 diagnostikováno 7 610 nových pacientů (72,0 / 100 000), tedy 12,0 % všech hlášených nádorových onemocnění. V celosvětovém měřítku zaujímá v incidenci kolorektálního karcinomu Česká republika 5. příčku. Incidence, jež měla po řadu let vzrůstající tendenci, od roku 2002 stagnuje (graf 2A, graf zahrnuje i diagnózu C21 – ZN řitního kanálu, která představuje přibližně 200 nových případů ročně). Za posledních třicet let se počet pacientů více než zdvojnásobil, ale v posledních patnácti letech incidence onemocnění stagnuje. Na rozdíl od karcinomu prsu však nepozorujeme nijak dramatickou změnu v podílu časných stádií (stadium I. a II.), která v roce 1996 tvořila 59,3 % oproti 46,0 % v roce 2016 (www.SVOD.cz; data získaná 14. 6. 2019).



Graf 3: Časový vývoj incidence kolorektálního karcinomu (počet nových případů na 100 000 osob) a mortality (počet úmrtí v souvislosti s diagnózou na 100 000 osob) v České republice.



Graf 4: Časový vývoj zastoupení jednotlivých klinických stádií kolorektálního karcinomu v ČR.

www.svod.cz; data získaná 14.6.2019

Mortalita kolorektálního karcinomu podobně jako jeho incidence v České republice v posledních přibližně patnácti letech mírně klesá (graf 3). V roce 2016 zemřelo v souvislosti s tímto onemocněním 3 819 pacientů (34,8 / 100 000 obyvatel) (www.SVOD.cz; data získaná 14. 6. 2019).

4 KOLOREKTÁLNÍ KARCINOM

Kolorektální karcinom zahrnuje z topografického hlediska karcinom rekta, rektosigmoideálního přechodu a karcinomy tračníku. Základem léčby časných lokalizovaných stadií je chirurgický výkon a u karcinomů rekta je neopominutelnou léčebnou modalitou také radioterapie. Volbu systémové léčby metastazujícího onemocnění primární lokalizace nádoru prakticky neovlivňuje. Rozhodujícím faktorem pro léčebný výsledek je časný záchyt onemocnění. Nárůst záchytu časných stadií se dá očekávat při dalším rozvoji preventivních programů v této oblasti, kterým je v poslední době věnována mimořádná pozornost.

4.1 Rizikové faktory

Mezi rizikové faktory vzniku kolorektálního karcinomu patří ovlivnitelné vlivy jako například životní styl a s tím související stravování (obezita, alkohol). Z chorobných stavů pak *diabetes mellitus* a inzulínová rezistence, jelikož inzulín je důležitým růstovým faktorem pro střevní sliznici, a proto hyperinzulinemie zvyšuje riziko vzniku kolorektálního karcinomu. Neovlivnitelnými rizikovými faktory jsou předchozí výskyt adenomatózních polypů u daného pacienta, především velký adenomatózní polyp (> 1 cm) a polypy s vilózní či tubovilózní histologií. Počet příbuzných prvního stupně s kolorektálním karcinomem v rodinné anamnéze zvyšuje riziko dvakrát, další zvýšení rizika je v případě více příbuzných s kolorektálním karcinomem nebo při jeho výskytu před 50. rokem života. Chronická onemocnění střeva jako ulcerózní kolitida, Crohnova choroba a obecně chronický zánět střev také zvyšují riziko vzniku kolorektálního karcinomu, stejně jako některé dědičné dispozice. Jde především o tyto stavy:

- familiární adenomatózní polypóza (FAP) – mutace APC (gen adenomatózní polypózy střeva);
- polypóza v důsledku mutace MUTYH (mutY homolog se účastní reparace bodových mutací);
- Lynchův syndrom (hereditární nepolypózní kolorektální karcinom) – mutace v genech pro opravu správného párování bazí.

4.2 Molekulární markery choroby

Mikrosatelitová stabilita

Je vyšetření stanovené imunohistochemicky nebo molekulárně, které má význam zejména u pacientů v klinickém stadiu II., a to při rozhodování o podání adjuvantní chemoterapie. Vyšetřují se nejčastěji postižené geny *MSH2* (mutS homolog 2) a *MLH1* (mutL homolog 1).

Expres EGFR (receptor pro epidermální růstový faktor)

Je detekována imunohistochemicky. Předpokládá se její prognostický a prediktivní význam pro léčbu anti-EGFR protilátkami, což však nebylo prokázáno.

Analýza RAS (*rat sarcoma viral oncogene homolog*)

Prokazuje přítomnost mutace, která kontraindikuje podání anti-EGFR terapie (mutace v genu *KRAS* [Kirsten RAS] je přítomná u 35-40 % pacientů s mKRK).

Analýza BRAF (B-raf protoonkogen)

Pacienti s mutací v tomto genu mají horší prognózu a hůře odpovídají na terapii. Mutace je přítomná u 5-20 % mKRK (nejčastější mutací je V600E).

Analýza PI3K (fosfatidylinositol-4,5bisfosfát-3-kináza)

Tyto mutace jsou spojeny s nepříznivým průběhem onemocnění mKRK a mohou predikovat rezistenci vůči anti-EGFR terapií. Mutace v tomto genu je přítomná u 10-30 % mKRK.

Expres PTEN (fosfatázový a tenzinový homolog)

Je detekována imunohistochemicky. Je považována za prediktor odpovědi na anti-EGFR terapii. Jeho snížená exprese vede k aktivaci kaskády PI3K, což je pozorováno u 20-40 % mKRK.

4.3 Základy terapie kolorektálního karcinomu

4.3.1 Léčba lokální

4.3.1.1 Chirurgická léčba

Indikace k plánované chirurgické léčbě u nemocného s diagnostikovaným KRK je podložena lokalizací nádoru a jeho klinickým stagingem, který určuje nejen typ operace a jeho načasování v rámci komplexní terapie, ale je také jedním ze zásadních prognostických faktorů. Cílem operačního výkonu je dosáhnout tzv. radikálního odstranění nádoru (resekce R0) s prokázanými negativními resekčními okraji. V případě mikroskopického, resp. makroskopického průkazu přesahu nádoru přes resekční okraj (resekce R1, resp. R2) výkon nehodnotíme jako radikální. Typ operačního výkonu závisí na lokalizaci a lokální pokročilosti karcinomu. Nejmenším výkonem je radikální excize, která je indikována u časných nádorů (T1). Je operačním výkonem sporadickým, většinou je možné odstranit nádor endoskopicky (endoskopická polypektomie, endoskopická submukózní excize). Při T2–3, tj. stagingu I–III, při N0–1, je indikována segmentární resekce střeva (pravostranná či levostranná hemikolektomie, resekce transverza, sigmoidea) s odstraněním mezokolon v rozsahu spádové lymfatické drenáže. V případě karcinomu rekta je v závislosti od lokalizace a lokální pokročilosti indikována nízká přední resekce či

abdominoperineální exstirpace (operace podle Milese). Nízká přední resekce má modifikaci v podobě intersfinkterické resekce s provedením koloanální anastomózy (RYSKA, M. et al., 2013). V případě oligometastatického onemocnění (metastatické postižení jater či plic) lze u některých pacientů zvažovat metastazektomii.

4.3.1.2 Radioterapie

Radioterapie samotná nebo v kombinaci s chemoterapií je důležitou modalitou v radikální terapii karcinomů rekta. Závažným zjištěním je postižení regionálních lymfatických uzlin dle zobrazovacích vyšetření (MRI či endosonografie) nebo případy, kdy je vysoké riziko infiltrace uzlin (prorůstání tumoru do okolní tkáně > 5 mm). V rámci neoadjuvance se nejčastěji aplikuje celková dávka 50 Gy ve 25 frakcích v kombinaci s perorálním fluoropyrimidinem kapecitabinem a následným chirurgickým výkonem v odstupu 4-8 týdnů. Další možností je zkrácený protokol, kdy se celková dávka podává v 5 frakcích a ihned poté následuje chirurgická intervence. Přidání oxaliplatiny do konkomitantní chemoterapie nevede k lepším výsledkům léčby.

4.3.2 Systémová farmakoterapie

V posledních dvaceti letech byl v léčbě kolorektálního karcinomu zaznamenán významný pokrok. Medián přežití metastazujícího onemocnění, který činil koncem minulého století u neléčené choroby 3-6 měsíců, dosahuje v současnosti až 30 měsíců. Historickým standardem léčby metastazujícího kolorektálního karcinomu byla systémová chemoterapie 5-fluorouracilem (5-FU). Přidání leukovorinu (LV) k 5-FU zvyšuje počty objektivních léčebných odpovědí z 11 na 21 % a prodlužuje medián doby přežití na téměř 12 měsíců. Zavedení účinnějšího a lépe tolerovaného kontinuálního podání 5-FU a začlenění irinotekanu a oxaliplatiny do kombinovaných režimů tak představovalo počátek nové éry chemoterapie metastazujícího kolorektálního karcinomu. Po inovaci režimů chemoterapie dosahuje počet objektivních léčebných odpovědí (ORR) v první linii rozmezí 35–60 % i více a medián doby přežití ≥ 20 měsíců. V rámci adjuvantní farmakoterapie je v současnosti standardním režimem kombinovaný režim FOLFOX (leukovorin, 5-fluorouracil, oxaliplatina). Novější zařazení cílené biologické léčby k likvidaci reziduálního rozsevu se zdá být logické a racionální. Na rozdíl od trastuzumabu u karcinomu prsu, kde je u HER2-dependentních karcinomů cílená biologická léčba standardem, však u karcinomů konečníku a tračníku zatím není doklad o účinnosti cílené bioterapie (bevacizumab, cetuximab, panitumumab) v adjuvantním podání k dispozici. Podání adjuvantní chemoterapie je závislé na stadiu onemocnění. V I. klinickém stadiu onemocnění, tedy při postižení stěvné stěny bez postižení subserózy a regionálních lymfatických uzlin, se podání adjuvantní terapie nevyžaduje. U pacientů ve II. klinickém stadiu je indikace adjuvantní chemoterapie závislá na přítomnosti rizikových faktorů. Těmi jsou primární tumor

perforující serózu, nedostatečný počet odebraných lymfatických uzlin (<12), málo diferencovaný karcinom nebo perforace střeva, případně uzavření střevního lumen (operace v ileu bez předchozí přípravy). Dalším důležitým rozhodovacím parametrem je vyšetření mikrosatelitové instability. Přibližně u 15–20 % pacientů s kolorektálním karcinomem je identifikován vrozený (Lynchův syndrom) nebo získaný deficit v genech pro opravu správného párování bazí. Karcinomy s přítomnou mikrosatelitovou nestabilitou jsou častěji proximálně lokalizované, mucinózní a s velkým množstvím tumor infiltrujících lymfocytů. Tyto karcinomy mají lepší prognózu oproti karcinomům bez poškození mikrosatelitové stability a neprofitují z adjuvantního podání fluoropyrimidinů. V případě III. klinického stadia při postižení regionálních lymfatických uzlin je adjuvantní chemoterapie indikovaná vždy za předpokladu, že pacient podání této terapie snáší.

4.3.2.1 *Paliativní léčba metastazujícího onemocnění*

Výběr nejvhodnějšího přístupu k řešení metastatického postižení je otázkou pro multidisciplinární tým, jemuž by každý pacient měl být individuálně referován tak, aby jeho šance na vyléčení nebo prodloužení kvalitního života byla co nejvyšší. Součástí multidisciplinárního týmu by měli být klinický onkolog, radiační onkolog, chirurg se zkušenostmi s řešením metastatického postižení různých orgánů, radiolog, gastroenterolog, patolog, anesteziolog a eventuálně odborníci dalších specializací.

Volba terapeutického přístupu závisí na záměru léčby a odvíjí se tedy od celkového stavu pacienta a rozsahu jeho onemocnění. Nejedná se o striktně oddělené kategorie a pacient mezi nimi v průběhu terapie může přecházet v závislosti na úspěšnosti/neúspěšnosti léčby.

1. Potenciálně kurabilní záměr – cílem je vyléčení (dlouhodobá kontrola choroby)

Pacient je ve velmi dobrém výkonnostním stavu (PS 0-1) + oligometastatické postižení jednoho orgánu:

- primárně resekabilní: chirurgické řešení + postresekční chemoterapie
- primárně neresekabilní (potenciálně konvertibilní):

Zahajuje se indukční chemoterapie (dublet, triplet) v kombinaci s cílenou terapií se záměrem zmenšení tumoru (*downstaging*) a následného chirurgického řešení s podáním postresekční chemoterapie.

2. Radikální záměr – cílem je prodloužení doby přežití při zachování kvality života.

Pacient je v dobrém výkonnostním stavu (PS 0-1) + má rozsáhlé metastatické postižení jednoho orgánu nebo víceorgánové postižení. Volbou je chemoterapie (dublet, triplet) + cílená terapie.

3. Paliativní záměr – cílem je symptomatická úleva a zachování kvality života.

Chemoterapie (monoterapie nebo dublet), cílená terapie, eventuálně sekvenční podání cílené terapie samostatně. Základem paliativních režimů jsou fluoropyrimidiny, oxaliplatin a irinotekan v různých kombinacích, eventuálně v monoterapii.

4.3.2.2 Cílená léčba

Využívá se v rámci léčby metastazujícího onemocnění. Obecně ji lze rozdělit na monoklonální protilátky a tyrosinkinázové inhibitory (TKI). Tyrosinkinázové inhibitory jsou malé molekuly s afinitou k jednomu či více různým receptorům s kinázovou aktivitou. Regorafenib je perorální multikinázový inhibitor cílící na kinázové domény angiogenních, stromálních a nádorových receptorů. Tento preparát prokázal účinnost ve studii fáze III CORRECT (N = 760) oproti placebo u pacientů s generalizovaným kolorektálním karcinomem po vyčerpání standardních možností terapie. Medián celkového přežití činil 6,4 oproti 5,0 měsícům v rameni s placebem ($p = 0,0052$). Nejčastějšími nežádoucími účinky stupně 3 a 4 byly *hand-foot* syndrom (16,6 %; projevuje se sníženou citlivostí, bolestí, zarudnutím nebo otokem), únava (9,6 %), průjem (7,2 %) a arteriální hypertenze (7,2 %) (GROTHERY, A. et al., 2013). Další potenciální léčebnou možností je TAS-102 (kombinace TKI s chemoterapeutikem). TAS-102 se skládá z trifluorothymidinu (který vykazuje dobrou aktivitu na buněčných liniích rezistentních vůči 5-fluorouracilu) a tipiracilu, což je inhibitor thymidinfosforylázy. Účinnost tohoto preparátu prokázala studie fáze III RECURSE (N = 799), v rámci které byl podáván pacientům s vyčerpanou terapií pro generalizovaný KKK a hodnocen proti placebo. Medián celkového přežití činil 7,1 měsíce v rameni s TAS-102 oproti 5,3 měsíce v rameni s placebem ($p < 0,0001$). Nejčastějšími nežádoucími účinky 3. a 4. stupně byly neutropenie (38 %) a anémie (18 %), nehematologická toxicita byla minimální (YOSHINO, T. et al., 2014).

Protilátky

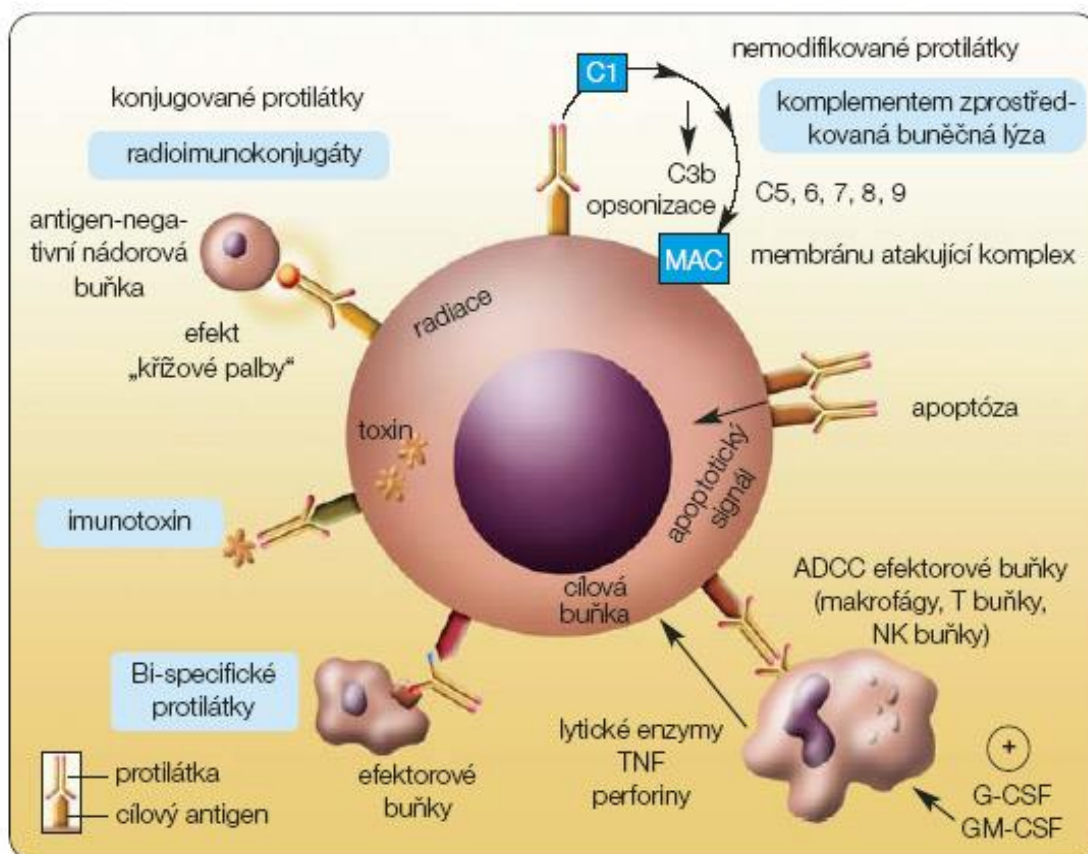
Účinek monoklonálních protilátek v terapii solidních nádorů spočívá v navázání monoklonální protilátky na cílovou strukturu (receptor) nádorové buňky a v následné interakci s dalšími složkami imunitního systému.

Navázáním terapeutické monoklonální protilátky tedy dojde k:

1. Obsazení vazebného místa receptoru, zabránění vazby ligandu a tím zamezení signálu pro buněčné dělení.
2. Lýze nádorových buněk mechanismem na protilátce závislé toxicity zprostředkované NK buňkami, eventuálně makrofágy (ADCC; při této reakci NK buňky rozpoznávají

Fc γ receptory protilátky navázané na povrchu nádorových buněk, aktivují se a uvolňují cystické látky, jež nádorové buňky zničí).

3. Spuštění klasické dráhy aktivace komplementu, která způsobí lýzu buněk. Schéma účinku monoklonálních protilátek prostřednictvím imunitního systému je znázorněno na obr. 7.



Obr 7: Schematický model účinku monoklonálních protilátek prostřednictvím imunitního systému

Po navázání monoklonální protilátky (mAb) na specifickou cílovou strukturu na nádorové buňce (target) dochází k vazbě první složky komplementu (C1q) na Fc fragmenty monoklonálních protilátek. Tato vazba vede k aktivaci klasické dráhy komplementu a následně k tvorbě membranolýtického komplexu (membrane attack komplex [MAC]) a lýze nádorové buňky. Dalším možným efektem uplatňujícím se při destrukci nádorových buněk je buněčná toxicita závislá na protilátce (antibody-dependent cellular cytotoxicity [ADCC]). Při této reakci jsou nádorové buňky s navázanými protilátkami rozpoznány NK buňkami cestou Fc γ receptoru (Fc γ R11A = CD16), dochází k aktivaci a následnému cytotoxickému působení. Během aktivace komplementu je produkován i fragment C3b, který působí jako opsonin pro poškozené nádorové buňky a umožňuje fagocytózu prostřednictvím vazby na C3b receptor makrofágů.

ADCC – buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách, **C** – komplement, **G-CSF** – granulocyty stimulující růstový faktor, **GM-CSF** – granulocyty makrofágy stimulující růstový faktor, **MAC** – membránu napadající komplex, **NK** – přirozený zabijáč (VORLÍČEK, J. et al. 2005)

Mezi současné armamentarium cílené (biologické) léčby kolorektálního karcinomu patří:

1. Bevacizumab

Bevacizumab je monoklonální protilátka cílená proti vaskulárnímu endotelovému růstovému faktoru VEGF, využívaná v kombinaci s chemoterapií u metastazujícího kolorektálního karcinomu nezávisle na stavu onkogenu *RAS*. Bevacizumab byl registrován v indikaci pro metastazující kolorektální karcinom v roce 2004 na základě výsledků studie fáze III E3200 srovnávající FOLFOX4 s nebo bez bevacizumabu a samotný bevacizumab (N = 829). Medián celkového přežití byl prodloužen na 12,9 měsíce oproti 10,8 (samotná chemoterapie) a 10,2 (samotný bevacizumab). Medián času do progresu (PFS) byl rovněž statisticky významně prodloužen (7,2 vs. 4,8 a 2,7 měsíce). Nejčastějšími nežádoucími účinky v rameni s bevacizumabem byly arteriální hypertenze, krvácivé projevy a neuropatie (GIANTONIO, B.J. et al., 2007).

2. Afibercept

Afibercept je rekombinantní fúzní protein složený z extracelulárních domén lidských receptorů pro VEGF-1 a 2, navázaných na Fc fragment IgG1. Byl registrován na základě výsledků studie fáze III VELOUR, srovnávající FOLFIRI s nebo bez afiberceptu ve 2. linii terapie pro metastazující kolorektální karcinom po selhání režimu na bázi oxaliplatinu s nebo bez bevacizumabu (N = 1 226). Medián celkového přežití byl signifikantně delší v rameni s afiberceptem (13,5 vs. 12,1 měsíce). Nejčastější nežádoucí účinky se příliš nelišily od nežádoucích účinků bevacizumabu (TABERNERO, J. et al., 2014).

3. Ramucirumab

Ramucirumab je rekombinantní protilátka vůči receptoru pro vaskulární endotelový růstový faktor 2 (VEGFR-2), podávaná v kombinaci s chemoterapií nezávisle na stavu protoonkogenu *RAS*. Prokázal účinnost ve studii fáze III RAISE, srovnávající FOLFIRI s/nebo bez ramucirumabu ve 2. linii terapie pro mKRK po selhání režimu založeného na oxaliplatině a bevacizumabu (N = 1 050). Medián celkového přežití byl prodloužen na 13,3 měsíce oproti 11,7 (p = 0,021). Rozdíl v mediánu PFS byl rovněž statisticky významný (5,7 vs. 4,5 měsíce; p = 0,0005). Nejčastějšími nežádoucími účinky v rameni s ramucirumabem byly neutropenie, únava, arteriální hypertenze a trombocytopenie (TABERNERO, J. et al., 2015).

4. Cetuximab a panitumumab

Cetuximab a panitumumab jsou monoklonální protilátky vůči receptoru pro epitelový růstový faktor, využívané u pacientů s mKRK bez mutací protoonkogenu *RAS*. Zatímco cetuximab je chimerickou protilátkou, panitumumab je plně humanizovaná monoklonální protilátka. Anti-EGFR imunoglobuliny fungují na bázi kompetitivní inhibice navázání

ligandu, a zabraňují tedy signalizaci mediované receptorem EGFR. Rovněž indukují cytotoxicitu závislou na protilátkách (ADCC) a zvyšují koncentraci proteinu Bax, který způsobuje apoptózu. Cetuximab byl registrován v indikaci pro mKRR s expresí EGFR po selhání předchozí terapie irinotekanem v roce 2005 na základě studie fáze II BOND (EMR 62202-007), která srovnávala přežívání pacientů v rameni s cetuximabem s nebo bez irinotekanu. Medián PFS činil 4,1 měsíce v kombinovaném rameni vs. 1,5 měsíce v rameni pouze s cetuximabem (CUNNINGHAM, D. et al., 2004). Původním zamýšleným prediktorem účinku byla exprese EGFR, nicméně prediktivní význam tohoto vyšetření se nepotvrdil. V současné době je možné podat tento preparát pouze v případě, že není přítomná mutace genu KRAS a NRAS. Nejčastějšími nežádoucími účinky v rameni s cetuximabem byly kožní aknéformní reakce, pokles hladiny magnézia a alergická reakce (VAN CUTSEM, E. et al., 2009).

Panitumumab byl registrován v indikaci pro metastazující kolorektální karcinom s „divokým“ KRAS v roce 2009 na základě retrospektivní analýzy KRAS ve studii fáze III srovnávající podpůrnou terapii s nebo bez panitumumabu u pacientů s vyčerpanou standardní terapií (N = 463). Rozdíl mediánu celkového přežití nebyl statisticky významný. Medián času do progresu (PFS) byl statisticky významně prodloužen (3,2 vs. 2,0 měsíce). Nejčastějšími nežádoucími účinky v rameni s panitumumabem byly kožní aknéformní reakce, pokles hladiny magnézia a plicní fibróza (VAN CUTSEM, E. et al., 2007).

4.3.2.3 *Imunoterapie*

Blokátory kontrolních bodů imunitní reakce

Blokádou inhibičních molekul či aktivací stimulačních molekul na T lymfocytu dochází k posílení protinádorové buněčné imunitní odpovědi. T lymfocyty jsou aktivovány stimulací nádorovými antigeny navázanými na molekuly hlavního histokompatibilního komplexu (MHC) a řadou kostimulačních molekul. Autoři studie publikované v Lancet Oncology se zaměřili na posouzení efektu nivolumabu, PD-1 imunitního checkpoint inhibitoru, u pacientů s dMMR/MSI-H metastatickým CRC. Jednalo se o nemocné, kteří progredovali či netolerovali minimálně jednu předcházející linii onkologické léčby, jež zahrnovala klasické léky, jakými jsou fluoropyrimidiny a oxaliplatin či irinotekan. Do studie bylo zahrnuto 74 pacientů, z nichž 54 % již podstoupilo 3 a více předchozích léčebných strategií. Medián následujícího sledování pacientů činil 12 měsíců (interkvartilní rozmezí [IQR] 8,6–18,0). Celkově 23 pacientů (31,1 %) dosáhlo objektivní odpovědi a u 51 pacientů (69 %) byla konstatována kontrola nemoci po dobu 12 týdnů a déle. V době analýzy byli všichni pacienti s odpovědí na léčbu naživu a u 8 trvala odpověď 12 měsíců či déle. Medián přežití bez

progrese činil 14,3 měsíce. Celkové přežití po 12– měsících dosahovalo 73 %. Autoři studie konstatovali, že tyto výsledky silně podporují hypotézu, že dMMR/MSI-H status je markerem odpovědi na checkpoint inhibitory u pacientů s metastatickým CRC. Jeho testování by tedy mělo být doporučeno jako standardní test u všech pacientů s metastatickým CRC. Nabízí se tak nová léčebná možnost u této skupiny nemocných. (OVERMAN, M.J. et al., 2017).

Vakcíny

Nádorové vakcíny jsou vytvářeny za účelem podnícení imunitní odpovědi prostřednictvím s tumorem asociovaných či tumor-specifických antigenů, které stimulují imunitní systém k destrukci nádorových buněk nesoucích tyto antigeny. Terapie vakcínou je založena na podání biologického preparátu, jenž obsahuje tyto antigeny a následně způsobí imunitní reakci s tvorbou specifických imunokompetentních buněk. Pro správný efekt vakcinace je klíčová správná funkce antigen prezentujících buněk. Významný léčebný účinek prokázaný na experimentálních modelech však bohužel nebyl potvrzen. Terapeutický efekt bývá nejčastěji pozorován při léčbě časných onemocnění nebo po chirurgické či cytoreduktivní terapii. Skutečnost, že pro klinické pokusy jsou často vybíráni pacienti v pokročilém stadiu nemoci, proto může být příčinou neúspěchu randomizovaných studií. Dalším důvodem je pravděpodobně schopnost nádorových buněk unikat imunitnímu dozoru. Mezi nejdůležitější únikové mechanismy patří ztráta produkce nádorových antigenů, tvorba imunosupresivních faktorů (např. TGF- β či IL-10), produkce neoangiogenních faktorů (VEGF) a rezistence nádorových buněk vůči apoptotickým stimulům.

Imprime PGG

Polysacharid beta-1,3/1,6 glukan odvozený od buněčné stěny kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* se váže na alternativní vazebné místo receptoru pro komplement 3 na povrchu neutrofilních segmentů, což vede k jejich aktivaci a následné produkci prozánětlivých cytokinů. Studie fáze Ib/II prokázala efekt přidání Imprime PGG k cetuximabu u předléčených pacientů (TAMAYO, M.B. et al., 2010).

Adoptivní terapie T lymfocyty

Tato koncepce je založena na odebrání imunitních buněk od pacienta, jejich chemické stimulaci za účelem zvýšení aktivity a následném podání buněk zpět pacientovi. T lymfocyty jsou in vitro stimulovány k proliferaci podáním interleukinu 2 (IL-2). U pacientů s mKRK po selhání standardní terapie (oxaliplatina, irinotekan a 5-fluorouracil) proběhla s autologními tumor infiltrujícími lymfocyty klinická studie fáze II. Před intravenózní infuzí tumor infiltrujících lymfocytů je pacientům aplikována nemyeloablativní kombinovaná chemoterapie (cyklofosamid + fludarabin) (YOSHIDA, Y. et al., 2016).

5 KARCINOM PRSU

Etiologie vzniku karcinomu prsu je multifaktoriální. Rizika jsou jednak zevní – ovlivnitelná nebo částečně ovlivnitelná – a dále vnitřní, která ovlivnit nelze. Mezi rizikové faktory vzniku karcinomu prsu patří časná menarche a pozdní menopauza. Ženy se začátkem menarche po 15. roce života mají oproti ženám s počátkem před 15. rokem statisticky významně nižší riziko vzniku karcinomu prsu (HR = 0,75). Ženy s pozdní menopauzou mají vyšší riziko vzniku karcinomu prsu. Také nuliparita je rizikovým faktorem a s rostoucím počtem porodů riziko vzniku karcinomu prsu klesá. Neméně podstatným faktorem je i věk v době prvního porodu. S rostoucím věkem v době prvního porodu roste riziko vzniku karcinomu prsu taktéž. Všechny tyto skutečnosti potvrzují velmi důležitou úlohu hormonálních vlivů na vznik a vývoj karcinomu prsu. Počet ženských příbuzných prvního stupně s karcinomem prsu v rodinné anamnéze zvyšuje riziko vzniku karcinomu prsu v případě jedné ženy dvojnásobně, v případě dvou žen trojnásobně. V oblasti životního stylu jsou rizikovými faktory nadměra užívání alkoholu, kouření a obezita. Stran dědičné dispozice je rizikem přítomnost zárodečné mutace vedoucí k vyšší pravděpodobnosti vzniku karcinomu prsu, ale i dalších zhoubných nádorů. Hereditární karcinom prsu se vyskytuje u 5-15 % pacientek. Rozeznáváme vysoce rizikové geny, kam patří *BRCA1/BRCA2 (Breast cancer 1, 2)*, které jsou standardně vyšetřovaný u pacientek s pozitivní rodinnou anamnézou nebo s předchozím výskytem karcinomu prsu a/nebo ovaria v osobní anamnéze. Dále sem patří geny s nižším rizikem vzniku karcinomu prsu jako např. *ataxia teleangiectasia (ataxia telangiectasia mutated [ATM])*, *TP53 (transformation-related protein 53)*, kináza kontrolního bodu 2 (*check point kinase 2 [CHEK2]*), homolog fosfatázy a tensiominu (*phosphatase and tensin homolog [PTEN]*), *kadherin 1 (cadherin-1[CDH1])* a partner a lokalizátor genu *BRCA2 (partner and localizer of BRCA2 [PALB2])*.

Také pro karcinom prsu platí, že důležitou roli v jeho nádorové biologii hraje imunitní systém. Hlubší pochopení jednotlivých mechanismů pro- a protinádorového působení imunitního systému v interakci s nádorovými buňkami a nádorovým mikroprostředím proto má zásadní význam pro maximalizaci efektu moderní imunoterapie. Přítomnost specifických subpopulací buněk imunitního systému v oblasti karcinomu prsu má prokazatelně prognostický a prediktivní význam. Strategie vedoucí k navýšení počtu tumor infiltrujících lymfocytů velmi pravděpodobně povedou ke zvýšení počtu pacientů profitujících z imunoterapie. Stejně důležitou roli pak bude v budoucnosti hrát nalezení a odblokování inhibičních mechanismů, kterými nádorové buňky brání efektorovým buňkám v jejich funkci. Na tomto poli bylo v poslední době zaznamenáno několik významných úspěchů v podobě vývoje protilátek inhibujících imunitní kontrolní body (CTLA-4 a PD-1/PD-L1), jež vedly k průlomovým výsledkům terapie u řady diagnóz. Velká očekávání vzbudily také protinádorové vakcíny, které by se mohly stát novým základem

prevence i terapie nádorových onemocnění. Dosažené výsledky však zatím zaostávají za původními očekáváními.

5.1 Histologická verifikace karcinomu prsu

Histologická verifikace je bezpodmínečně nutná pro zahájení terapie. Kromě histologického typu tumoru a stupně jeho diferenciaci (*grading*) se standardně vyšetřují tyto parametry:

- Estrogenové (*ER*) a progesteronové receptory (*PR*), jejichž vyšetření je nutné pro zahájení hormonální terapie;
- Protoonkogen (*HER2/neu*), jehož zvýšená exprese nebo amplifikace je předpokladem pro zahájení cílené anti-HER2 terapie monoklonální protilátkou;
- Proliferační aktivita (*Ki-67*, *MIB1*) popisující rychlost množení nádorových buněk.

Imunohistochemické rozdělení tumorů je postupně nahrazováno klasifikací dle expresních profilů a rozděluje nádory prsu do jednotlivých podskupin na základě výše popsaných parametrů (PEROU, C.M. et al., 2000), (MAISONNEUVE, P. et al., 2014):

- *luminal A* (40 %) – ER-pozitivní, HER2-negativní, Ki-67 <14 % nebo Ki-67 14-19 % a PR >20 %;
- *luminal B* (20 %) – ER-pozitivní, HER2-negativní, Ki-67 > 20 % nebo Ki-67 14-19 % a PR <20 %;
- *triple-negativní/basal-like* (15-20 %) – ER- a PR-negativní, HER2-negativní (*triple-negativní*);
- *HER2* (10-15 %) – ER- a PR-negativní, HER2-pozitivní;
- neklasifikovaný typ (5-15 %).

5.2 Základy terapie karcinomu prsu

5.2.1 Léčba lokální

5.2.1.1 Chirurgická léčba

Chirurgická léčba karcinomu prsu se v posledních letech velmi rozvinula. Díky prevenci je mnoho nádorů zachyceno v počátcích. S tím souvisí to, že velká část žen podstupuje jen menší operaci, při které zůstává prs zachován. Chirurgické odstranění nádoru při zachování prsu spočívá v odstranění pouze nádorové tkáně a malé množství okolní zdravé tkáně (prs šetřící výkon). Je spojována s exenterací axilly či vyšetřením tzv. sentinelové uzliny. Při chirurgickém odstranění celého prsu (mastektomie) je odstraněn celý prs. Po léčebném operačním zákroku může následovat rekonstrukce prsu buď za pomoci prsních implantátů anebo vlastní tukové tkáně. K operačním výkonům můžeme řadit též sanační operace nebo resekce metastáz.

5.2.1.2 Radioterapie

Cílem adjuvantní radioterapie je snížení pravděpodobnosti vzniku lokální rekurence. Je indikována u všech pacientek po prs šetřících výkonech (s výjimkou žen starších 70 let s hormonálně dependentními karcinomy prsu I. klinického stadia). Dále jsou to pacientky po snesení celého prsu v případě, že:

- a) primární tumor je >5 cm (pT3) nebo infiltruje kůži (pT4);
- b) jsou nádorem postiženy lymfatické uzliny.

Duktální karcinom *in situ* (DCIS) je indikovaný k radioterapii v případě prs šetřícího výkonu a doprovodných rizikových faktorů (věk nemocné, nedostatečné okraje resekátu, velikost tumoru, *grading*, v budoucnu vysoké riziko relapsu nemoci dle *Oncotype DX*). Léčba zářením se využívá též v paliativní indikaci u metastatického onemocnění.

5.2.2 Systémová farmakoterapie

5.2.2.1 Chemoterapie

(Neo)adjuvantní terapie

Dle závěrů z konference v St. Gallen roku 2015 je (neo)adjuvantní terapie doporučena u pacientek s nediferencovaným tumorem (stupeň diferenciace 3), vysokou proliferací, nízkou expresí hormonálních receptorů (ER, PR), u triple negativních karcinomů, HER2-pozitivních karcinomů, při postižení >3 spádových lymfatických uzlin a u vysokého skóre *Oncotype DX* (genomický test predikující riziko návratu onemocnění). Neoadjuvantní

chemoterapie je vhodná v případě rozsáhlejších tumorů ve snaze zmenšit primární nádor nebo uzlinové postižení a následně provést parciální chirurgický výkon. Neoadjuvantní chemoterapie ve srovnání s adjuvantní neprodlužuje dobu přežití. Dosažení kompletní patologické remise je ale pozitivním prognostickým faktorem.

Rutinní kombinací je sekvenční podání cytostatik ze skupiny antracyklinů a taxanů. U HER2-dependentních nádorů je součástí neoadjuvance anti-HER2 biologická terapie. Adjuvantní chemoterapie je indikovaná samostatně u hormonálně independentních HER2-negativních karcinomů. Trvání adjuvantní chemoterapie je standardně 6 měsíců. U hormonálně dependentních nádorů je u rizikových pacientek podávána chemoterapie se sekvenční hormonální léčbou. U HER2-dependentních karcinomů je indikované přidání trastuzumabu (anti-Her-2 monoklonální protilátka) po dobu 12 měsíců. Paliativní chemoterapie je indikovaná v případě nádoru bez přítomných hormonálních receptorů nebo v případě symptomatického hormonálně dependentního tumoru, eventuálně u značně rozsáhlého metastatického postižení. Základní cytostatika pak představují antracykliny (pokud nebylo dosaženo kumulativní dávky při předchozí (neo)adjuvantní terapii) a taxany (v případě alergických reakcí lze podat na albumin vázaný paklitaxel). Dalšími možnostmi jsou cytostatika jako kapecitabin samostatně nebo v kombinaci s navelbinem či cílenou terapií, platinové deriváty samostatně či v kombinaci s gemcitabinem, gemcitabin v kombinaci s taxany atd. V posledních letech se též testovala řada nových preparátů, nicméně do klinické praxe se zatím dostalo pouze cytostatikum eribulin (TWELVES, C. et al., 2014).

5.2.2.2 *Hormonální terapie*

Adjuvantní

Terapie hormonálně dependentního onemocnění se řídí menoaktivitou. Za postmenopauzální je dle doporučení NCCN považována žena po bilaterální ovariectomii nebo u které se neobjeví menses po dobu 12 měsíců. Menoaktivitu lze u perimenopauzálních pacientek vyšetřit pomocí hladin FSH (v období menopauzy hladina roste) a estradiolu (v menopauze klesá) v krvi. U premenopauzálních pacientek je standardem léčby tamoxifen (antiestrogen) po dobu 5-10 let (dle výsledků studie ATLAS je vhodnější dlouhodobější podání), u rizikových žen potom v kombinaci s ovariální supresí (LHRH analogem nebo bilaterální ovariectomií) (DAVIES, CH. et al., 2012). V případě výskytu některých nežádoucích účinků tamoxifenu (hyperplazie endometria, trombóza, artralgie, myalgie atd.) je možná změna na aromatázový inhibitor (anastrozol, letrozol). Dle výsledku studií TEXT a SOFT se u vysoce rizikových pacientek zdá být vhodnější podání exemestanu než tamoxifenu v kombinaci s ovariální supresí (PAGANI, O. et al., 2019). Podobně v případě

vysoce rizikových pacientek je po 2-3 letech užívání tamoxifenu doporučena změna na nesteroidní aromatázový inhibitor. U postmenopauzálních žen je standardem léčby nesteroidní aromatázový inhibitor (anastrozol, letrozol) nebo tamoxifen. V případě výskytu nežádoucích účinků této terapie je možná změna na tamoxifen či exemestan (steroidní aromatázový inhibitor).

Paliativní

V případě HER2-negativních tumorů je u premenopauzálních pacientek doporučena ovariální suprese (analog LHRH nebo ovariectomie) v kombinaci s tamoxifemem nebo inhibitorem aromatázy. U postmenopauzálních pacientek je možné podat tamoxifen, aromatázový inhibitor nebo fulvestrant. Kombinované podání fulvestrantu s anastrozolem zkoumala studie fáze III SWOG S0226. Jednoznačný benefit oproti samotnému anastrozolu nicméně nebyl prokázán (HERTZ, D.L. et al., 2016). Velmi slibnou kombinací je letrozol (aromatázový inhibitor) + palbociclib (perorální inhibitor cyklin-dependentní kinázy 4 a 6). Tato kombinace byla ve Spojených státech amerických schválena na základě studie fáze II (N = 165) srovnávající účinnost kombinace oproti samotnému letrozolu v 1. linii terapie metastazujícího karcinomu prsu s pozitivními hormonálními receptory a negativním HER2. Bylo dosaženo dvojnásobného prodloužení času do progresu (20 vs. 10 měsíců; HR 0,49). Nejčastějším nežádoucím účinkem v kombinovaném rameni byla neutropenie (54 % nemocných). Účinným režimem po selhání inhibitoru aromatázy je kombinace steroidního IA (exemestan) s inhibitorem mTOR (afinitor). U pacientek s HER2-positivními tumory je také možná kombinace hormonální terapie a cílené anti-HER2 léčby (trastuzumab, pertuzumab, lapatinib).

5.2.2.3 Cílená terapie

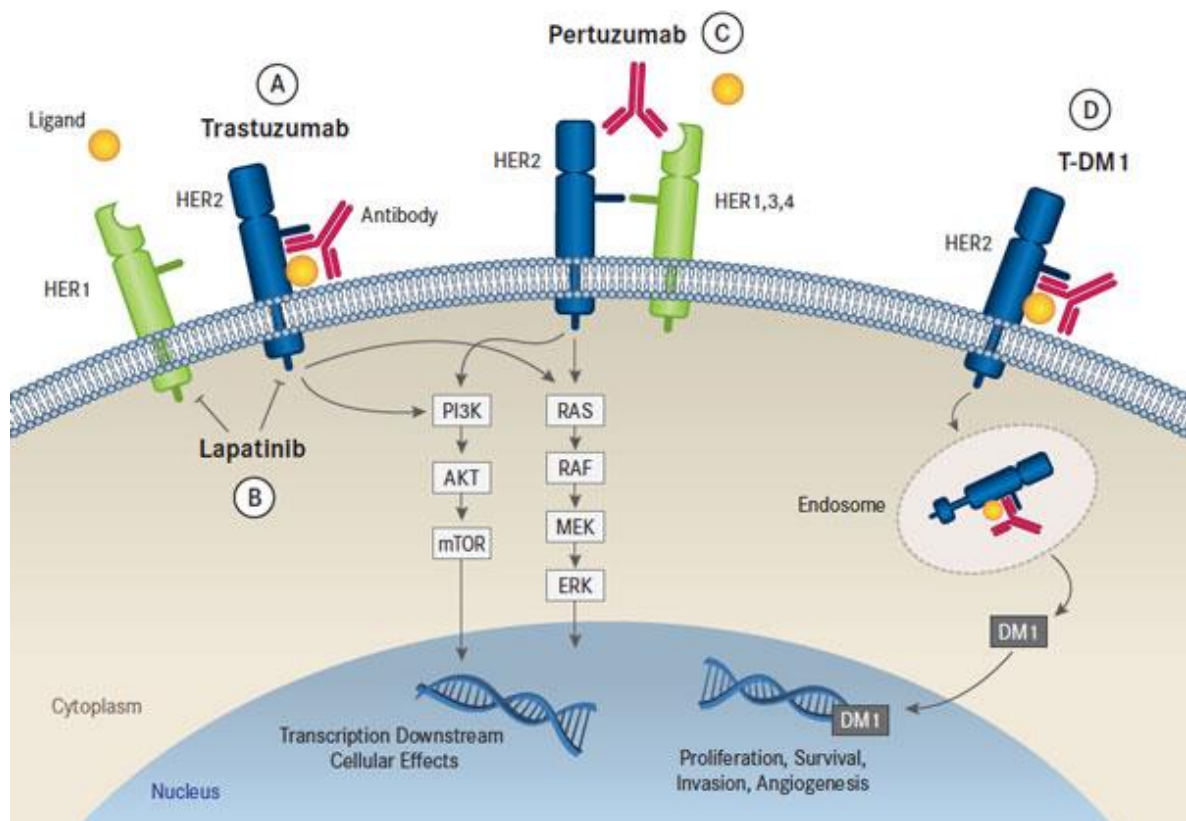
Cílená anti-HER2 terapie je základem léčby časného i metastatického karcinomu prsu. Obecně lze molekuly cílící na receptor pro epidermální růstový faktor rozdělit na protilátky a tyrosinkinázové inhibitory (TKI). Tyrosinkinázové inhibitory jsou malé molekuly s afinitou k jednomu nebo více různým receptorům s kinázovou aktivitou. V rámci léčby metastazujícího HER2-positivního karcinomu prsu je možné podání lapatinibu (inhibuje HER2 a HER1):

- a) v kombinaci s kapecitabinem po selhání antracyklinů a taxanů a po selhání trastuzumabu v rámci paliativní terapie;
- b) s trastuzumabem u nemocných s negativními hormonálními receptory po selhání trastuzumabu v kombinaci s chemoterapií;
- c) s inhibitorem aromatázy k léčbě žen po menopauze, u kterých se neuvažuje o chemoterapii.

Hlavními nežádoucími účinky stupně 3 a 4 jsou průjem, ztráta chuti k jídlu, kožní vyrážka a únava. K dalším lékům patří mTOR inhibitor (*mammalian target of rapamycin* [mTOR]) everolimus, který je představitelem cílené terapie, jež v kombinaci s hormonální léčbou pomáhá překonat hormonální rezistenci pokročilého onemocnění. V kombinaci s exemestanem je indikovaný k léčbě postmenopauzálních žen s hormonálně pozitivním HER2-negativním karcinomem prsu po selhání léčby nesteroidním inhibitorem aromatáz. Registrován byl na základě studie fáze III BOLERO-2 srovnávající kombinaci oproti samotnému exemestanu (N = 680). Bylo dosaženo statisticky významného prodloužení času do progresu (11,0 vs. 4,1 měsíce) i celkového přežití (31,0 vs. 26,6 měsíce). Hlavními nežádoucími účinky stupně 3 a 4 jsou stomatitida (8%), hyperglykemie a únava. Inhibitory PARP (*poly/ADP-ribose/polymerase*; ADP = adenosindifosfát) představují další potenciální terapeutickou možnost, která je v současné době intenzivně zkoumána. PARP se účastní oprav zlomů dvouřetězcové DNA. Proto se předpokládalo, že z kombinace PARP inhibitoru a chemoterapie poškozující DNA by mohly profitovat zejména pacientky se somatickou mutací *BRCA* přítomnou v buňkách nádoru. Olaparib prokázal dobrou účinnost ve studii fáze II s předléčenými pacientkami se somatickými mutacemi *BRCA1* nebo *BRCA2*. Podíl odpovědí dosáhl 41 %, PFS 5,7 měsíce. Nežádoucí účinky 3. stupně byly únava, nauzea a zvracení (BEAVER, J.A. et al., 2012).

Monoklonální protilátky

Monoklonální protilátky dnes již patří mezi základní kameny moderního léčebného arzenálu. Účinek řady monoklonálních protilátek je vysvětlován i zásahem do imunitní odpovědi. Po jejich podání byly sledovány změny parametrů jak nespecifické, tak specifické imunity. Kromě přímého účinku na nádorovou buňku mohou monoklonální protilátky ovlivňovat i další typy buněk a molekul nezbytných pro růst nádoru (některé protilátky např. neutralizují růstové faktory a tím brzdí expanzi nádorových buněk). Monoklonální protilátky dokáží reagovat na specifické antigeny nádorových buněk a mohou posílit imunitní reakci pacienta.



Obr 8: Mechanismy účinku monoklonálních protilátek proti receptoru HER-2

Receptory humánního epidermálního růstového faktoru (EGF) HER1, HER2, HER3 a HER4 jsou receptorové tyrosinkinázy, jež jsou zapojeny do signálních transdukčních drah, které vedou k přežití a diferenciaci buněk. Každý z těchto receptorů se skládá ze tří složek: extracelulární vazebné domény, transmembránového lipofilního segmentu a funkční intracelulární domény tyrosinkinázy (s výjimkou HER3). Když se ligand receptoru EGF váže na extracelulární vazebnou doménu, tyrosinkinázové domény se aktivují homodimerací i heterodimerizací. Homo- a heterodimerizace rodiny HER vede k fosforylaci domény tyrosinkinázy a aktivaci downstream signální dráhy, včetně PI3K-AKT-mTOR a RAF-MEK-MAPK. Následné účinky zahrnují přežití, proliferaci a zvýšenou tvorbu vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF). Anti-HER2 strategie: (A) Trastuzumab je monoklonální protilátka, která se váže na extracelulární doménu IV receptoru HER2. (B) Lapatinib je duální inhibitor tyrosinkinázy proti HER2 a EGFR (HER1). (C) Pertuzumab je monoklonální protilátka, která se váže na extracelulární doménu II HER2 a inhibuje dimerizaci HER2 s jinými receptory HER rodiny, zejména HER3. Heterodimer HER2-HER3 je silný aktivátor signalizace cestou PI3K-AKT-mTOR. (D) T-DM1 je nový konjugát protilátka-léčivo trastuzumabu a DM1, derivát maytansinu a vysoce účinného antimitotického léčiva. Váže se na extracelulární doménu HER2 (TEPLINSKY, E. et al., 2014).

Přímý protinádorový účinek

- interference s vazbou na receptor (zabránění přenosu signálu)
- indukce apoptózy
- blokáce tvorby proteinů nezbytných pro zachování maligního fenotypu buňky

Účinek zprostředkovaný komplementem

- cytotoxicita
- aktivace imunitní odpovědi

Účinek zprostředkovaný imunitními buňkami

- cytotoxicita
- fagocytóza
- aktivace imunitní odpovědi

Po navázání monoklonální protilátky (mAb) na specifickou cílovou strukturu na nádorové buňce dochází k vazbě první složky komplementu (C1q) na Fc fragmenty monoklonálních protilátek. Tato vazba vede k aktivaci klasické dráhy komplementu a následně k tvorbě membranolýtického komplexu (*membrane attack complex* [MAC]) a lýze nádorové buňky. Dalším možným efektem uplatňujícím se při destrukci nádorových buněk je buněčná toxicita závislá na protilátce (*antibody-dependent cellular cytotoxicity* [ADCC]). Při této reakci jsou nádorové buňky s navázanými protilátkami rozpoznány NK buňkami cestou Fcγ receptoru (FcγRIIIA = CD16) a dochází k aktivaci a následnému cytotoxickému působení. Během aktivace komplementu je produkován i fragment C3b, který působí jako opsonin pro poškozené nádorové buňky a umožňuje fagocytózu prostřednictvím vazby na C3b receptor makrofágů (viz obr. 7 a 8 ukazující schematický model účinku monoklonálních protilátek prostřednictvím imunitního systému).

Navázáním terapeutické monoklonální protilátky tedy dojde k:

- a) obsazení vazebného místa receptoru;
- b) zabránění heterodimerizaci receptoru (pertuzumab);
- c) aktivaci NK buněk a makrofágů přes Fc receptor (FcR) s následnou lýzou či fagocytózou (na protilátce závislá cytotoxicita);
- d) navázání komplementu (C1q) a spuštění na komplementu závislé cytotoxicity.

Trastuzumab

Trastuzumab je monoklonální protilátka cílená proti extracelulární doméně HER2 a vykazuje dobrou účinnost u pacientek s karcinomem prsu s prokázanou amplifikací HER2. V terapii časného karcinomu prsu je podání indikované (neo)adjuvantně samostatně nebo v kombinaci s taxany (současně či sekvenčně) a antracykliny (sekvenčně) po dobu 12 měsíců. Nemocné s HER2-pozitivními nádory ≤ 1 cm mohou mít významně horší prognózu než nemocné se stejně velkými HER2-negativními nádory. Adjuvantní podání trastuzumabu je proto vhodné zvážit i u nemocných s nádory o velikosti 0,5-1 cm, a to individuálně s přihlédnutím k dalším rizikovým faktorům onemocnění a k možným rizikům vyplývajícím z léčby.

V rámci léčby metastazujícího HER2-positivního karcinomu prsu je podání možné:

- a) v monoterapii po selhání 2 linií chemoterapie pro metastazující onemocnění obsahující taxany a antracykliny nebo v případě, že jsou kontraindikované;
- b) s taxany v 1. linii léčby metastazujícího onemocnění u nemocných, pro něž léčba antracyklinem není vhodná;
- c) s inhibítorem aromatázy u postmenopauzálních pacientek s metastazujícím hormonálně dependentním karcinomem prsu, dosud neléčených trastuzumabem, nebo jako udržovací léčba po ukončení chemoterapie. Ve 2. linii léčby metastazujícího onemocnění je možná záměna chemoterapeutika a ponechání trastuzumabu.

Pertuzumab

Jedná se o monoklonální protilátku zaměřenou proti extracelulární doméně HER2 s jiným vazebným místem než trastuzumab, jež je indikovaná v kombinaci s trastuzumabem a taxanem v 1. linii léčby pacientek s HER2-positivním metastazujícím karcinomem prsu. Účinnost této kombinace byla prokázána ve studii fáze III CLEOPATRA (trastuzumab + docetaxel s nebo bez pertuzumabu). Medián času do progresu byl statisticky významně prodloužen na 18,5 vs. 12,4 měsíce. Nejčastějšími nežádoucími účinky stupně 3 a 4 v rameni s pertuzumabem byly průjem a neutropenie (SWAIN, S.M. et al., 2013).

Trastuzumab emtansin

Trastuzumab emtansin představuje konjugát monoklonální protilátky (trastuzumab) a cytotoxické látky DM1 (mikrotubulární inhibitor). Trastuzumab emtansin (T-DM1) je dalším preparátem určeným pro léčbu HER2-positivního metastazujícího karcinomu prsu. Studie fáze III EMILIA prokázala dobrou účinnost tohoto preparátu v monoterapii oproti kapecitabinu s lapatinibem u pacientek s metastazujícím HER2-positivním onemocněním po selhání taxanu s trastuzumabem. Medián času do progresu byl statisticky významně prodloužen (9,6 vs. 6,4 měsíce), stejně jako medián celkového přežití (30,9 vs. 25,1 měsíce). Nejčastějšími nežádoucími účinky 3. a 4. stupně v rameni s T-DM1 byly trombocytopenie, zvýšení transamináz, anémie a hypokalémie (KROP, I.E. et al., 2015).

Bevacizumab

Bevacizumab je monoklonální protilátka vůči VEGF-A. V současné době může být preferenčně indikován v léčbě pacientek s triple-negativním metastazujícím karcinomem prsu. Adjuvantní podání bylo zkoumáno studií BEATRICE (fáze III, N = 2 591), nicméně ta neprokázala přínos z ročního adjuvantního podání (BELL, R. et al. 2017).

V rámci terapie metastazujícího onemocnění je indikována terapie bevacizumabu s těmito cytostatiky:

- a) s paklitaxelem (v 1. linii) s prodloužením mediánu času do progresu na 11,4 měsíce oproti 5,8 v rameni pouze s paklitaxelem;
- b) s kapecitabinem s prodloužením mediánu času do progresu na 8,6 měsíce oproti 5,7 při monoterapii kapecitabinem. Nejčastějšími nežádoucími účinky v rameni s bevacizumabem byly arteriální hypertenze, krvácivé projevy a únava.

Cirkulující nádorové buňky (CTC)

První práce věnující se CTC byla publikována v *New England Journal of Medicine* v roce 2004 a ukázala, že pacientky s metastazujícím karcinomem prsu a přítomností CTC v periferní krvi mají horší prognózu než CTC-negativní nemocné (OS 10,9 vs. 21,9 měsíce; $p < 0,0001$). O způsob detekce CTC se zasloužil Cristofanilli, který stanovil hranici (tzv. *cut-off*) pro pozitivitu na 5 CTC v 7,5 ml krve (CRISTOFANILLI, M. et al., 2004). Prognostický význam CTC byl poté potvrzen ve studii jak u generalizovaného, tak i u primárního karcinomu prsu. Očekává se klinické využití monitorování hladiny CTC jako prediktoru účinnosti léčby. Přítomnost CTC v krvi v průběhu léčby je podle některých studií znakem agresivní nemoci nereagující na standardní léčebné modality a takoví pacienti pak mají horší prognózu (BIDARD, F.C. et al., 2014). Molekulární vyšetření CTC je potenciální možností pro zjišťování vlastností CTC včetně diagnostiky rezistence na terapii či citlivosti CTC na konkrétní léky.

5.2.3 Imunoterapie

Přestože karcinom prsu nebyl považován (například ve srovnání s maligním melanomem) za tzv. imunogenní nádor, bylo prokázáno, že i u něj hraje imunitní systém významnou roli (BATES, G.J. et al., 2006). U pacientek s karcinomem prsu byly popsány jak nedostatečná funkce buněk nespecifické imunity, tak i defekty specifické imunity prakticky na všech úrovních (prezentace antigenu, součinnost jednotlivých subpopulací lymfocytů, nedostatečná funkce a někdy i snížené zastoupení CD8+ cytotoxických T lymfocytů, převaha vlivu imunosupresivních subpopulací T-regulačních lymfocytů atd.). Důvodem je jistě i to, že nádorové buňky produkují množství faktorů, které potlačují funkce protinádorové buněčné imunity.

V posledních letech se objevila řada prací studujících prognostický a prediktivní význam přítomnosti TILs (PAGES, F. et al., 2018). Většina TILs jsou CD3+ T lymfocyty, jež zahrnují další podskupiny, diskutuje se hlavně o roli CD4+ pomocných lymfocytů (Th) a CD8+ cytotoxických lymfocytů (Tc). Přestože T-regulační lymfocyty v periferní krvi jsou jednoznačně nepříznivým nálezem, neboť produkují imunosupresivní působky, např. transformující růstový faktor beta (TGF- β), jejich úloha přímo v okolí nádoru není

prozatím dostatečně známá. V současné době je nicméně potvrzeno, že zásadní roli v imunitní odpovědi u karcinomu prsu hrají CD8+ tumor infiltrující lymfocyty, a proto se objevují (podobně jako u kolorektálního karcinomu) snahy o doplnění TNM klasifikace o imunitní stav (Immunoscore) v nádorovém mikroprostředí. Přítomnost TILs u nepředléčených triple-negativních karcinomů je nezávislým pozitivním prognostickým faktorem pro celkovou dobu přežití. Obdobný prognostický význam ve vztahu k přežití a léčebné odpovědi na trastuzumab mají TILs u nepředléčených HER2+ karcinomů.

Mezi prediktory léčebné odpovědi napříč všemi subtypy karcinomů prsu patří zvýšené zastoupení CD8+ cytotoxických T lymfocytů, CD4+ folikulárních T pomocných lymfocytů a CD20+ B lymfocytů (DIECI, M.V. et al., 2014), (GU-TRANTIEN, C. et al., 2013). Přítomnost TILs může mít prediktivní význam dokonce i pro neoadjuvantní a adjuvantní terapii. Zvýšený počet TILs koreluje s pravděpodobností dosažení patologické kompletní remise u nemocných léčených neoadjuvantní chemoterapií antracykliny s taxany u triple-negativních karcinomů a HER2+ karcinomů, zejména při terapii s karboplatinou. Zvýšené množství TILs u ER-negativních karcinomů prsu predikuje dosažení patologické kompletní remise při neoadjuvantní chemoterapii na bázi antracyklinů, ale ne při léčbě režimem CMF (cyklofosamid, methotrexát, 5-fluorouracil). Přítomnost TILs může také predikovat riziko recidivy po adjuvantní léčbě trastuzumabem u HER2+ karcinomů. U pacientek s HER2-pozitivním tumorem a přítomnými TILs bylo patologické kompletní remise dosaženo ve 40 % případů oproti 11 % u HER2-negativních (Heppner, B.I. et.al., 2016).

Blokátory kontrolních bodů imunitní reakce

Blokádou inhibičních molekul či aktivací stimulačních molekul na T lymfocytu dochází k posílení protinádorové buněčné imunitní odpovědi. T lymfocyty jsou aktivovány stimulací nádorovými antigeny navázanými na molekuly hlavního histokompatibilního komplexu (MHC) a řadou kostimulačních molekul.

Blokáda dráhy CTLA-4 (protein asociovaný s cytotoxickými lymfocyty 4)

Vazbou ligandů CD80+ a CD86+ na receptor CTLA-4 dochází k aktivaci dráhy s následným útlumem T lymfocytu zprostředkované imunitní odpovědi. Obsazení vazebného místa CTLA-4 navázáním protilátky brání tlumícímu signálu pro T lymfocyty, což zvyšuje imunitní odpověď. V současné době jsou k dispozici dvě protilátky: ipilimumab schválený v léčbě metastazujícího maligního melanomu a bronchogenního karcinomu a tremetinib testovaný u řady nádorových onemocnění. Tyto protilátky způsobují typické nežádoucí účinky autoimunitního charakteru: kolitidu, hypofyzitidu, hepatitidu a tyroiditidu. Tremelimumab byl podán 26 pacientkám s metastazujícím karcinomem prsu spolu s exemestanem (25 mg/den). K hlavním nežádoucím účinkům patřily průjem (46 %), svědění kůže (42 %),

zácpa (23 %) a únava. Nejlepší dosaženou odpovědí po 12 týdnech léčby byla u 11 (42 %) pacientů pozorovaná stabilizace onemocnění. Během terapie byl zaznamenán vzestup CD4+ a CD8+ periferních lymfocytů exprimujících inducibilní kostimulátor T-buněčné aktivity (VONDERHEIDE, R.H. et al., 2009).

Blokáda dráhy PD-1 (protein programované buněčné smrti 1)

Tato signální dráha je aktivovaná vazbou ligandu PD-L1 (B7-H1) na molekulu programované smrti PD-1 na povrchu T lymfocytů, čímž dochází k útlumu jeho funkcí. Exprese PD-L1 byla identifikována u 30 % karcinomů prsu a koreluje se sníženou expresí ER, větším množstvím TILs a triple-negativními tumory (MITTENDORF, E.A. et al., 2014). Mutací způsobená ztráta tumor supresorového genu *PTEN* a mutace v genu *TP53* nebo *PIK3CA* je u karcinomu prsu spojena s vyšší expresí PD-L1. Vazba protilátky vůči PD-1 brání navázání PD-L1, a tím inhibici efektorových funkcí T lymfocytu. Nivolumab (anti-PD-1 monoklonální protilátka) prokázal účinnost u pacientů s pokročilým maligním melanomem, nemalobuněčným karcinomem plic, karcinomem ledviny a u pacientů s Hodgkinovým lymfomem. Pembrolizumab (anti-PD-L1 monoklonální protilátka) je schválen pro léčbu pokročilého maligního melanomu, karcinomu plic a ledviny. Pembrolizumab byl podán 32 pacientkám s PD-L1 pozitivním značně předlženým triple-negativním karcinomem prsu. Z těchto pacientek byla PD-L1 pozitivita přítomná u >1 % nádorových buněk. Během léčby byla u 5 pacientek zaznamenána toxicita 3.-4. stupně a jedno úmrtí v souvislosti s léčbou (diseminovaná intravaskulární koagulace). Objektivní odpovědi bylo dosaženo u 5 pacientek (z toho 1 kompletní regrese, 2 parciální regrese) z 27 dostupných (NANDA, R. et al., 2014). Roku 2019 v červnu schválila Evropská agentura pro léčivé přípravky na základě výsledků studie IMpassion 130 kombinovanou terapii atezolizumabu (Tecentriq) s nab-paklitaxelem (Abraxane) pro léčbu dospělých pacientek s neresekabilním, lokálně pokročilým nebo metastatickým PD-L1 pozitivním, triple negativním karcinomem prsu (SCHMID, P. et al., 2018).

Další možnosti v oblasti imunoterapie

Podávání vakcín je u karcinomu prsu zatím předmětem výzkumu a studií. Pro správný efekt vakcinace je klíčová správná funkce antigen prezentujících buněk, které jsou u pacientek s gynekologickými malignitami nezralé a nedostatečně funkční (ZÁVADOVÁ, E. et al., 2001). Imunosupresivní faktory podílející se na dysfunkci protinádorové buněčné imunity však neprodukuje jen nádor, ale i samy buňky imunitního systému (např. TGF- β) (ZÁVADOVÁ, E. et al., 2014). Důležitou roli v rámci rozvoje nádorového procesu hrají tumor infiltrující makrofágy (*tumor-associated macrophages* [TAM]) a myeloidní supresorové buňky (*myeloid-derived suppressive cells* [MDSC]). V pokročilejších stadiích tumor infiltrující makrofágy produkují TGF- β a IL-10, jež suprimují imunitní systém a usnadňují tak růst nádoru. MDSC jsou heterogenní populací nezralých myeloidních buněk v různém stadiu diferenciaci, které v nádorovém mikroprostředí produkují široké spektrum supresivních

faktorů tlumících vrozenou i získanou část imunitního systému. Cole a jeho spolupracovníci prokázali korelaci cirkulujících MDSC u pacientek s metastazujícím karcinomem prsu a celkového přežití, přičemž pacienti s vyššími hladinami MDSC měli horší přežití (OS 6,9 vs. 19,6 měsíce) (COLE, S. et al., 2009).

6 VÝCHODISKA A CÍLE PRÁCE

Pacienti s nádorovým onemocněním častěji trpí nedostatečnou protinádorovou buněčnou imunitní odpovědí. V nádorové tkáni dochází k nadprodukcí imunopresivních cytokinů, např. *transforming growth factor beta* (TGF- β), interleukinu 10 (IL-10) či vaskulárního endotelového růstového faktoru (VEGF). Jak VEGF, tak i TGF- β představují faktory, jež jsou zodpovědné za neoangiogenezi a působí imunopresivně tím, že inhibují prezentaci antigenu, stimulují T regulační buňky, potlačují funkci NK buněk, CD 4+, a zejména CD 8+ T lymfocytů. Stav imunitního systému u onkologických pacientů se solidními tumory negativně koreluje s plazmatickými koncentracemi cytokinů TGF- β a VEGF, které mají potenciál modifikovat poměry a funkčnost imunitních buněk v nádorovém mikroprostředí. Tento imunopresivní potenciál může způsobit narušení správné protinádorové buněčné imunitní odpovědi zhoršenou přirozenou obranyschopností pacientů. Z dlouhodobého pozorování vyplývá, že chronická stimulace imunitního systému např. při neléčeném alergickém onemocnění, autoimunitním onemocnění nebo chronickém zánětu způsobuje po určité době jeho vyčerpání a neschopnost řádně rozpoznat, prezentovat a finálně eradikovat patologické antigeny (SIEMENS, C. et al., 2006), (BALKWILL, F. et al., 2001). Tumor infiltrující lymfocyty mají biologický potenciál eradikovat maligní buňky. Přítomnost jednotlivých subpopulací tumor infiltrujících lymfocytů souvisí s mírou agresivity tumoru, a tedy i celkovým přežíváním onkologických pacientů se solidními tumory. Cílem práce bylo hodnotit plazmatické koncentrace cytokinů TGF- β a VEGF u onkologicky nemocných ve vztahu k pokročilosti nádorového onemocnění a ve srovnání se zdravou populací. Součástí práce bylo též hodnotit hustotu tumor infiltrujících lymfocytů jak v centru nádoru, tak i na úrovni takzvaného invazivního lemu nádorové tkáně a určit tak jejich úlohu během patofyziologických dějů probíhajících v nádorovém mikroprostředí a na přechodu zdravé a nádorové tkáně. Dále probíhalo vyšetřování protinádorové buněčné (CD8+, CD4+, CD19+ lymfocytů a NK buněk) a humorální (IgG, IgA, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) imunity vedené snahou ověřit, zda výše zmíněné parametry (koncentrace TGF- β , VEGF a komponenty protinádorové buněčné imunity) souvisí s klinickým stavem pacienta, vývojem onkologického onemocnění či výsledky metody Immunoscore. Smyslem práce pak bylo zjistit, zda lze výše zmíněných imunitních parametrů do budoucna využít jakožto prognostických a prediktivních biomarkerů.

6.1 Hypotéza

1. Pacienti se solidními tumory mají zvýšené koncentrace imunosupresivních cytokinů TGF- β a VEGF v plazmě, což může následně způsobovat defekty v jejich protinádorové imunitě.
2. Přítomnost některých subpopulací T lymfocytů (CD8+) v nádorové tkáni a jejím okolí tvoří přirozenou ochranu organismu a snižuje pravděpodobnost tvorby metastáz primárním tumorem.

6.2 Primární cíle

1. Vyšetření plazmatických koncentrací TGF- β a VEGF u onkologických pacientů se solidním nádorem a srovnání se zdravými jedinci.
2. Vyšetření protinádorové buněčné (CD8+, CD4+, CD19+ lymfocytů a NK buněk) a humorální (IgG, IgA, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) imunity u onkologických pacientů se solidním nádorem a srovnání se zdravými jedinci.
3. Hodnocení přítomnosti tumor infiltrujících lymfocytů v centru nádoru a takzvaném invazivním lemu na přechodu zdravé a nádorové tkáně metodou Immunoscore.

6.3 Budoucí cíle

Stav imunitního systému u onkologických pacientů koreluje s odpovědí na léčbu, rychlostí progresu onemocnění a s jeho prognózou. Potvrdí-li se tato hypotéza, pak bude možno:

1. Navrhnout přesnější klasifikaci nádorových onemocnění doplňující současnou TNM klasifikaci se stanovením rizikových skupin pacientů.
2. Zvolit adekvátní léčebný postup, tj. agresivnější u pacientů s nepříznivými imunologickými parametry (míra infiltrace tumoru specifickými populacemi buněk, změny nebo poruchy buněčné protinádorové imunity, vyšší koncentrace imunosupresivních cytokinů).
3. Monitorovat úspěšnost aplikované terapie, respektive ověřovat účinnost aplikované léčby.
4. Kombinovat současnou standardní terapii s nescifickou imunoterapií (stimulace protinádorové buněčné imunity, stimulace antigen prezentujících buněk, stimulace NK buněk, suprese T regulačních lymfocytů), případně cíleně potlačovat nadprodukcii VEGF i TGF monoklonálními protilátkami.

7 METODIKA

7.1 Skupiny pacientů

Soubor č. 1

Pacienti s lokalizovaným kolorektálním karcinomem

Mezi lednem 2014 a prosincem 2016 bylo na Onkologické klinice 1. LF UK a VFN zařazeno do projektu imunologických vyšetření pacientů se solidními tumory 23 pacientů s kolorektálním karcinomem II. a III. klinického stadia. Pacienti neměli ve své osobní anamnéze žádné jiné onkologické onemocnění nebo závažné komorbidity. Všichni byli léčeni podle národních doporučení (FÍNEK, J. et al., 2017). Jejich základní klinické a patologické charakteristiky jsou uvedeny v tabulce 2. Všichni vstupně podstoupili imunologické vyšetření klinickým imunologem k vyloučení potenciální imunodeficience nebo autoimunitní choroby a byly jim odebrány a zamraženy vzorky séra. Kontrolní skupinu tvořilo 25 zdravých jedinců.

Tab 2: Kolorektální karcinom – základní charakteristika pacientů a zdravých kontrol (soubor č. 1)

	kolorektální karcinom (N = 23)	kontrolní skupina (N = 25)
Věk (roky)		
median	59,6	58,9
≤50	12 (52,2%)	13 (52,0%)
>50	11 (47,8%)	12 (48,0%)
Pohlaví		
muž	14 (60,9%)	15 (60,0%)
žena	9 (39,1%)	10 (40,0%)
Adenokarcinom	23 (100%)	
Klinické stadium^{*)}		
stadium II.	13 (56,5)	-
stadium III.	10 (43,5%)	-
Primární tumor		
Pravostranná lokalizace (cecum, vzestupný tračník, příčný tračník)	1 (4,4%)	-
Levostranná lokalizace (sestupný tračník, sigmoideum, rectosigmoideum)	17 (73,9%)	-
Rectum	5 (21,7%)	-

^{*)} II. a III. klinické stadium spadají do kategorie lokalizovaného kolorektálního karcinomu

Soubor č. 2

Skupina pacientů s karcinomem prsu

V letech 2010 až 2012 bylo na Onkologické klinice 1 LF. UK a VFN sledováno a léčeno 68 pacientek s hormonálně dependentním karcinomem prsu, u kterých se vyvinula rezistence na hormonální terapii. Za pacientky rezistentní k hormonální terapii byly považovány ty, u nichž došlo k relapsu nebo progresi onemocnění při první linii hormonální terapie.

Byl stanoven histologický typ nádoru a stupeň diferenciaci, míra exprese hormonálních receptorů (ER a PR), analýza HER2 a proliferační index. Střední věk 68 vyšetřených dospělých žen s histologicky potvrzeným invazivním karcinomem prsu byl 56 let. Z těchto žen 55 bylo postmenopauzálních (81 %) a 13 premenopauzálních (19 %). Operaci podstoupilo 63 žen. Ablace s exenterací axily byla provedena ve 25 případech, částečná resekce s exenterací axily ve 25 případech a prs šetřící výkon s odběrem sentinelové lymfatické uzliny ve 13 případech. V důsledku inoperabilního nálezu nebo časně generalizace nebylo podrobena operaci 5 žen. Stan klinického stadia onemocnění bylo 36 pacientek diagnostikováno jako I. klinické stadium, 25 jako II. klinické stadium, 5 jako III. klinické stadium a 2 jako generalizované, tedy ve IV. klinickém stadiu. Z histologického hlediska převažoval invazivní duktální karcinom a to v 52 případech. Lobulární karcinom byl diagnostikován v 11 případech a u 5 zbylých pacientek byl diagnostikován karcinom jiného histologického typu. Všechny karcinomy byly hormonálně dependentní, tedy ve všech byly přítomny ER a PR. V 50 případech byla ER pozitivita na více než 50 % buněk. V 16 případech byla pozitivita ER mezi 5 a 50 % a ve 2 případech pod 5 %. Ve 35 případech byly PR pozitivní na více než 50 % buněk. Ve 27 případech byla pozitivita PR mezi 5 a 50 % a v 6 případech potom pod 5 %. Ve všech případech byl HER2 protoonkogen negativní. Všechny pacientky byly v době odběru vzorku krve pro imunologická vyšetření nejméně 2 roky bez chemoterapie. V první linii hormonální terapie bylo 53 žen léčeno tamoxifenem, 14 s nesteroidním inhibítor aromátázy a 1 pacientka steroidním inhibítor exemestanem. Pacientky byly hodnoceny klinickým imunologem, aby se vyloučily imunitní poruchy, jako je alergie, autoimunita nebo imunodeficience. Kontrolní skupinu tvořilo 48 zdravých žen s normálním laboratorním výsledkem v buněčné i humorální imunitě s mediánem věku 53 let. Postmenopauzálních žen bylo v kontrolní skupině 39 a 9 jich bylo premenopauzálních.

U všech pacientek zařazených do výzkumného projektu bylo provedeno komplexní onkologické vyšetření a byl sledován průběh léčby. U pacientek s pokročilým onemocněním, kde nebyl operační výkon možný, byla každé 3 měsíce hodnocena objektivní léčebná odpověď. Pacientky s odoperovaným lokálně pokročilým nádorem byly pravidelně kontrolovány tak, aby byl zachycen eventuální relaps onemocnění.

Tab 3: Ca prsu. – základní charakteristika pacientů a zdravých kontrol (soubor č.2)

	ca prsu (N = 68)	kontrolní skupina (N = 48)
Věk (roky)		
medián	56,0	53,0
premenopauzní	13 (19,0%)	9 (26,4%)
postmenopauzní	55 (81,0%)	39 (73,6%)
Klinické stádium		
I.	36 (52,9%)	-
II.	25 (36,8%)	-
III.	5 (7,4%)	-
IV.	2 (2,9%)	-
Histologie		
invazivní duktální karcinom	52 (76,5%)	-
lobulární karcinom	11 (16,1%)	-
jiné	5 (7,4%)	-
PR pozitivita		
> 50%	50 (73,6%)	-
5–50%	16 (23,5%)	-
< 5%	2 (2,9%)	-

Soubor č. 3

Skupina pacientů s kolorektálním karcinomem vyšetřená metodou Immunoscore

Naše pracoviště bylo zapojeno do multicentrického projektu hodnotícího prognostický význam imunitních buněk v nádorovém mikroprostředí u lokálně pokročilých kolorektálních karcinomů. Od roku 2013 mezinárodní konsorcium 14 onkologických center ve 13 zemích, vedené Společností pro imunoterapii nádorových onemocnění, hodnotilo metodu Immunoscore u pacientů s lokálně pokročilým karcinomem tlustého střeva klasifikovaných dle TNM jako klinické stádium I.-III. Celkem bylo zpracováno 3 539 vzorků nádorové tkáně. Z našeho pracoviště bylo autorem této práce zpracováno 250 vzorků nádorové tkáně. Vzorky nádorů od 3 539 pacientů s odoperovaným karcinomem tlustého střeva klinického stadia I.-III. byly shromážděny mezi lety 2013 až 2015 a statistická data byla získána mezi lety 2013 a 2016. Po kontrole kvality biomarkerů bylo vyřazeno 357 pacientů a po klinické kontrole kvality údajů bylo vyloučeno dalších 577 pacientů. Vzorky od 2681 pacientů byly zahrnuty do analýz (700 pacientů v tréninkovém souboru, 636 pacientů v interním validačním souboru a 1 345 pacientů v externím validačním souboru). Pacienti byli zařazeni do výcvikové skupiny, interní nebo externí validační skupiny formou nahodilého výběru.

Demografické a klinické charakteristiky pacientů byly dobře vyváženy mezi tréninkovým souborem a validačními soubory. Mužů bylo 1 380 (52 %) a střední věk dosahoval 69 let. Pacientů s kolorektálním karcinomem I. klinického stadia bylo 451 (17 %), 1 434 (54 %) pacientů mělo kolorektální karcinom II. klinického stadia a u 763 (29 %) pacientů byl

diagnostikován kolorektální karcinom klinického stadia III. Průměrný počet vyšetřených lymfatických uzlin byl 18,8 na pacienta. Během sledování nastal u 74 pacientů relaps a 930 pacientů zemřelo. Střední doba sledování u všech pacientů dosáhla 96 měsíců (95% CI 93-100). Střední doba přežití od chirurgického zákroku po smrt z jakékoli příčiny byla 158 měsíců (95% CI 143-171).

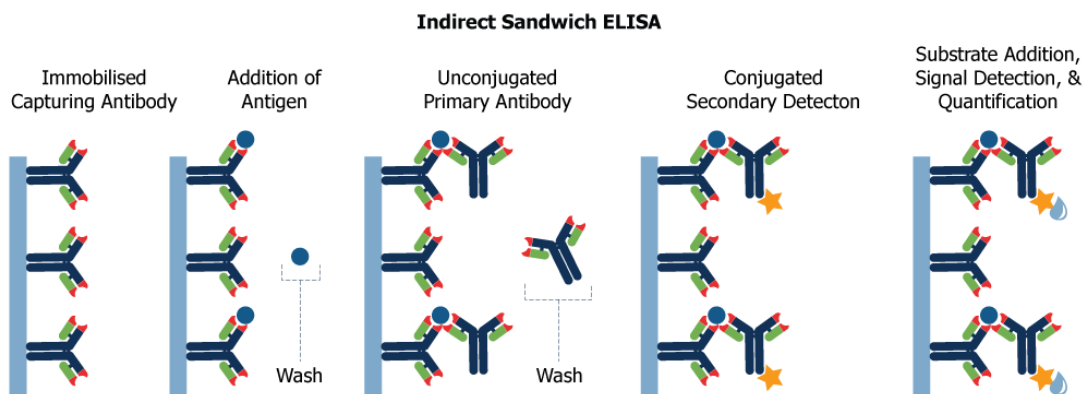
7.2 Laboratorní metody

7.2.1 Vyšetření plazmy onkologických pacientů

Pacienti souboru č. 1 a č. 2 byli vyšetřeni klinickým imunologem k vyloučení poruchy imunity autoimunitního či alergického původu nebo imunodeficiencie. Složky buněčné imunity se u pacientů vyšetřovaly z nesrážlivé krve pomocí průtokové cytometrie s použitím FITC (*fluorescein isothiocyanate*) a PE (*phycoerythrin*) značených monoklonálních protilátek proti CD 16/56+, imunoregulační index CD4+/CD8+ HLA-DR, CD19+ antigenům s použitím příslušných isotypových kontrol. Měření bylo provedeno na průtokovém cytometru FACSCALIBUR od firmy Becton Dickinson. Pomocí průtokové cytometrie byly dále vyšetřeny povrchové markery T-lymfocytů CD3+, CD4+ a CD8+. Stanovení koncentrace cytokinů TGF- β a VEGF v plazmě bylo provedeno modifikovanou metodou ELISA (*enzyme-linked immunoabsorbent assay*) s použitím lidských monoklonálních protilátek proti TGF- β 1 a VEGF.

ELISA – TGF- β

Protilátka proti TGF- β se přes noc naváže na jamky mikrotitrační destičky. Po promytí nenavázaného zbytku protilátky se inkubuje destička s blokovacím roztokem s 1% BSA pro zamezení nespecifických vazeb na povrch jamek destičky. Po promytí se aplikují nařaděné vzorky plazmy nebo séra, ze kterých se naváže lidský TGF- β na protilátky navázané v jamkách. Po propláchnutí jamek následuje další inkubace, kdy dochází k navázání detekční biotinylované kuřecí protilátky na lidské TGF- β . Po odmytí nenavázané detekční protilátky probíhá inkubace s konjugátem (streptavidin-HRP), který se váže na biotin a po dalším promytí proběhne reakce substrátu s křenovou peroxidázou navázaného konjugátu. Substrát v přítomnosti navázaného konjugátu vytváří modrou barvu. Přidáním kyseliny dochází k zastavení reakce a změně barvy na žlutý konečný produkt. Intenzita žlutého zbarvení se měří fotometricky při 450 nm. Intenzita zbarvení je přímo úměrná koncentraci TGF- β přítomného ve vzorku.



Obr 9: Nepřímá sendvičová ELISA

Tato metoda používá nekonjugovanou protilátku navázanou na komplex protilátka-antigen v jamce mikrotitrační destičky. Následující protilátky vázané na antigen jsou cíleny konjugovanou sekundární detekční protilátkou. Detekce signálu se následně provádí po přidání substrátu. (Rockland antibodies and assays, dostupné na: <https://rockland-inc.com/elisa.aspx>, dne 28. 1. 2020).

ELISA – VEGF

Protilátka proti VEGF se přes noc naváže na jamky mikrotitrační destičky. Po promytí nenavázaného zbytku protilátky se inkubuje destička s blokovacím roztokem s 1% BSA pro zamezení nespecifických vazeb na povrch jamek destičky. Po promytí se aplikují naředěné vzorky plazmy nebo séra, ze kterých se naváže lidské VEGF na protilátky navázané v jamkách. Po promytí jamek následuje další inkubace, kdy dochází k navázání detekční biotinylované kuřecí protilátky na lidské VEGF. Po odmytí nenavázané detekční protilátky probíhá inkubace s konjugátem (streptavidin-HRP), který se váže na biotin a po dalším promytí proběhne reakce substrátu s křenovou peroxidázou navázaného konjugátu. Substrát v přítomnosti navázaného konjugátu vytváří modrou barvu. Přidáním kyseliny dochází k zastavení reakce a změně barvy na žlutý konečný produkt. Intenzita žlutého zbarvení se měří fotometricky při 450 nm. Intenzita zbarvení je přímo úměrná koncentraci VEGF přítomného ve vzorku.

Značení povrchových znaků imunitních buněk pro měření průtokovým cytometrem

Buněčná suspenze se označí nejčastěji pomocí monoklonálních protilátek (mAb) s navázanou fluorescenční molekulou (fluorochromem). Molekuly monoklonální protilátky se specificky vážou na antigeny na povrchu nebo uvnitř vyšetřovaných buněk. Suspenze takto označených buněk se vloží do průtokového cytometru, kde je přetlakem stříkána skrz malý otvor (trysku). Tím se vytvoří tenký proud suspenze, v němž letí buňky za sebou (jsou tedy uspořádány jako korálky na niti, neboť pro správnou analýzu není vhodné, aby se dvě buňky ocitly vedle sebe). Tento proud protíná laserový paprsek. Jakákoliv částice v suspenzi způsobí, že laserové světlo se od ní „odrazí“ (tím více, čím je částice více granulovaná) a rozptýlí (tím více, čím je částice větší), což je důsledkem Tyndallova jevu. Jsou-li na částici

navázány molekuly fluorochromů, které se mohou použitým laserovým zářením excitovat, následně vyzáří ještě takzvané fluorescenční světlo. Takto probíhá primární získávání dat (akvizice).

Díky současnému použití různých monoklonálních protilátek s různými fluorochromy můžeme vyšetřit současně přítomnost několika antigenů v každé buňce. U každé buňky zaznamenávají detektory 2 optické parametry (*Side scatter* – SSc, „odražené“ světlo a *Forward scatter* – FSc, vyjadřující rozptyl do velmi malého dopředného úhlu) a dále ještě obvykle nejméně 2 parametry vyjadřující fluorescenci na různých vlnových délkách. Všechny tyto parametry se zaznamenávají do počítače ve formě matice. Tato matice (zvaná *listmode data*) se uchovává v počítači pro analýzu. Následná analýza umožňuje hledat vztah mezi libovolnými měřenými parametry. Nejčastěji měřenými parametry je počet buněk exprimujících danou molekulu, příp. více molekul zároveň. Metodika průtokové cytometrie při barvení buněk s fluorescentním barvivem, které je konjugováno s monoklonálními protilátkami, umožňuje určit přítomnost povrchových znaků. Tyto cytoplazmatické znaky jako tzv. diferenciační znaky (*Clusters of Differentiation* – CD) umožňují určovat specifické buněčné subpopulace – například CD4+ T lymfocyty značené monoklonální protilátkou proti znaku CD4+ na jejich povrchu.

7.2.2 Vyšetření nádorového mikroprostředí

Metoda Immunoscore

Pro analýzu obrazu a kvantifikaci hustoty CD3+ a CD8+ antigenů T lymfocytů v centru nádoru i v jeho invazivním okraji byl použit software digitální patologie. Patologové ze všech zúčastněných center vybrali od každého pacienta jeden nádorový bloček, který obsahoval primární tumor kolorektálního karcinomu. Dva řezy nádorové tkáně šíře 4 μm byly zpracovány pro imunohistochemické vyšetření podle daného protokolu, doporučeného referenčním centrem (v Evropě se jedná o nemocnici Georges Pompidoua, Paříž, Francie). Digitální obrazy obarvených tkáňových řezů byly získány při 20násobném zvětšení a rozlišení 0,45 $\mu\text{m}/\text{pixel}$. Hustoty CD3+ a CD8+ antigenů T lymfocytů v nádorové tkáni a invazivním okraji byly určeny použitím speciálně vyvinutého modulu Immunoscore, který byl začleněn do systému obrazové analýzy a softwaru Developer XD digitální patologie (Definiens, Mnichov, Německo). Byl sledován průměr a rozdělení intenzity zbarvení imunohistochemicky označených T lymfocytů, aby bylo dosaženo vnitřní kvalitní kontroly každého snímku. Hustoty CD3+ a CD8+ T lymfocytů v nádorové tkáni a invazivním lemu byly porovnávány s těmi, jež byly získány v instruktážních ("tréninkových") a validačních skupinách, a byly převedeny na percentily. Byl vypočítán průměr 4 proměnných (dva markery, dvě oblasti), který se převedl do škály zvané Immunoscore.

Ve třístupňové analýze Immunoscore byla definována hustota antigenů T lymfocytů 0-25 % jako nízká, hustota mezi 25 a 70 % byla zaznamenána jako střední a hustota mezi 70 a 100 % jako vysoká. Ve dvoukategorální Immunoscore analýze byla hustota 0-25 % zaznamenána jako nízká a hustota mezi 25 a 100 % jako střední a vyšší. Biomarkerové referenční centrum optimalizovalo protokoly pro imunohistochemické vyšetření a poslalo je do středisek s řadou kontrolních vzorků. Byla tolerována maximální odchylka intenzity barvení o 20 % (v porovnání se vzorky zaslanými referenčním centrem). Aby bylo dosaženo dobré úrovně konzistence imunohistochemického vyšetření mezi centry, referenční centrum napsalo a každému zúčastněnému centru distribuovalo uživatelskou příručku. Tento manuál popsal model Immunoscore softwaru a ilustroval (s 38 příklady), jak vybrat jednotlivé oblasti tumoru určené ke kvantifikaci T lymfocytů. Model Immunoscore byl k dispozici tak, aby každé centrum mohlo analyzovat svou vlastní skupinu pacientů. Referenční centrum na konci studie validovalo každý případ tak, aby byla zajištěna kvalita a intenzita barvení. Pokud chyběly výsledky z oblasti nádorové tkáně nebo pokud byla intenzita barvení nízká, byly vzorky vyloučeny z analýzy. Stav mikrosatelitové instability (MSI) byl stanoven pro pacienty, od kterých bylo k dispozici dostatečné množství materiálu. Genomová DNA byla extrahována z parafínem zalitého nádorového bločku a stav MSI byl hodnocen molekulárním panelem Bethesda a imunohistochemicky (s použitím protilátek MLH1, MSH2, MSH6 a PMS2). Pacienti s dysfunkční opravou chybných párů DNA byli označováni za mikrosatelitově nestabilní (MSI).

Zkoumány byly rovněž analytické schopnosti metody Immunoscore. Software byl použit ke stanovení průměrných intenzit barvení každého sklíčka, což umožnilo posoudit spolehlivost každého barvení a vyhnout se zkreslenému vyhodnocení celkového počtu buněk. Toto měření zajistilo vysokou úroveň (>80 %) shodného hodnocení imunohistochemického barvení mezi centry v souboru kontrolních sklíček. Celkově byla střední hustota CD3+ lymfocytů v centrální části nádoru 693 buněk na mm² a v jeho invazivním okraji 1 169 buněk na mm² a současně hustota CD8+ lymfocytů 241 buněk na mm² v centrální části tumoru a 435 buněk na mm² v invazivním okraji.

Vybrané snímky tkáně barvené na CD 3+ a CD 8+ (N=36) z pěti center v Belgii, Kanadě, Číně, Francii a USA (reprezentující celou kohortu) byly analyzovány patologi z osmi různých center. Byla potvrzena reprodukovatelnost stanovení buněčných hustot v každé oblasti nádoru ($r=0,97$ pro nádor; $r=0,97$ pro invazivní okraj; $p < 0,001$). Reprodukovatelnost výsledků a prognostický význam metody Immunoscore byly porovnány se zavedeným vizuálním stanovením hustoty T lymfocytů infiltrujících nádory přímo v nádorové tkáni barvené hematoxylinem a eozinem. Za tímto účelem bylo určeno 11 pozorovatelů a hodnoceno 268 reprezentativních případů z tréninkové kohorty. Pouze ve 4 % případů zde byla nalezena shoda mezi všemi pozorovateli a naproti tomu úplná absence shody se

projevila v 45 % případů, zatímco při použití metody Immunoscore bylo dosaženo 88% shody mezi pozorovateli. V 48 % případů pak byl zjištěn nesoulad ve výsledcích stanovení lymfocytárních infiltrátů metodou Immunoscore a hustotou TILs stanovenou vizuálním hodnocením. Obecně byla kvantifikace lymfocytárních infiltrátů metodou Immunoscore vysoce standardizovaná, reprodukovatelná a spolehlivá.

7.3 Statistická analýza

Vyšetření periferní krve

Pro statistickou analýzu byl použit program Graph Pad Software Inc. verze 8.0. Vzájemné vztahy mezi proměnnými byly získány pomocí Spearmanova neparametrického testu a rozdíly mezi proměnnými byly stanoveny pomocí Mann-Whitneyho U-testu. Statistické srovnání variací uvnitř a mezi jednotlivci bylo provedeno pomocí jednosměrné analýzy rozptylu (ANOVA).

Metoda Immunoscore

Externí statistici (DJS, F-SO, JPM) provedli statistické analýzy pomocí SAS verze 9.3. Klinicko-patologické charakteristiky byly deskriptivně porovnávány napříč tréninkovými, interními validačními a externími validačními skupinami pacientů, dle vhodnosti byla provedena porovnání testy Kruskal-Wallis a χ^2 . Souvislost Immunoscore s časem do události byla hodnocena stratifikovaným logrank testem a Coxovým modelem proporcionálních rizik. Zúčastněná centra byla použita jako stratifikační faktory a proměnnými upravenými v multivariačních modelech byly věk, pohlaví, velikost primárního tumoru, počet postižených lymfatických uzlin a stav mikrosatelitové stability. Prediktivní přesnost Immunoscore byla vyhodnocena integrovanou oblastí pod křivkou ROC (iAUC). Výkonnost modelů predikce rizik byla srovnána s použitím hodnoty p .

8 VÝSLEDKY

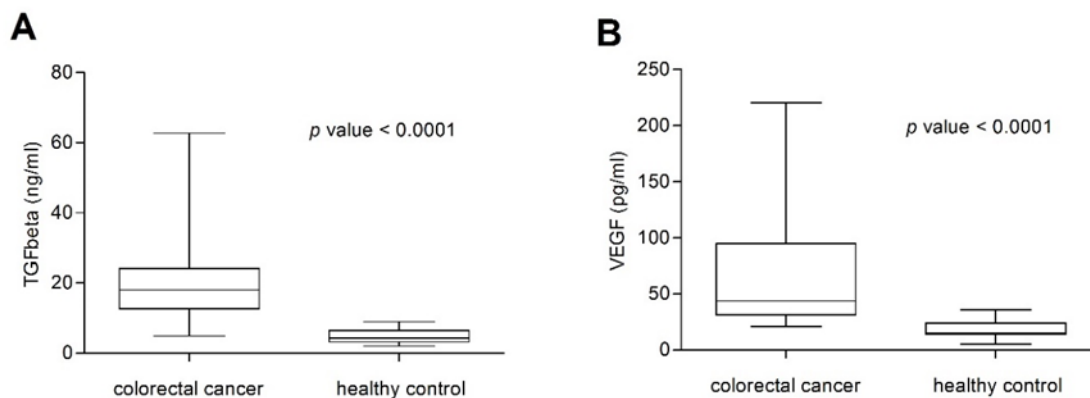
8.1 Výsledky vyšetření pacientů s lokalizovaným kolorektálním karcinomem (soubor č. 1)

Sérové koncentrace TGF- β a VEGF u pacientů s lokalizovaným kolorektálním karcinomem

Sérová koncentrace TGF- β ve skupině pacientů s kolorektálním karcinomem (N=23) byla $19,5 \pm 2,3$ ng/ml (průměr, standardní odchylka) a byla signifikantně zvýšena ve srovnání s koncentrací $4,9 \pm 0,5$ ng/ml ve zdravé kontrolní skupině (N=25) ($p < 0,001$). Ve skupině s kolorektálním karcinomem nebyl významný rozdíl v koncentracích mezi pohlavím (muži vs. ženy), věkovými skupinami (do 60 let a více než 60 let v době diagnózy), částí tlustého střeva postižené primárním nádorem (levá strana, pravá strana a konečník) nebo klinickým stadiem (stadium I. a II. vs. III.). Mezi pacienty ve stadiu II. (N=13) a stadiem III. (N=10) nebyl statisticky významný rozdíl ($21,2 \pm 3,8$ ng/ml a $17,3 \pm 2,1$ ng/ml, $p = 0,828$). Je však důležité zdůraznit nízký počet pacientů v obou skupinách.

Sérová koncentrace VEGF ve skupině pacientů s kolorektálním karcinomem (N=23) byla $68,0 \pm 11,6$ pg/ml (průměr, standardní odchylka) a byla významně zvýšena ve srovnání se $17,5 \pm 2,2$ pg/ml ve zdravé kontrolní skupině (N=25) ($p < 0,001$). Ve skupině s kolorektálním karcinomem nebyl v plazmatických koncentracích VEGF žádný významný rozdíl pohlavími (muži vs. ženy), částí tlustého střeva postižené primárním nádorem (levá strana, pravá strana a konečník) nebo klinickým stádiem nádoru (stadium I. a II. vs. III.). U pacientů mladších 60 let ve srovnání s pacienty staršími více než 60 let v době diagnózy byl statisticky významný rozdíl v sérových hladinách VEGF ($p = 0,049$). Mezi pacienty ve stadiu II. (N=13) a stadiem III. (N=10) nebyl statisticky významný rozdíl ($64,0 \pm 12,8$ pg/ml (průměr, standardní odchylka) a $73,1 \pm 20,5$ ng/ml; $p = 0,975$).

Ve zdravé kontrolní skupině nebyl významný rozdíl v sérových koncentracích TGF- β a VEGF mezi pohlavími (muži vs. ženy) a věkovými skupinami (do 60 let a více než 60 let).



Obr 10: Výsledky koncentrací imunosupresivních cytokinů u pacientů s lokálně pokročilým kolorektálním karcinomem

Porovnání koncentrací cytokinů TGF- β a VEGF u pacientů s kolorektálním karcinomem (CRC) s kontrolní skupinou: A) porovnání koncentrací TGF- β u pacientů s CRC ve srovnání s kontrolní skupinou; B) srovnání koncentrací VEGF u pacientů s CRC ve srovnání s kontrolní skupinou

Vyšetření buněčné imunity pacientů s lokalizovaným kolorektálním karcinomem

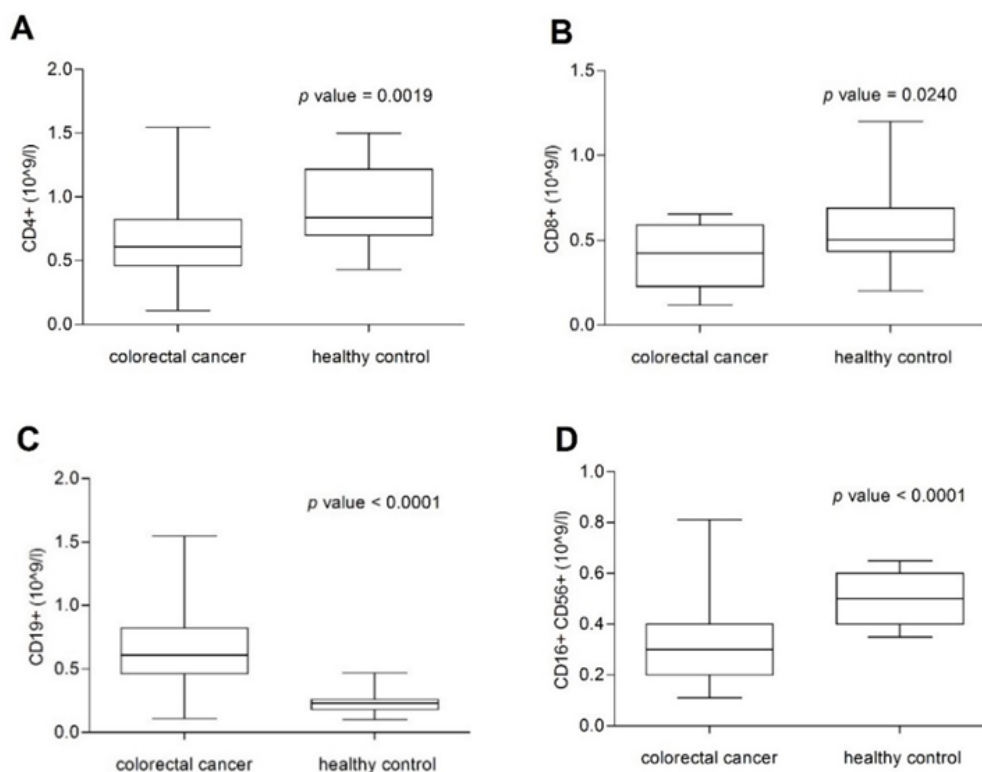
Absolutní počet periferních CD4+ T lymfocytů ve skupině pacientů s kolorektálním karcinomem (N=23) byl $0,65 \pm 0,62 \times 10^9/l$ a byl významně snížen ve srovnání s $0,95 \pm 0,5 \times 10^9/l$ ve zdravé kontrolní skupině (N=25) ($p=0,002$). Ve skupině s kolorektálním karcinomem nebyl žádný významný rozdíl mezi pohlavími (muži vs. ženy), věkem (do 60 let a více než 60 let v době diagnózy), částí tlustého střeva postižené primárním nádorem (levý tračník, pravý tračník a konečník) nebo klinickým stadiem (stadium I. a II. vs. III.). Mezi pacienty v klinickém stadiu II. (N=13) a ve stadiu III. (N=10) nebyl statisticky významný rozdíl v CD4+ lymfocytech ($0,69 \pm 0,10 \times 10^9/l$ a $0,61 \pm 0,07 \times 10^9/l$; $p=0,877$).

Absolutní počet periferních CD8+ T lymfocytů ve skupině s lokálně pokročilým kolorektálním karcinomem (N=23) byl $0,39 \pm 0,04 \times 10^9/l$ a byl významně snížen ve srovnání s $0,58 \pm 0,05 \times 10^9/l$ ve zdravé kontrolní skupině (N = 25) ($p=0,0240$). Ve skupině pacientů s karcinomem nebyl žádný významný rozdíl mezi věkem (do 60 let a více než 60 let v době diagnózy), částí tlustého střeva postižené primárním nádorem (levý tračník, pravý tračník a konečník) nebo klinickým stadiem nádoru (I. a II. vs. III.). U mužů byl rozdíl v sérových hladinách CD8+ lymfocytů oproti ženám ($0,48 \pm 0,05 \times 10^9/l$ oproti $0,33 \pm 0,05 \times 10^9/l$, $p=0,034$). Mezi pacienty klinického stadia II. (N=13) a klinického stadia III. (N=10) nebyl statisticky významný rozdíl v koncentracích CD8+ T lymfocytů ($0,38 \pm 0,05 \times 10^9/l$ a $0,39 \pm 0,06 \times 10^9/l$, $p=0,877$).

Absolutní počet CD19+ B lymfocytů ve skupině s lokálně pokročilým kolorektálním karcinomem (N=23) byl $0,65 \pm 0,62 \times 10^9/l$ a byl významně zvýšen ve srovnání

s $0,95 \pm 0,50 \times 10^9/l$ ve zdravé kontrolní skupině (N=25) ($p < 0,001$). Ve skupině pacientů s karcinomem nebyl významný rozdíl mezi pohlavími (muži vs. ženy), věkovými skupinami (do 60 let a více než 60 let v době diagnózy), částí tlustého střeva postižené primárním nádorem (levý tračník, pravý tračník a konečník) nebo klinickým stadiem nádoru (stadia I. a II. vs. III.). Mezi pacienty v klinickém stadiu II. (N=13) a stadiu III. (N=10) nebyl statisticky významný rozdíl v lymfocytech CD19+ ($0,17 \pm 0,03 \times 10^9/l$ a $0,15 \pm 0,02 \times 10^9/l$; $p = 0,780$).

Absolutní počet CD16+ CD56+ buněk ve skupině s lokálně pokročilým kolorektálním karcinomem (N=23) byl $0,51 \pm 0,01 \times 10^9/l$ a byl signifikantně zvýšen ve srovnání s $0,33 \pm 0,04 \times 10^9/l$ ve zdravé kontrolní skupině (N=25) ($p < 0,001$). Ve skupině pacientů s karcinomem nebyl žádný významný rozdíl mezi pohlavími (muži vs. ženy), částí tlustého střeva postižené primárním nádorem (levý tračník, pravý tračník a konečník) nebo klinickým stadiem nádoru (stádia I. a II. vs. III.). U pacientů ve věku do 60 let v době diagnózy byl rozdíl v sérových koncentracích CD16+ CD56+ ($0,26 \pm 0,02 \times 10^9/l$ a $0,41 \pm 0,07 \times 10^9/l$; $p = 0,041$). Mezi pacienty ve stadiu II. (N=13) a ve stadiu III. (N=10) nebyl statisticky významný rozdíl ($0,37 \pm 0,06 \times 10^9/l$ a $0,28 \pm 0,04 \times 10^9/l$; $p = 0,291$).



Obr 11: Srovnání absolutních hodnot imunitních buněk periferní krve u pacientů s kolorektálním karcinomem (CRC) s kontrolní skupinou

- A) srovnání absolutní hodnoty CD4+ T lymfocytů u pacientů s CRC ve srovnání s kontrolní skupinou;
 B) porovnání absolutní hodnoty CD8+ T lymfocytů u pacientů s CRC ve srovnání s kontrolní skupinou;
 C) srovnání absolutní hodnoty B lymfocytů u pacientů s CRC ve srovnání s kontrolní skupinou;
 D) porovnání absolutní hodnoty NK buněk u pacientů s CRC ve srovnání s kontrolní skupinou

Ve zdravé kontrolní skupině nebyl významný rozdíl v sérových koncentracích TGF- β a VEGF mezi pohlavími (muži vs. ženy) ani věkovými skupinami (do 60 let a více než 60 let).

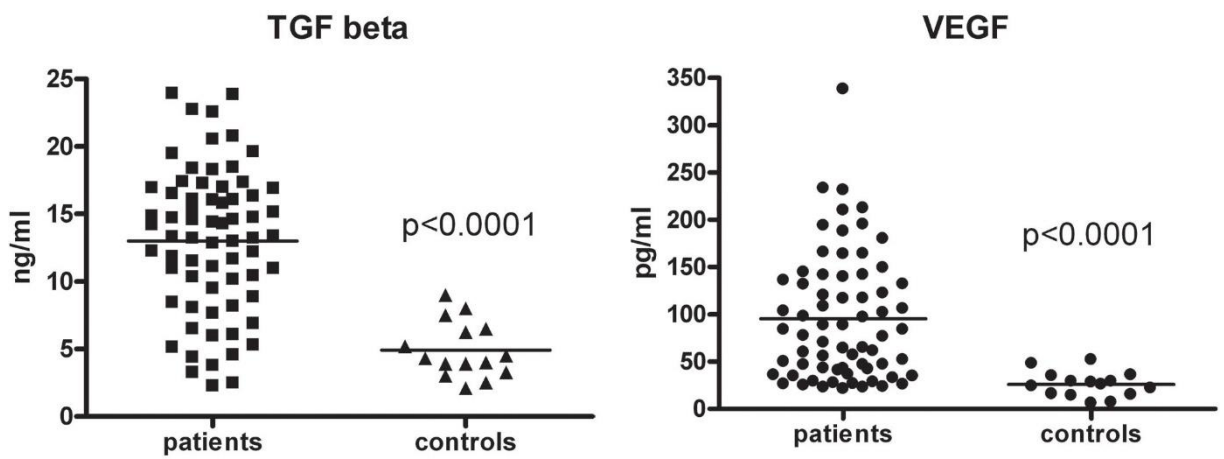
8.2 Výsledky vyšetřování pacientek s karcinomem prsu (soubor č. 2)

Sérové koncentrace TGF- β a VEGF

Ve skupině 68 pacientek s hormonálně rezistentním karcinomem prsu byly plazmatické koncentrace TGF- β ve srovnání se zdravými kontrolami signifikantně zvýšeny. U pacientek byly koncentrace TGF- β $13,02 \pm 5,36$ ng/ml (průměr, standardní odchylka) ve srovnání s kontrolní skupinou $4,93 \pm 2,08$ ng/ml. Mezi oběma skupinami byl signifikantní rozdíl ($p < 0,001$). U pacientek byly koncentrace TGF- β $13,34 \pm 0,65$ ng/ml (medián, standardní odchylka) ve srovnání s kontrolou $4,3 \pm 0,54$ ng/ml.

Plazmatická koncentrace VEGF byla signifikantně zvýšena u pacientek s karcinomem prsu rezistentním na hormonální terapii. Koncentrace VEGF byly $95,35 \pm 66,41$ pg/ml (průměr, standardní odchylka) ve srovnání s kontrolní skupinou $25,8 \pm 13,4$ pg/ml. Mezi oběma skupinami byl signifikantní rozdíl ($p < 0,001$). U pacientek byly zjištěny zvýšené koncentrace VEGF $80,6 \pm 8,05$ pg/ml (medián, standardní odchylka) ve srovnání s kontrolou $26,00 \pm 3,45$ pg/ml.

Plazmatické koncentrace VEGF a TGF- β byly u pacientek s karcinomem prsu rezistentním k hormonální terapii ve srovnání se zdravými kontrolami statisticky signifikantně zvýšené ($p < 0,001$).



Obr 12: Výsledky koncentrace imunosupresivních cytokinů u pacientek s hormonálně dependentním karcinomem prsu

Koncentrace cytokinu TGF- β byla v plazmě pacientek s karcinomem prsu ve srovnání s kontrolní skupinou významně zvýšena ($p < 0,0001$). Koncentrace cytokinu VEGF v plazmě pacientů s karcinomem prsu byla ve srovnání s kontrolní skupinou významně zvýšena ($p < 0,0001$).

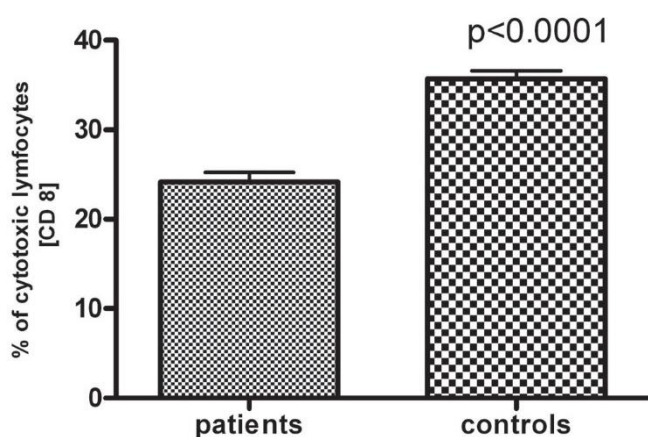
Vyšetření buněčné imunity pacientek s hormonálně dependentním karcinomem prsu

Zjistili jsme signifikantní pokles v protinádorové imunitě zprostředkované buňkami, zejména nižší hodnoty CD8+ T lymfocytů (cytotoxické efektorové buňky).

U pacientek s karcinomem prsu rezistentním na hormonální terapii bylo procentuální zastoupení CD8+ T lymfocytů ve srovnání s kontrolní skupinou $24,2 \pm 8,7$ % versus $35,7 \pm 3,7$ % (průměr, standardní odchylka). Mezi oběma skupinami byl signifikantní rozdíl ($p < 0,001$). U pacientek s karcinomem prsu byla snížena procentuální hodnota CD8+ T lymfocytů $24,0 \pm 1,1$ % ve srovnání s kontrolou $36,0 \pm 1,0$ % (medián, standardní odchylka). Minimální hodnota zastoupení CD8+ T lymfocytů byla u pacientek 12 %, a u kontrolní skupiny 30 %. Maximální hodnota zastoupení CD8+ T lymfocytů v plazmě u pacientek byla 46 % a u kontrolní skupiny 42 %.

U pacientek s karcinomem prsu rezistentním k hormonální terapii bylo procentuální zastoupení B buněk $11,4 \pm 5,1$ % (průměr, standardní odchylka) ve srovnání s kontrolní

skupinou $14,5 \pm 2,4$ %. Minimální procentuální zastoupení B lymfocytů v plazmě u pacientek bylo 2 % oproti 11 % u kontrolní skupiny. Maximální hodnota procentuálního zastoupení B lymfocytů v plazmě pacientek byla 11 %, zatímco u kontrolní skupiny 20 %.



Obr 13: Výsledky koncentrace cytotoxických T lymfocytů u pacientek s hormonálně dependentním karcinomem prsu

Procentuální zastoupení cytotoxických T lymfocytů (CD8+) bylo u pacientek s karcinomem prsu ve srovnání s kontrolní skupinou významně sníženo.

Vyšetření humorální imunity pacientek s hormonálně dependentním karcinomem prsu

U humorální imunity došlo k významnému poklesu koncentrací imunoglobulinů převážně v podtřídě IgG4.

Koncentrace IgG4 u pacientek s karcinomem prsu byly $0,73 \pm 1,36$ U/ml (průměr, standardní odchylka) ve srovnání s kontrolní skupinou $1,15 \pm 0,25$ U/ml. Mezi oběma skupinami byl signifikantní rozdíl ($p < 0,001$). Maximální koncentrace IgG4 měřená v plazmě pacientek byla 11,0 U/ml a u kontrolní skupiny 1,4 U/ml. Minimální koncentrace IgG4 měřená v plazmě u pacientek byla 0,02 U/ml a kontrolní skupiny 0,66 U/ml. U 90 % pacientek se vyskytly příznaky imunodeficience, např. opakované infekce horních cest dýchacích, infekce močových cest a herpetické infekce. V 50 % případů byly zjištěny sérologické příznaky aktivních a chronických chlamydiových infekcí. V periferní krvi byly přítomny anamnestické protilátky proti viru *herpes zoster* ve 4,3 % a proti *borrelia burgdorferi* v 34,5 % případů.

8.3 Výsledky projektu Immunoscore (soubor č. 3)

Primárním cílovým parametrem bylo vyhodnotit prognostickou hodnotu Immunoscore vyjádřenou dobou do návratu nemoci, definovanou jako čas od chirurgického zákroku do recidivy onemocnění. Dalším parametrem bylo celkové přežití (doba od operace do úmrtí pacienta v důsledku jakékoli příčiny).

Signifikantní pozitivní korelace byla zjištěna mezi hustotami CD3+ a CD8+ antigenů T lymfocytů v každé nádorové oblasti a celkovým přežitím pacientů v tréninkovém souboru (n=700). Z této skupiny pacientů mělo 155 (22 %) nízké Immunoscore, 357 (51 %) pacientů střední Immunoscore a 188 (27 %) pacientů mělo vysoké Immunoscore. Pacienti s vysokým Immunoscore měli nejnižší riziko recidivy. Recidiva onemocnění do 3 let byla pozorována u 10 pacientů (5 %) s vysokým Immunoscore, u 58 pacientů (17 %) se středně pokročilým Immunoscore a u 42 pacientů (26 %) s nízkým Immunoscore. Poměr rizik [HR] u pacientů s vysokým Immunoscore vs. nízkým Immunoscore 0,20 [95% CI 0,10-0,38; $p < 0,001$].

Podobné výsledky byly zjištěny u upraveného modelu (HR pro vysoké vs. nízké Immunoscore 0,25 [95% CI 0,13–0,48; $p < 0,001$]) pro přežití bez onemocnění a celkové přežití. Nejdélší přežití měli opět pacienti s vysokým Immunoscore. Přežití po dobu 3 let bylo zaznamenáno u 164 (87 %) pacientů s vysokým Immunoscore, u 305 (85 %) pacientů se střední hodnotou Immunoscore a u 117 (76 %) pacientů s nízkým Immunoscore. Přežití v průběhu 5 let bylo zaznamenáno u 155 (82 %) pacientů s vysokým Immunoscore, u 274 (77 %) pacientů s intermediárním Immunoscore a u 94 (62 %) pacientů s nízkým Immunoscore. V tréninkovém souboru byl také zjištěn signifikantní rozdíl v čase do recidivy u pacientů s Immunoscore s vysokou a střední hodnotou HR 0,38 [95% CI 0,21-0,70; $p=0.001$] oproti pacientům s nízkou hodnotou Immunoscore. Rozdělení pacientů dle Immunoscore pouze do dvou kategorií umožnilo identifikaci pacientů se zřetelným klinickým výsledkem pro dobu do návratu onemocnění, přežití bez onemocnění a rovněž celkové přežití.

Tyto výsledky byly potvrzeny v interním i externím validačním souboru. Pacienti s nejvyšším Immunoscore měli nejnižší riziko recidivy. Recidiva po 3 letech byla v interním validačním souboru zaznamenána u 10 pacientů (6 %) s vysokým Immunoscore, u 31 pacientů (10 %) s intermediárním Immunoscore a u 33 pacientů (20 %) s nízkým Immunoscore ($p < 0,001$).

Rekurence onemocnění po 3 letech byla v externím validačním souboru zaznamenána u 42 pacientů (14 %) s vysokým Immunoscore, u 104 pacientů (24 %) se střední hodnotou Immunoscore a u 85 pacientů (36 %) s nízkým Immunoscore (HR pro vysoké vs. nízké Immunoscore 0,36 [95% CI 0,24-0,53; $p < 0.001$]). Podobné výsledky byly získány s upravenými modely.

Příznivý prognostický význam vysokého Immunoscore byl také potvrzen pro přežití bez onemocnění a celkové přežití v interních a externích validačních souborech ($p < 0,05$). Při rozvrstvení do dvou kategorií Immunoscore měli pacienti s vysokými stupni Immunoscore také významně prodloužený čas do recidivy, celkové přežití a přežití bez onemocnění, a to jak v tréninkové kohortě, interní validační kohortě, tak i v externích

souborech validace ($p < 0,05$). Dvě nezávislé kohorty (interní a externí validační soubory) tak potvrdily zjištění z první kohorty (tréninkový soubor).

U pacientů s nádory ve II. stádiu ($N=1\,434$) bylo vysoké Immunoscore spojeno s nejnižším rizikem recidivy, nejdelším přežitím bez onemocnění a nejdelším celkovým přežitím ($p < 0,05$). Recidiva po 3 letech byla zaznamenána u 23 pacientů (6 %) s vysokou hodnotou Immunoscore, u 73 pacientů (11 %) s intermediárním Immunoscore a u 77 pacientů (20 %) s nízkým Immunoscore. Recidiva po 5 letech byla pozorována u 31 pacientů (8 %) s vysokým Immunoscore, 95 pacientů (14 %) s intermediárním Immunoscore a 91 pacientů (23 %) s nízkým Immunoscore (HR pro vysoké vs. nízké hodnoty Immunoscore 0,33 [95% CI 0,21-0,52; $p < 0,001$]).

Příznivý prognostický význam vysokého Immunoscore přetrvával v přítomnosti rizikových faktorů, jako např. nádorových embolů (tj. pacienti s venózní embolií, lymfatickou invazí nebo perineurální invazí).

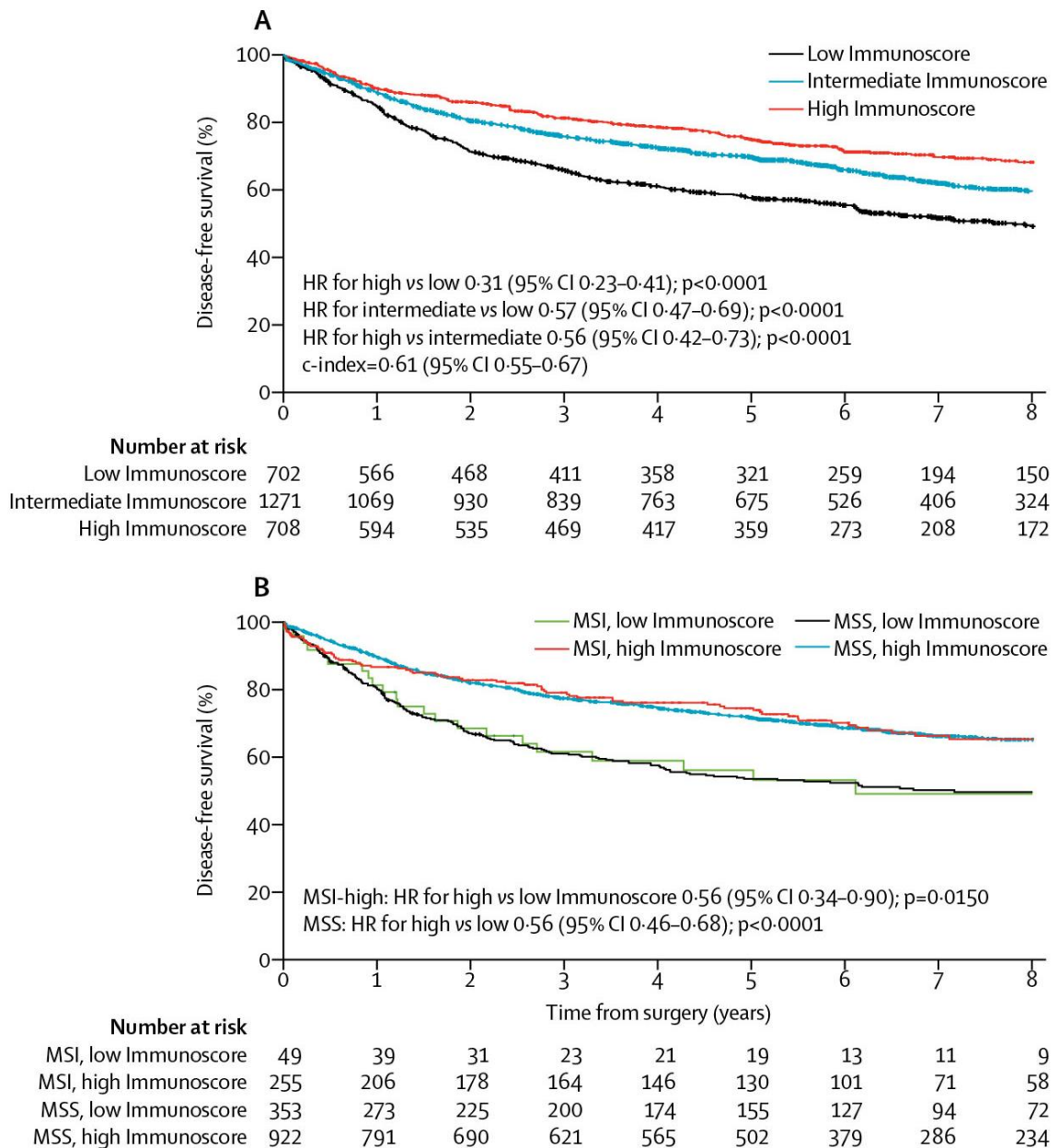
Výsledky multivariační analýzy ($n=2\,681$) ukázaly, že Immunoscore je silný prediktor pro dobu do recidivy, celkové přežití a přežití bez onemocnění ($p < 0,001$). Pětileté přežití bez onemocnění bylo zaznamenáno u 428 pacientů (75 %) s vysokým Immunoscore, 688 pacientů (70 %) s intermediárním Immunoscore a 271 pacientů (57 %) s nízkým Immunoscore.

Data ukázala, že metoda Immunoscore je platná na různých kontinentech (HR pro vysoké vs. nízké immunoscore pro čas do recidivy v Severní Americe 0,13 [95% CI 0,05-0,30; $p < 0,001$]; Asii 0,19 [0,04-0,83; $p=0,027$] a v Evropě 0,31 [0,22-0,43; $p < 0,001$]).

Do analýzy stavu MSI bylo zahrnuto 1 579 vzorků. Při rozvrstvení do tří kategorií Immunoscore byly tumory MSI asociovány s vysokým Immunoscore v 138 (45 %) z 304 případů, zatímco vysoké Immunoscore bylo pozorováno u 273 z 1 275 pacientů s MSS nádory (21 %). Při rozvrstvení do dvou kategorií Immunoscore měli pacienti s vysokým Immunoscore prodloužené přežití bez onemocnění, čas do návratu onemocnění a celkové přežití, bez ohledu na jejich mikrosatelitní stav (HR pro vysoký vs. nízký Immunoscore v MSI-high 0,56 [95% CI 0,34-0,90; $p=0,015$] a HR pro vysoké vs. nízké Immunoscore v MSS 0,56 [0,46-0,68; $p < 0,001$]).

Navíc pacienti se slabě infiltrovanými MSI tumory neměli ve srovnání s pacienty s MSS nádory výhodu přežití. V multivariačním stratifikovaném Cox modelu, který kombinuje stav MSI s Immunoscore, zůstal MSI významným faktorem pro dobu do recidivy, ale nebyl významným faktorem pro přežití bez onemocnění a celkové přežití a byl závislý na Immunoscore. Příznivý efekt MSI statutu proto souvisel především s jeho schopností

navodit silnou imunitu (tj. vysoké Immunoscore). Podobné výsledky byly zjištěny při analýze Immunoscore a MSI u pacientů s nádory II. klinického stadia.

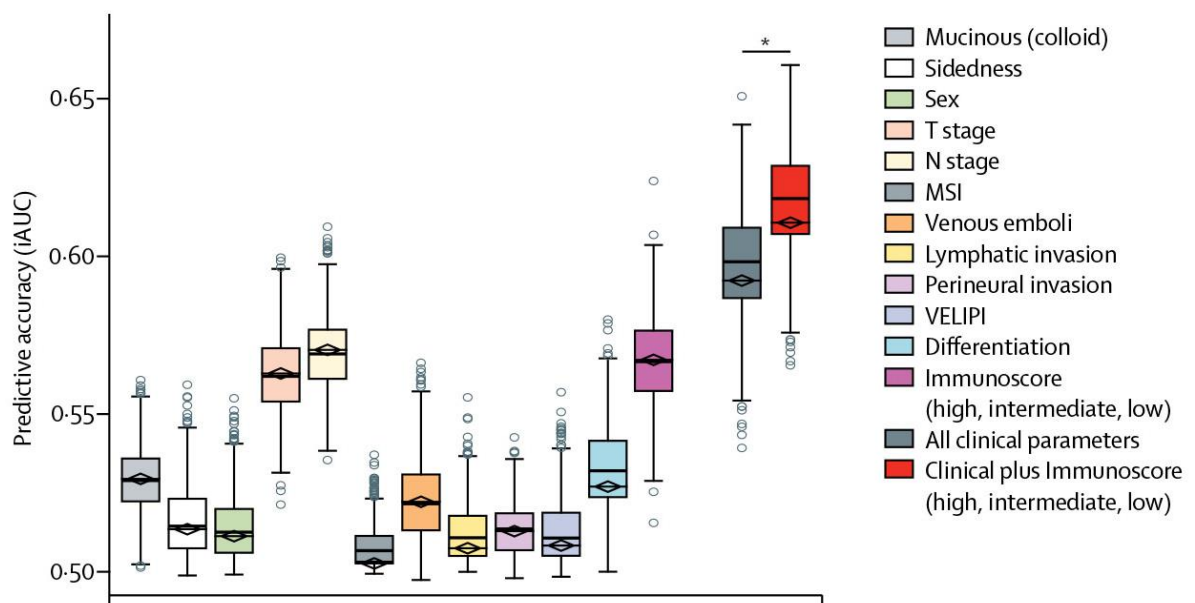


Obr 14: Kaplan-Meierovy křivky přežití bez onemocnění

(A) Kaplan-Meierovy křivky přežití bez choroby podle Immunoscore u všech pacientů s karcinomem tlustého střeva klinického stadia I.-III. (B) Přežití bez choroby podle hodnoty Immunoscore a MSI u 1 579 pacientů se známým stavem MMR. Pětileté přežití: 56% (95% CI 43–73) u pacientů s nízkým Imunoscore a MSI (zelená křivka), 75% (69–80) u pacientů s vysokým Imunoscore a MSI (červená křivka), 53% (48–59) pro pacienty s nízkým Imunoscore a MSS (černá křivka) a 72% (69–74) pro pacienty s vysokým Imunoscore a MSS (modrá křivka).

MSI = mikrosatelitní nestabilita. **MMR** = mutátorové geny. **MSS** = stabilní mikrosatelit (PAGES, F. et al. 2018)

Významným rizikovým parametrem bylo klinické stadium dle TNM klasifikace, zatímco všechny ostatní existující rizikové parametry nádoru neměly výraznější prognostický význam. Ze všech klinických parametrů spadajících pod kategorii rizikové faktory se ukázalo, že Immunoscore jasně dominovalo se 47% přesností predikce ohledně prognózy pacienta, následovala TNM klasifikace s 28 %, stupeň diferenciace (15 %), pohlaví (<3 %), mucinózní histologie a MSI status. Výsledky multivariační analýzy celkového přežití pomocí TNM klasifikace ukázaly, že TNM klasifikace a Immunoscore představují významné rizikové faktory pro celkovou prognózu pacienta s lokálně pokročilým kolorektálním karcinomem.



Obr 15: Rizikové faktory pro kolorektální karcinom

Prognostický význam Imunoscore ve srovnání s klinicko-patologickými parametry, včetně AJCC / UICC TNM klasifikace (PAGES, F. et al. 2018).

9 DISKUZE

Od počátku 20. století se předpokládá, že infiltrace nádoru buňkami imunitního systému je pozitivním faktorem pro onkologického pacienta (MACCARTY, W. et al., 1921), nicméně tyto poznatky neměly dříve významnější vliv na klasifikaci maligních onemocnění ani pro klinické rozhodování o dalším terapeutickém postupu a už vůbec nebylo zřejmé, zda a jakým konkrétním způsobem ovlivňují biologické chování samotných nádorových buněk.

Terapeutické možnosti a rozhodování o léčbě onkologických pacientů jsou v současné době založeny na výsledcích histopatologického vyšetření a na klasifikaci rozsahu onkologického onemocnění dle TNM klasifikace. Ačkoli se tato klasifikace ukázala jako velmi cenná při posouzení prognózy pacienta a dalšího vývoje nemoci, stále poskytuje velmi omezené informace. Důvodem je skutečnost, že nikterak nepopisuje vlastnosti konkrétních nádorových buněk či charakter nádorového mikroprostředí, a tedy ani míru agresivity daného tumoru a z toho vyplývající reálné riziko recidivy či generalizace.

Interakce mezi imunitní odpovědí, konkrétním typem maligního onemocnění a léčebnou strategií pravděpodobně spoluvytvářejí charakter nádorového mikroprostředí a zde přítomných maligních buněk. Význam imunitní protinádorové buněčné reakce je u každého typu nádorového onemocnění odlišný. Existují silně imunogenní nádory s vysoce denzními lymfocytárními infiltráty, rovněž tak malignity s malým počtem tumor infiltrujících lymfocytů. Proto je aktuální klinická potřeba studií s dostatečným počtem pacientů umožňujících analýzu jednotlivých subpopulací bílých krvinek v nádorovém mikroprostředí a posouzení imunitní odpovědi u jednotlivých nádorových onemocnění.

Řada publikací ukazuje, že maligní buňky mají významnou regulační úlohu nad sousedními buňkami a pravděpodobně tedy i nad přítomnou populací imunitních buněk. Většina maligních buněk nejen že produkuje cytokiny způsobující neoangiogenezi, aby podporovala růst nádoru nad limit velikosti primárního tumoru, který je určován mírou vaskularizace nádorového mikroprostředí (CARMELIET, P. et al., 2011), (POTENTE, M. et al., 2011), ale také aktivuje metabolické pochody, při nichž jsou stromální buňky stimulovány k syntéze velkého množství energetických substrátů, jako jsou laktát či látky ketonové povahy (GALLUZZI, L. et al., 2012), (WITKIEWIZ, A.K. et al., 2012).

Fibroblasty v nádorovém mikroprostředí jsou významnými zdroji mitogenních a proangiogenních faktorů, jako je interleukin 6 (IL-6) či vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF) (RASANEN, K. et al., 2010). Kromě toho maligní buňky buď přímo, nebo prostřednictvím fibroblastů produkují širokou škálu cytokinů včetně TGF- β a IL-10, které vykazují silné imunosupresivní účinky (RABINOWICH, G.A. et al., 2007). Celkově tato pozorování ukazují, že v průběhu nádorového bujení se maligní buňky stávají schopnými přizpůsobit si lokální mikroprostředí takovým způsobem, aby uspokojily své vlastní

metabolické potřeby a zároveň se efektivně bránily imunitnímu systému hostitele. TGF- β ligandy jsou často přítomny v nádorovém mikroprostředí a mohou být produkovány jak vlastními nádorovými buňkami nebo stromálními buňkami, tak i imunitními buňkami asociovanými s nádorem (BIERIE, B. et al., 2006 a 2008). TGF- β je také silným induktorem migrace nádorových buněk, který přispívá ke zvýšené schopnosti tumoru metastazovat (MURAOKA-COOK, R.S. et al., 2005). Zejména v pozdních stádiích nádorového onemocnění je rovnováha mezi pozitivními a negativními vlivy cytokinu TGF- β na progresi tumoru posunuta ve prospěch vlastností podporujících vznik metastáz, protože citlivost buněk na antiproliferativní a proapoptotické účinky chemokinů klesá v důsledku dysfunkce beta receptorů TGF nebo vlastní signalizace TGF- β (LEIVO, T. et al., 1998). TGF- β je tedy jedním z hlavních imunosupresivních faktorů. Navozuje také diferenciaci T regulačních lymfocytů, které potlačují celkovou protinádorovou imunitní reakci. To může vysvětlit korelaci mezi zvýšenými hladinami sérového TGF- β a horší prognózou pacientů s kolorektálním karcinomem (SHIM, K.S. et al., 1999). TGF- β ovlivňuje rovněž hormonální receptory a pravděpodobně se podílí na vzniku hormonální rezistence u pacientek s hormonálně dependentním karcinomem prsu (TODOROVIC-RAKOVIC, N. et al., 2005), (WANG, S.E. et al., 2006). Objevuje se stále více důkazů o tom, že existuje vzájemná komunikace mezi estrogenovými receptory a signalizačními receptory růstových faktorů, jako je inzulinový růstový faktor 1, epidermální růstový faktor (EGF), TGF- α a TGF- β (IGNAR-TROWBRIDGE, D.M. et al., 1995), (THORNE, C. et al., 2003). Lze tedy předpokládat, že estrogény mohou negativně modulovat signalizaci TGF- β v buňkách karcinomu prsu (MALEK, D. et al., 2006), (YOO, Y.A. et al., 2008).

TGF- β zprostředkovává své biologické účinky hlavně prostřednictvím dvou typů receptorů typu serin/threonin kináz, a to receptoru TGF- β I a receptoru TGF- β II s následnou aktivací signální intracelulární dráhy Smad. Po navázání ligandu a dimerizaci TGF- β receptoru I a TGF- β receptoru II jsou proteiny Smad2 a Smad3 regulované receptory fosforylovány a interagují s proteinem Smad4 (MASSAGUE, J. et al., 1998). Tyto aktivované molekulární komplexy se přemísťují do buněčného jádra, kde ovlivňují transkripci genů. Bylo prokázáno, že estrogény inhibují Smad signalizační dráhu aktivací extracelulární regulované kinázy (ERK1/2).

Další molekulou, kterou jsme měřili v rámci našich projektů, je vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF). VEGF je klíčovou molekulou při podpoře růstu nových cév. Ovlivňuje řadu endotelových funkcí zapojených v procesu angiogeneze včetně inhibice apoptózy endotelových buněk, a to zejména za podmínek hypoxie. Takto stimulovaná angiogeneze podporuje růst nádoru a jeho metastazování. Exprese VEGF je navíc stimulována působením řady růstových faktorů, např. růstového faktoru 2 pro fibroblasty nebo transformujícího růstového faktoru beta.

Léčebné preparáty cílené na VEGF molekulu či její receptor vytváří celou skupinou léčiv tlumících jinak přirozenou neoangiogenezi, vycházející z potřeb stále rostoucího nádoru. Jedním z těchto léčiv je bevacizumab (anti-VEGF monoklonální protilátka), který prodlužuje život právě modifikací nádorového mikroprostředí pacientům s metastatickým karcinomem prsu i tlustého střeva, inhibuje neoangiogenezi, a tedy i schopnosti nádoru metastazovat. Wagner ukázal, že přidáním bevacizumabu k chemoterapii u pacientek s metastatickým karcinomem prsu, které absolvovaly hormonální léčbu, se významně prodlužuje doba přežití a čas do progresu (WAGNER, A.D. et al., 2012). Sérová koncentrace VEGF koreluje s prognózou i u pacientů s kolorektálním karcinomem (BAYHAN, Z. et al., 2014) a pokles koncentrací tohoto cytokinu byl pozorován v průběhu chirurgické léčby i chemoterapie (MEHRABANI, D. et al., 2014).

Naše výsledky tato data potvrzují, a navíc ukazují na významné rozdíly mezi sérovými koncentracemi TGF- β a VEGF u onkologických pacientů (s lokálně pokročilým kolorektálním karcinomem a pacientek s hormonálně dependentním karcinomem prsu) a kontrolní skupinou ($p < 0,0001$). Podobné výsledky vykazující vyšší koncentrace cytokinů TGF- β a VEGF byly dříve popsány v mnoha studiích s jinými typy lokalizovaných solidních nádorů (SHEEN-CHEN, S.M. et al., 2001), (SHIM, K.S. et al., 1999). Pravděpodobně v důsledku malého počtu pacientů jsme neprokázali žádné významné rozdíly mezi pacienty v II. klinickém stadiu ve srovnání s pacienty v III. klinickém stadiu.

Cílem vyšetření plazmatických koncentrací selektovaných parametrů buněčné imunity a imunomodulačních cytokinů u pacientek s karcinomem prsu a pacientů s kolorektálním karcinomem (soubor č. 1 a č. 2) bylo posoudit schopnost imunitní odpovědi onkologických pacientů a prognostický význam imunitní odpovědi u daných diagnóz, a to analýzou imunitního systému (zejména CD8+ T lymfocytů). Naše hypotéza byla, že u karcinomu prsu rezistentního na endokrinní terapii a stejně tak i u pacientů s lokalizovaným kolorektálním karcinomem je snížena populace CD8+ lymfocytů, a tím pádem i možnost adekvátní imunitní reakce. Současná hormonální léčba není efektivní u všech pacientek (primární endokrinní rezistence). Původně citlivé nádory mohou dříve nebo později progredovat navzdory této terapii (získaná rezistence), což nevyhnutelně vede k recidivě onemocnění. Identifikace faktorů a biologických příčin odpovědných za vývoj těchto rezistentních stavů jsou proto důležitým diagnostickým a terapeutickým cílem výzkumu v oblasti nádorové imunologie. V našem výzkumném projektu jsme se zaměřili na podskupinu pacientek s karcinomem prsu rezistentních na hormonální terapii, protože u této skupiny pacientek nebyla doposud publikována žádná data o stavu imunitního systému. Nepozorovali jsme žádnou korelaci mezi plazmatickými koncentracemi TGF- β , VEGF a klinickým stadiem nádorového onemocnění, ale to mohlo být způsobeno malým počtem pacientek. V budoucnu by měl být proveden další výzkum týkající se této podskupiny pacientů.

U našich pacientek s rezistencí na hormonální terapii jsme zjistili hlavně defekty buněčné protinádorové imunity – nižší exprese CD8+ (cytotoxické T lymfocyty). Dále jsme změřili zvýšené koncentrace imunosupresivních cytokinů TGF- β a VEGF, stejně tak jako u pacientů s lokálně pokročilým kolorektálním karcinomem. U většiny pacientek byla zjištěna snížená humorální složka imunity, včetně klinických projevů imunodeficiency.

Další studie jsou nezbytné k tomu, aby se ukázalo, zda TGF- β a VEGF mohou být použity pro úpravu individuální terapie u pacientů s hormonálně dependentním karcinomem prsu. Detailní imunologické vyšetření, speciálně zaměřené na stanovení koncentrací TGF- β a VEGF, by mohlo identifikovat rizikovou skupinu pacientů s časnou nebo pozdní rezistencí k hormonální terapii. Pacienti se zvýšenými koncentracemi cytokinů TGF- β nebo VEGF jsou pravděpodobně kandidáty pro intenzivnější dispenzární péči. Pokud by rozsáhlejší studie prokázala nadprodukcí cytokinů TGF- β nebo VEGF maligními buňkami a změny v buněčné imunitě, bylo by pak možno potvrdit tyto cytokiny jako další prognosticko-prediktivní biomarker. Měření plazmatických koncentrací TGF- β a VEGF by tak mohlo sloužit k monitoraci léčebné odpovědi vedle klasických nádorových markerů a jejich elevace případně varovat před rozvojem rezistence na hormonální terapii.

V rámci měření parametrů buněčné imunity v plazmě onkologických pacientů jsme kromě významného snížení CD8+ T lymfocytů pozorovali také snížení lymfocytů, tedy celkového antigenu CD3+ obecně. T lymfocyty s cytotoxickou funkcí (CD8+) jsou vyčerpány a dysfunkční zpravidla v důsledku opakovaných infekcí nebo, jako v tomto případě, chronickou stimulací nádorovými neoantigeny, pravděpodobně také i v důsledku humorálního imunodeficitu v podtřídě IgG4. Je zřejmé, že přítomnost imunitních buněk v periferní krvi je modifikována řadou faktorů a je tedy inducibilní. Bylo prokázáno, že stimulace protinádorové buněčné odpovědi podáním tremelimumabu anti-CTLA4 monoklonální protilátky pacientům s hormonálně dependentním karcinomem prsu byla u většiny pacientů spojena se zvýšenými koncentracemi CD4+ a CD8+ T lymfocytů v periferní krvi (VONDERHEIDE, R.H. et al., 2010).

Ve skupině s kolorektálním karcinomem byly sníženy koncentrace lymfocytů pomocných i cytotoxických (CD4+, CD8+). Tyto výsledky jsou nejpravděpodobněji způsobeny kombinací několika skutečností. Jednak migrací imunitních buněk do nádorové tkáně, ale také vlivem zvýšení imunosupresivních cytokinů. Jedna hypotéza je, že lymfopenie může odrážet stav dysfunkce T lymfocytů vyplývající z imunitního vyčerpání a deplece cytotoxických T lymfocytů, které jsou dysfunkční a mají poté omezenou schopnost uplatňovat svůj protinádorový účinek během protinádorové imunoterapie inhibitory PD-1 (SCHIETINGER, A. et al., 2014).

Regulaci imunitních reakcí ovlivňuje mnoho aspektů vývoje onkologického onemocnění. Bylo prokázáno, že přítomnost T lymfocytů v nádorové tkáni karcinomu prsu představuje prognostický ukazatel pro přežití bez recidivy a celkové přežití pacientek (DE NARDO, D.G. et al., 2011). Existují také důkazy o tom, že odpověď na chemoterapii je částečně regulována těmito lymfocyty. Experimentální studie ukázaly, že B a T lymfocyty mohou vykazovat pronádorovou aktivitu nepřímo ovlivněním bioaktivity myeloidních buněk včetně makrofágů, monocytů a žírných buněk, což má za následek vznik rezistence na endokrinní terapii a následně možná i na vznik metastáz (DE VISSER, K.E. et al., 2005), (AMMIRANTE, M. et al., 2010), (DE NARDOL, D.G. et al., 2011). Zvýšené koncentrace B lymfocytů v plazmě onkologických pacientů byly dříve vysvětlovány inhibicí T buněčně protinádorové imunity (QIN, Z. et al., 1998). Na myších experimentálních modelech byl pozorován pozvolnější růst primárního tumoru u myší, které měly nižší plazmatické koncentrace B lymfocytů doprovázené zvýšenou přítomností T lymfocytů a NK buněk a silnější cytokinovou Th1 odpovědí se zvýšenou cytolytickou reakcí T lymfocytů v nepřítomnosti B buněk (SHAH, S. et al., 2005). Podobné výsledky byly pozorovány v periferní krvi pacientů s karcinomem tlustého střeva v našem souboru č. 1, kde byly B lymfocyty zvýšeny spolu se sníženými hladinami NK buněk, CD4+ a CD8+ lymfocytů. Jedná se pouze o předběžné výsledky malé skupiny pacientů, které budou rozšířeny o výsledky z projektu Immunoscore. Nedávná prezentace prognostického významu a biologické činnosti imunitních buněk v nádorovém mikroprostředí spolu s novým softwarem, hodnotícím obraz a detekujícím jednotlivé buňky v nádorovém mikroprostředí, vedly mezinárodní společnost pro imunoterapii nádorových onemocnění k podpoře mezinárodní validace testu Immunoscore (PAGES, F. et al. 2018).

U pacientů s kolorektálním karcinomem v II. klinickém stadiu choroby je obzvláště obtížné rozhodnout, zda má nebo nemá být podána adjuvantní terapie. Mikrosatelitová nestabilita se zdá být dobrým prediktorem přínosu adjuvantní léčby v případě kolorektálního karcinomu II. klinického stadia, ale neposkytuje žádnou prognostickou hodnotu (KIM, J.E. et al., 2017). Nyní bude důležité ověřit standardizovaný Immunoscore test a určit jeho prognostickou hodnotu a predikci odpovědi na chemoterapii v randomizovaných klinických studiích s pacienty, kteří mají II. nebo III. klinické stadium kolorektálního karcinomu a jsou léčeni adjuvantní chemoterapií (např. Studie N0147, International Duration). Další otázkou je, zda mohou být pacienti III. klinického stadia s vysokou hodnotou Immunoscore kandidáty zkrácené adjuvantní chemoterapie (GROTHERY, A. et al., 2018). Tyto studie by mohly poskytnout novou kategorizaci pacientů a modifikovat léčebnou strategii u pacientů s karcinomem tlustého střeva. Ve srovnání s existujícími prognostickými nástroji může být metoda Immunoscore použita k lepší definici prognózy pacientů s kolorektálním karcinomem, lepší identifikaci pacientů

s vysokým rizikem recidivy nádorů (včetně pacientů s karcinomem tlustého střeva II. stádia).

Souhrnná studie Immunoscore představuje díky mezinárodnímu konsorciu největší validující standardizovaný imunitní parametr pro stratifikaci pacientů s nádorovým onemocněním. Metoda Immunoscore měla prognostickou hodnotu lepší než nyní existující a v klinické praxi běžně používané parametry charakterizující nádorové onemocnění. Tato iniciativa a tyto výsledky podporují implementaci metody Immunoscore jakožto nové charakteristiky nádoru pro klasifikaci maligních onemocnění TNM-I (imunitní systém). Pro klasifikaci nádorových onemocnění by to představovalo první standardizovaný imunitní test (PAGES, F. et al., 2018), (BENSON, A.B. et al., 2011), (EMENS, L.A. et al., 2016). Vzhledem k poznatkům a faktům vyplývajícím z dosažených výsledků se naše hypotéza potvrdila.

10 SHRnutí

Tumor infiltrující lymfocyty mají biologický potenciál eradikovat maligní buňky. Přítomnost jednotlivých subpopulací tumor infiltrujících lymfocytů (metoda Immunoscore) souvisí s mírou agresivity tumoru, a tedy i s celkovým přežíváním onkologických pacientů se solidními tumory. Výsledky multivariační analýzy (n=2 681) ukázaly, že Immunoscore je silný prediktor pro dobu do recidivy, celkové přežití a přežití bez onemocnění ($p < 0,001$). Pětileté přežití bez onemocnění bylo zaznamenáno u 428 pacientů (75 %) s vysokým Immunoscore, u 688 pacientů (70 %) s intermediárním Immunoscore a u 271 pacientů (57 %) s nízkým Immunoscore. Data ukázala, že metoda Immunoscore je platná na všech kontinentech. Koncentrace imunosupresivních cytokinů a stavu buněčné protinádorové imunity pravděpodobně korelují i s hustotou lymfocytů přímo v nádorové tkáni.

Immunoscore představuje standardizovaný imunitní parametr pro stratifikaci pacientů s nádorovým onemocněním. Metoda Immunoscore měla prognostickou hodnotu lepší než nyní existující a v klinické praxi běžně používané parametry charakterizující nádorové onemocnění. Tato iniciativa a tyto výsledky podporují implementaci metody Immunoscore jakožto nové charakteristiky nádoru pro klasifikaci maligních onemocnění TNM-I (imunitní systém). Tuto metodu je ovšem vhodné doplnit ještě dalšími parametry, které umožňují dynamické sledování imunitního systému, a proto jsme se zaměřili i na monitoraci cytokinů, humorální a zejména buněčné imunity.

Cílem práce bylo tedy hodnotit plasmatické koncentrace TGF- β a VEGF u onkologicky nemocných ve vztahu k pokročilosti nádorového onemocnění a ve srovnání se zdravou populací, dále vyšetření protinádorové buněčné (CD8+, CD4+, CD19+ lymfocytů a NK buněk) a humorální imunity (IgG, IgA, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) a zjištění, zda výše zmíněné parametry (hladiny TGF- β 1 a VEGF a protinádorová imunita) korelují s klinickým stavem pacienta, vývojem onkologického onemocnění a metodou Immunoscore a zda jich lze využít jako prognostických biomarkerů.

V naší práci jsme popsali, že stav imunitního systému u onkologických pacientů se solidními tumory koreluje s plazmatickými koncentracemi cytokinů TGF- β a VEGF, které mají potenciál modifikovat poměry a funkčnost imunitních buněk v nádorovém mikroprostředí. VEGF a TGF- β by mohly být ve světle těchto výsledků v budoucnosti považovány za prognostický biomarker u pacientů s karcinomem prsu a lokálně pokročilým kolorektálním karcinomem.

Z dlouhodobého pozorování víme, že chronická stimulace imunitního systému (neléčené alergické onemocnění, autoimunitní onemocnění, chronický zánět) způsobuje po určité době jeho vyčerpanost a neschopnost řádně rozpoznat, prezentovat a finálně eradikovat patologické antigeny.

U pacientů s nádorovým onemocněním je obranyschopnost snížena nejen z důvodu samotného nádorového onemocnění, ale právě také z důvodu opakovaných infekcí spojených s imunodeficiencí IgG4. Tato imunodeficiencie je podporována produkcí již zmíněných imunosupresivních faktorů (TGF- β a VEGF).

V případě zjištění vysokých koncentrací TGF- β nebo VEGF v plazmě by měla být doporučena aditivní podpůrná imunoterapie (potlačení nadměrné tvorby VEGF nebo TGF- β) a zaléčení chronického zánětu.

Na základě našich výsledků a zkušeností předpokládáme, že popis a zkoumání základních parametrů imunity u onkologických pacientů by měly tvořit součást standardní onkologické péče. V případě prokázané imunodeficiencie mohou mít pacienti prospěch z imunomodulační terapie podle pokynů používaných v klinické imunologii při léčbě imunopatologických stavů a profitovat z imunomodulační léčby (substituce imunoglobulinů, stimulace imunitních buněk atd.). Tato léčba byla zatím vedena v rámci imuno-onkologické ambulance Onkologické kliniky 1. LF UK a VFN ve spolupráci klinického onkologa a klinického imunologa.

11 ZÁVĚR

Závěrem lze konstatovat následující zjištění.

- 1) Plazmatické koncentrace námi vybraných imunosupresivních cytokinů TGF- β a VEGF jsou u pacientek s hormonálně rezistentním karcinomem prsu a u pacientů s lokalizovaným kolorektálním karcinomem signifikantně zvýšené oproti zdravým kontrolám.
- 2) Vyšetřované parametry buněčné imunity v periferní krvi (CD8+, CD4+ lymfocyty a NK buněk) byly signifikantně sniženy v absolutních i procentuálních hodnotách u pacientů s hormonálně rezistentním karcinomem prsu a u pacientů s lokalizovaným kolorektálním karcinomem oproti zdravým kontrolám.
- 3) Přítomnost cytotoxických T lymfocytů (CD8+) v nádorové tkáni a jejím okolí verifikovaná metodou Immunoscore u pacientů s lokalizovaným kolorektálním karcinomem tvoří přirozenou ochranu organismu, což se projevuje delším přežitím, sníženým rizikem vzniku metastatického postižení a sníženým rizikem recidivy onemocnění.

12 SEZNAM PRACÍ STUDENTA

Články v impaktovaných časopisech

ŠPAČEK, J., VOČKA, M., NETÍKOVÁ, I., et al. Immunological examination of peripheral blood in patients with colorectal cancer compared to healthy controls. *Immunol Investigations*, 2018, 47(7), p. 643-653. doi: 10.1080/08820139.2018.1480030. IF = 2,588

ZÁVADOVÁ, E., VOČKA, M., **ŠPAČEK, J.**, et al. Cellular and humoral immunodeficiency in breast cancer patients resistant to hormone therapy. *Neoplasma*, 2014, 61, p. 90-98. IF = 1,696

PAGES, F., MLECNIK B., MERLIOT, F., et al. International validation of the consensus Immunoscore for the classification of colon cancer: a prognostic and accuracy study. *The Lancet*, 2018, 391, p. 2128-2139. IF = 36,421

Rencezované časopisy v databázi Scopus

ŠPAČEK, J. Gastrointestinální toxicita imunoterapie. *Klinická onkologie*, 2020; 33(1): 23-28. doi: 10.14735/amko202023.

ZÁVADOVÁ, E., **ŠPAČEK, J.** et al., Immunoscore a jeho prediktivní hodnota u kolorektálního karcinomu. *Klinická onkologie*, 2015, 28, Suppl 4, p. 4S82-4S85.

Spoluautor monografií

ZÁVADOVÁ, E. et al., *Onkologická imunologie*. Praha: Mladá fronta, 2015, 320 stran. ISBN 978-80-204-3756-3.

Kapitoly:

- Imunoterapie a cílená léčba u pacientů s kolorektálním karcinomem (str. 156-174)
- Imunoterapie a cílená léčba u nemocných s karcinomem prsu (str. 193-212)

PETRUŽELKA, L. et al., *Nemalobuněčný karcinom plic*. Praha: Farmakon Press, 2016, 128 stran. ISBN 978-80-906589-1-2.

Kapitoly:

- Strategie léčby metastatického onemocnění – skvamózní nemalobuněčné karcinomy plic (str. 81-87)
- Pohled do budoucnosti – personalizovaná medicína, nebo jinak? (str. 120-122)

13 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. AMMIRANTE, M., LUO, JL., GRIVENNIKOV, S., et al. B-cell-derived lymphotoxin promotes astration-resistant prostate cancer. *Nature*, 2010, 464, p. 302–305. <http://dx.doi.org/10.1038/nature08782>.
2. ANGELL, HK., GALON, J. From the immune contexture to the Immunoscore: the role of prognostic and predictive immune markers in cancer. *Curr Opin Immunol*, 2013, 25(2), p. 261–267.
3. BADOUAL, C., HANS, S., RODRIGUEZ, J., et al. Prognostic value of tumorinfiltrating CD4+ T-cell subpopulations in head and neck cancers. *Clin Cancer Res*, 2006, 12, p. 465–472.
4. BACHEM, A., GUTTLER, S., HARTUNG, E., et al. Superior antigen cross-presentation and XCR1 expression define human CD11c + CD141+ cells as homologues of mouse CD8+ dendritic cells. *J Exp Med*, 2010, 207, p. 1273-1281. 10.1084/jem.20100348.
5. BALKWILL, FR., MANTOVAN, A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *The Lancet*, 2001, 357, p. 539–545.
6. BATES, GJ., FOX, SB., HAN, C., et al. Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. *J Clin Oncol*, 2006, 24, p. 5373–5380.
7. BAYHAN, Z., SIMSEK, T., ERGÜL, E., et al. Serum cytokine levels in patients with colorectal cancers according to tumor stages and VEGF gene polymorphism. *Hepatogastroenterology*, 2014, 61(135), p. 1889–1894.
8. BEAVER, JA., PARK, BH. The BOLERO-2 trial: the addition of everolimus to exemestane in the treatment of postmenopausal hormone receptor-positive advanced breast cancer. *Future Oncology*, 2012, 8(6), p. 651–657. doi: 10.2217/fon.12.49
9. BELL, R., BROWN, J., PARMAR, M., et al. Final efficacy and updated safety results of the randomized phase III BEATRICE trial evaluating adjuvant bevacizumab-containing therapy in triple-negative early breast cancer. *Ann Oncol*, 2017, 28(4), p. 754–760. doi: 10.1093/annonc/mdw665
10. BENSON, AB., 3rd, Hamilton, SR. Path toward prognostication and prediction: an evolving matrix. *J Clin Oncol*, 2011, 29, p. 4599–4601.

11. BERGHOFF, AS., FUCHS, E., RICKEN, G., et al. Density of tumorinfiltrating lymphocytes correlates with extent of brain edema and overall survival time in patients with brain metastases. *Oncoimmunology*, 2016, 5, e1.
12. BIDARD, FC., PEETERS, DJ., FEHM, T., et al. Clinical validity of circulating tumour cells in patients with metastatic breast cancer: a pooled analysis of individual patient data. *Lancet Oncol*, 2014, 15(4), p. 406–414.
13. BIERIE, B., MOSES, HL. Tumour microenvironment: TGF[β]: the molecular Jekyll and Hyde of cancer. *Nat Rev Cancer*, 2006. 6, p. 506–520. <http://dx.doi.org/10.1038/nrc1926>
14. BIERIE, B., STOVER, DG., ABEL, TW., et al. Transforming growth factor- β regulates mammary carcinoma cell survival and interaction with the adjacent microenvironment. *Cancer Res*, 2008, 68, p. 1809–1819. <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-5597>.
15. BIRKELAND, SA., LOKKEGAARD, H., STORM, HH., et al. Cancer risk in patients on dialysis and after renal transplantation. *Lancet*, 2000, 355 (9218), p. 1886–1887.
16. BOT, A., MARINCOLA, F., SMITH, KA. Repositioning therapeutic cancer vaccines in the dawning era of potent immune interventions. *Expert Rev Vaccines*, 2013, 12, p. 1219–1234.
17. BROWN, SD., WARREN, RL., GIBB, E., et al. Neo-antigens predicted by tumor genome meta-analysis correlate with increased patient survival. *Genome Res*, 2014, 24, p. 743–750.
18. BUCHBINDER, R., BARBER, M., HEUZENROEDER, et al. Incidence of melanoma and other malignancies among rheumatoid arthritis patients treated with methotrexate. *Arthritis & Rheumatism*, 2008, 59, p. 794–799. doi:10.1002/art.23716.
19. CALLEA, M., GENEGA, EM., GUPTA, M., et al. PD-L1 expression in primary clear cell renal cell carcinomas (ccRCCs) and their metastases. *J Clin Oncol*, 2014, 32, abstr. 467.
20. CARMELIET, P., JAIN, RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*, 2011, 473, p. 298–307.

21. COLE, S., MONTERO, A., GARRET-MAYER, E., et al. Elevated circulating myeloid derived suppressor cells (MDSC) are associated with inferior overall survival (OS) and correlate with circulating tumor cells (CTC) in patients with metastatic breast cancer. *Cancer Res*, 2009, 69(suppl. 24), abstr. 4135.
22. COLEY WB. The treatment of inoperable sarcoma with mixed toxins of erysipelas and bacillus prodigiosus: immediate and final results in one hundred and forty cases. *Proc R Soc Med*, 1910, 3, p. 1–48.
23. COLLIN, M., MCGOVERN, N., HANIFFA, M. Human dendritic cell subsets. *Immunology*, 2013, 140, p. 22–30, 10.1111/imm.12117.
24. CRISTOFANILLI, M., BUDD, GT., ELLIS, MJ., et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med*, 2004, 351(8), p. 781–791.
25. CUNNINGHAM, D., et al. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*, 2004, 351(4), p. 337–345.
26. CURIEL, TJ., COUKOS, G., ZOU, L., et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med*, 2004, 10, p. 942–949.
27. CURTSINGER, JM., LINS, DC., MESCHER MF. Signal 3 determines tolerance versus full activation of naive CD8 T cells: dissociating proliferation and development of effector function. *J Exp Med*, 2003, 197, p. 1141–1151. 10.1084/jem.20021910.
28. DE LEEUW, RJ., KOST, SE., KAKAL, JA., et al. The prognostic value of FoxP3+ tumor-infiltrating lymphocytes in cancer: a critical review of the literature. *Clin Cancer Res*, 2012, 18, p. 3022–3029.
29. DE NARDO, DG., BRENNAN, DJ., REXHEPAJ, E., et al. Leukocyte complexity predicts breast cancer survival and functionally regulates response to chemotherapy. *Cancer Discovery*, 2011, 1, p. 54–67. <http://dx.doi.org/10.1158/2159-8274.CD-10-0028>.
30. DE VISSER, KE., KORETS, LV., COUSSENS, LM. De novo carcinogenesis promoted by chronic inflammation is B lymphocyte dependent. *Cancer Cell*, 2005, 7, p. 411–423. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2005.04.014>.

31. DIECI, MV., CRISTICELLO, C., GOUBAR, A., et al. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes on residual disease after primary chemotherapy for triple negative breast cancer: a retrospective multicenter study. *Ann Oncol*, 2014, 25(3), p. 611–618.
32. DUNN, GP. OLD, LJ., SCHREIBER, RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*, 2004, 21, p. 137–148. doi: 10.1016/j.immuni.2004.07.017
33. DUNN, GP., OLD, LJ, SCHREIBER, RD. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol*, 2004, 22, p. 29–60.
34. EIRÓ, N., PIDAL, I., FERNANDEZ-GARCIA, B., et al. Impact of CD68/(CD3+ CD20) ratio at the invasive front of primary tumors on distant metastasis development in breast cancer. *PLoS One*, 2012, 7, p. e52796.
35. EMENS, LA. It's TIME for a biomarker-driven approach to cancer immunotherapy. *J Immunother Cancer*, 2016, 4, 43.
36. FRIDMAN, WH., PAGES, F., SAUTES-FRIDMAN, C., et al. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer*, 2012, 12, p. 298–306.
37. FUERTES MARRACO SA., GROSJEAN F., DUVAL, A., et al. Novel murine dendritic cell lines: a powerful auxiliary tool for dendritic cell research. *Front Immunol*, 2012, 3, 331, p. 1–25
38. GABRILOVICH, DI., OSTRAND-ROSENBERG, S., BRONTE, V. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat Rev Immunol*, 2012. 12, p. 253–268. doi: 10.1038/nri3175.
39. GALLUZZI, L., KEPP, O., KROEMER, G. Reverse Warburg: straight to cancer. *Cell Cycle*, 2012, 11, 1059. <http://dx.doi.org/10.4161/cc.11.6.19746>
40. GALON, J., ANGELL, HK., BEDOGNETTI, D., et al. The continuum, of cancer immunosurveillance: prognostic, predictive, and mechanistic signatures. *Immunity*, 2013, 39, p. 11–26.
41. GALON, J., COSTES, A., SANCHEZ-CABO, F., et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science*, 2006, 313, p. 1960–1964.

42. GALON, J., MLECNİK, B., BINDEA, G., et al. Towards the introduction of the 'Immunoscore' in the classification of malignant tumours. *J Pathol*, 2014, 232, p. 199–209.
43. GALON, J., PAGES, F., MARINCOLA, FM., et al. The immune score as a new possible approach for the classification of cancer. *J Transl Med*, 2012, 10, 1.
44. GAO, Q., QIU, SJ., FAN, J., et al. Intratumoral balance of regulatory and cytotoxic T cells is associated with prognosis of hepatocellular carcinoma after resection. *J Clin Oncol*, 2007, 25, p. 2586–2593.
45. GIANTONIO, BJ., CATALANO, PJ, MEROPOL, NJ, et al. Bevacizumab in combination with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin (FOLFOX4) for previously treated metastatic colorectal cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200. *J Clin Oncol*, 2007, 25(12), p. 1539–1544.
46. GLOBOCAN 2012. Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. Dostupné z: <http://www.globocan.iarc.fr>
47. GOLDSZMID, RS., DZUTSEV, A., TRINCHIERI, G. Host immune response to infection and cancer: unexpected commonalities. *Cell Host Microbe*, 2014, 15, p. 295–305.
48. GOPALAKRISHNAN, V., et al. Gut microbiome modulates response to anti-PD-1 immunotherapy in melanoma patients. *Science*, 2017, 359(6371) p. 97–103.
49. GROSSO, J., HORAK, CE., INZUNZA, D., et al. Association of tumor PD-L1 expression and immune biomarkers with clinical activity in patients (pts) with advanced solid tumors treated with nivolumab (anti-PD-1; BMS-936558; ONO-4538). *J Clin Oncol*, 2013, 31, abstr. 3016.
50. GROTHEY, A., SOBRERO, AF., SHIELDS, AF., et al. Duration of adjuvant chemotherapy for stage III colon cancer. *N Engl J Med*, 2018, 378, p. 1177–1788.
51. GROTHEY, A., VAN CUTSEM, E., SOBRERO, A., et al. Regorafenib monotherapy for previously treated metastatic colorectal cancer (CORRECT): an international, multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet*, 2013, 381(9863), p. 303–312.
52. GU-TRANTIEN, C., LOI, S., GARAUD, S., et al. CD4+ follicular helper T cell infiltration predicts breast cancer survival. *J Clin Invest*, 2013, 123(7), p. 273–292.

53. HAMID, O., SOSMAN, JA., LAWRENCE, DP., et al. Clinical activity, safety, and biomarkers of MPDL3280A, an engineered PD-L1 antibody in patients with locally advanced or metastatic melanoma (mM). *J Clin Oncol*, 2013, 31, abstr. 9010.
54. HASHIMOTO, D., MILLER, J., MERAD, M. Dendritic cell and macrophage heterogeneity in vivo. *Immunity*, 2011, 35, p. 323–335. 10.1016/j.immuni.2011.09.007.
55. HEPPNER, IB., UNTCH, M., DENKERT, C., et al. Tumor-Infiltrating Lymphocytes: A Predictive and Prognostic Biomarker in Neoadjuvant-Treated HER2-Positive Breast Cancer. *Clinical Cancer Research*, 2016, 22(23), p. 5747–5754. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-2338
56. HERTZ, DL., BARLOW, WE., KIDWELL KM., et al. Fulvestrant decreases anastrozole drug concentrations when taken concurrently by patients with metastatic breast cancer treated on SWOG study S0226. *Br J Clin Pharmacol*, 2016, 81(6), p. 1134–1141. doi: 10.1111/bcp.12904
57. HORI, S., NOMURA, T., SAKAGUCHI, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*, 2003, 299, p. 1057–1061.
58. CHIBA, T., OHRANI, H., MIZOI, T., et al. Intraepithelial CD8+ T-cell-count becomes a prognostic factor after a longer follow-up period in human colorectal carcinoma: possible association with suppression of micrometastasis. *Br J Cancer*, 2004, 91, p. 1711–1717.
59. CHU, CC., ALI, N., KARAGIANNIS, P., et al. Resident CD141 (BDCA3) + dendritic cells in human skin produce IL-10 and induce regulatory T cells that suppress skin inflammation. *J Exp Med*, 2012, 209, p. 935–945. 10.1084/jem.20112583.
60. IGNAR-TROWBRIDGE, DM., PIMENTEL, M., TENG, CT. Cross talk between peptide growth factor and estrogen receptor signaling systems. *Environ Health Perspect*, 1995, 103, p. 35–38.
61. IGYARTO, BZ., KAPLAN, DH. Antigen presentation by Langerhans cells. *Curr Opin Immunol*, 2013, 25, p. 115-119, 10.1016/j.coi.2012.11.007
62. JI, RR., CHASALOW, SD., WANG, L., et al. An immune-active tumor microenvironment favors clinical response to ipilimumab. *Cancer Immunol Immunother*, 2012, 61, p. 1019–1031.

63. KAWAI, O., ISHII, G., KUBOTA, K., et al. Predominant infiltration of macrophages and CD8(+) T Cells in cancer nests is a significant predictor of survival in stage IV nonsmall cell lung cancer. *Cancer*, 2008, 113, p. 1387–1395.
64. KIM, JE., HONG, YS., KIM, HJ., et al. Microsatellite instability was not associated with survival instage III colon cancer treated with adjuvant chemotherapy of Oxaliplatin and infusional 5 – Fluorouracil and Leucovorin (FOLFOX). *Ann Surg Oncol*, 2017, p. 1289–1294. doi:10.1245/s10434-016-5682-5.
65. KLEUSER, B., MALEK, D., GUST, R., et al. 17beta-Estradiol inhibits transforming growth factor-beta signaling and function in breast cancer cells via activation of extracellular signal-regulated kinase through the G protein-coupled receptor 30. *Mol Pharmacol*, 2008, 74, p. 1533–1543. <http://dx.doi.org/10.1124/mol.108.046854>.
66. KROP, IE., LIN, NU., BLACKWELL, K., et al. Trastuzumab emtansine (T-DM1) versus lapatinib plus capecitabine in patients with HER2-positive metastatic breast cancer and central nervous system metastases: a retrospective, exploratory analysis in EMILIA. *Ann Oncology*, 2015, 26(1), p. 113–119. doi: 10.1093/annonc/mdu486
67. LANGENSKIÖLD, M., et al. Increased TGF-Beta1 protein expression in patients with advanced colorectal cancer. *Journal of surgical oncology*, 2008, 97, p. 409–415.
68. LAWRENCE, MS., STOJANOV, P., POLAK, P., et al. Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature*, 2013, 499, p. 214–218.
69. LE, DT., URAM, JN., WANG, H., et al. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N Engl J Med*, 2015, 372, p. 2509–2520.
70. LEFFERS, GOODEN, MJ., DE JONG, et al. Prognostic significance of tumor-infiltrating T lymphocytes in primary and metastatic lesions of advanced stage ovarian cancer. *Cancer Immunol Immunother*, 2009, 58, p. 449–459.
71. LEIVO, T., LEIVO, I., KARINIEMI, AL., et al. Down-regulation of transforming growth factor-beta receptors I and II is seen in lesional but not nonlesional psoriatic epidermis. *Br J Dermatol*, 1998, 138, p. 57–62. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2133.1998.02026.x>.
72. LOGAN – COLLINS, JM. et al. VEGF expression predicts survival in patients with peritoneal surface metastases from mucinous adenocarcinoma of the appendix and colon. *Ann Surg Oncol*, 2008, 15(3), p. 738–744.

73. MACCARTY, W., MAHLE, A. Relation of differentiation and lymphocytic infiltration to postoperative longevity in gastric carcinoma. *J Lab Clin Med*, 1921, 6, p. 473
74. MAISONNEUVE, P., DISALVATORE, D., ROTMENSZ, N., et al. Proposed new clinicopathological surrogate definitions of luminal A and luminal B (HER2-negative) intrinsic breast cancer subtypes. *Breast Cancer Res*, 2014, 16(3), R65.
75. MALEK, D., GUST, R. KLEUSER, B. 17 – Beta-estradiol inhibits transforming-growth-factor-beta-induced MCF-7 cell migration by Smad3-repression. *Eur J Pharmacol*, 2006, 534, p. 39–47. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2006.01.025>.
76. MASSAGUE, J. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem*, 1998, 67, p. 753–791. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.biochem.67.1.753>.
77. MECNIK, B., BINDEA, G., ANGELL, HK, et al. Integrative analyses of colorectal cancer show Immunoscore is a stronger predictor of patient survival than microsatellite instability. *Immunity*, 2016, 44, p. 698–711.
78. MEHRABANI, D., SHAMSDIN, SA., DEHGHAN, A., et al. Clinical significance of serum vascular endothelial growth factor and complement 3a levels in patients with colorectal cancer in southern Iran. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(22), p. 9713–9717.
79. MITTENDORF, EA., PHILIPS, AV., MERIC-BERNSTAM, F., et al. PD-L1 expression in triple-negative breast cancer. *Cancer Immunol Res*, 2014, 2(4), p. 361–370.
80. MLECNIK, B., BINDEA, G., KIRILOVSKY, A., et al. The tumor microenvironment and Immunoscore are critical determinants of dissemination to distant metastasis. *Sci Transl Med*, 2016.
81. MLECNIK, B., TOSOLINI, M. KIRILOVSKY, A., et al. Histopathologic-based prognostic factors of colorectal cancers are associated with the state of the local immune reaction. *J Clin Oncol*, 2011, 29(6), p. 610–618.
82. MLECNIK, B., VAN DE EYNDE, M., BINDEA, G., et al. Comprehensive intrametastatic immune quantification and major impact of immunescore on survival. *J Natl Cancer Inst*, 2018, 110, p. 97–108.
83. MOORE, KW., DE WALL, MR, COFFMAN, RL., et al. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*, 2001. 19, p. 683–765. [10.1146/annurev.immunol.19.1.683](http://dx.doi.org/10.1146/annurev.immunol.19.1.683).

84. MORROW M., WONG, S., VENTA, L. The evaluation of breast masses in women younger than forty years of age. *Surgery*, 1998, 124(4), P. 634–640.
85. MURAOKA-COOK, RS., DUMONT, N., ARTEAGA, CL. Dual role of transforming growth factor beta in mammary tumorigenesis and metastatic progression. *Clin Cancer Res*, 2005, 11, p. 937–943.
86. MÜZES, G., MOLNÁR, B., SIPIS, F. Regulatory T cells in inflammatory bowel diseases and colorectal cancer. *World J Gastroenterol*, 2012, 18, P. 5688–5694.
87. NANDA, R., CHOW, L., DEES, E., et al. A phase Ib study of pembrolizumab (MK-3475) in patients with advanced triple-negative breast cancer. *San Antonio Breast Cancer Symposium*, 2014 Dec 9–13, San Antonio, TX. Abstr S01–09.
88. NOSHO, K., BABA, Y., TANAKA, N., et al. Tumour-infiltrating T-cell subsets, molecular changes in colorectal cancer and prognosis: cohort study and literature review. *J Pathol*, 2010, 222(4), p. 350–366.
89. OGINO, S., NOSHO, K., IRAHARA, N., et al. Lymphocytic reaction to colorectal cancer is associated with longer survival, independent of lymph node count, microsatellite instability, and CpG island methylator phenotype. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(20), p. 6412–6420.
90. OVERMAN, M.J. et al. Nivolumab in patients with metastatic DNA mismatch repair-deficient or microsatellite instability-high colorectal cancer (CheckMate 142): an open-label, multicentre, phase 2 study. *Lancet Oncol*, 2017, S1470-2045(17), p. 30422–30429. doi: 10.1016/S1470-2045(17)30422-9
91. PAGANI, O., FRANCIS, PA., FLEMING, GF., et al. Absolute Improvements in Freedom From Distant Recurrence to Tailor Adjuvant Endocrine Therapies for Premenopausal Women: Results From TEXT and SOFT. *J Clin Oncol*, 2019. doi: 10.1200/JCO.18.01967
92. PAGES, F., BERGER, A., CAMUS, M., et al. Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *N Engl J Med*, 2005, 353(25), p. 2654–2666.
93. PAGES, F., MLECNIK, B., MARLIOT, F., ŠPAČEK, J., et al. International validation of the consensus Immunoscore for the classification of colon cancer: a prognostic and accuracy study. *The Lancet*, 2018, 391, p. 2128–2139.
94. PARDOLL, D. T cells take aim at cancer. *Proc Natl Acad Sci*, 2002, 99 p. 15840–15842.

95. PATEL, SP., et al. PD-L1 Expression as a Predictive Biomarker in Cancer Immunotherapy. *Mol Cancer Ther*, 2015, 14(4), p. 847-56. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-14-0983. Epub 2015 Feb 18.
96. PENG, LS., ZHUANG, Y., SHI, Y., et al. Increased tumor-infiltrating CD8(+)Foxp3(+) T lymphocytes are associated with tumor progression in human gastric cancer. *Cancer Immunol Immunother*, 2012, 61, p. 2183–2192.
97. PEROU, CM., SORLIE, T., EISEN, MB., et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 2000, p. 406.
98. PERRONE, G., RUFFINI, PA., CATALANO, V., et al. Intratumoural FOXP3-positive regulatory T cells are associated with adverse prognosis in radically resected gastric cancer. *Eur J Cancer*, 2008, 44, p. 1875–1882.
99. PETERSEN, RP., CAMPA, MJ., SPERLAZZA, J., et al. Tumor infiltrating Foxp3+ regulatory T-cells are associated with recurrence in pathologic stage I NSCLC patients. *Cancer*, 2006, 107, p. 2866–2872.
100. POTENTE, M., GERHARDT, H., CARMELIET, P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell*, 2011, 146, p. 873–887.
101. QIN, Z., RICHTER, G., SCHÜLER, T., et al. B cells inhibit induction of T cell-dependent tumor immunity. *Nat Med*, 1998, 4, p. 627–630. doi:10.1038/nm0598-627.
102. RABINOWICH, GA., GABRILOVICH, D., SOTOMAYOR, EM. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annu Rev Immunol*, 2007, 25, p. 267–296. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141609>.
103. RASANEN, K., VAHERI, A. Activation of fibroblasts in cancer stroma. *Exp Cell Res*, 2010, 316, p. 2713–2722. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.04.032>.
104. ROONEY, MS., SHUKLA, SA., WU, CJ., et al. Molecular and genetic properties of tumors associated with local immune cytolytic activity. *Cell*, 2015, 160, p. 48–61.
105. RYSKA, M., LANGER, D. Chirurgická léčba kolorektálního karcinomu. *Onkologie*, 2013, 7(4), p. 179–182.
106. ŘÍHOVÁ, B., et al., Imunitní reakce jako spolutvůrce úspěšné protinádorové terapie. *Onkologická imunologie*. In Zavadová, E., et al. *Onkologická imunologie*. Praha: *Mladá fronta*, 2015. p. 15-22, 320 s. ISBN 978-80-204-3756-3.

107. ŘÍHOVÁ, B., ETRYCH, T., ŠÍROVÁ, M. et al. Imunitní reakce jako spolutvůrce úspěšné protinádorové terapie. *Sborník dne prof. Staška*, 2014.
108. SAITO, H. et al. An elevated serum level of transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) significantly correlated with lymph node metastasis and poor prognosis in patients with gastric carcinoma. *Anticancer Research*, 2000, 20(6 B), p. 4489–4493.
109. SAKAGUCHI, S., YAMAGUCHI, T., NOMURA, T., et al. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*, 2008, 133, p. 775–787.
110. SALAMA, P., PHILLIPS, M., GRIEU, F., et al. Tumor-infiltrating FOXP3+ T regulatory cells show strong prognostic significance in colorectal cancer. *J Clin Oncol*, 2009, 27, p. 186–192.
111. SATO, E., OLSON, SH., AHN J., et al. 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*, 2005, USA 102, p. 18538–18543.
112. SHAH, S., DIVEKAR, AA., HILCHEY, SP., et al. Increased rejection of primary tumors in mice lacking B cells: inhibition of anti-tumor CTL and TH1 cytokine responses by B cells. *Int J Cancer*, 2005, 117, p. 574–586. doi:10.1002/ijc.21177.
113. SHAH, W., YAN, X., JING, L., et al. A reversed CD4/CD8 ratio of tumor-infiltrating lymphocytes and a high percentage of CD4(+)FOXP3(+) regulatory T cells are significantly associated with clinical outcome in squamous cell carcinoma of the cervix. *Cell Mol Immunol*, 2011, 8, p. 59–66.
114. SHEEN-CHEN, SM., CHEN, HS., SHEEN, CW., et al. Serum levels of transforming growth factor beta1 in patients with breast cancer. *Arch Surg*, 2001. 136, p. 937–940. doi:10.1001/archsurg.136.8.937.
115. SHEN, Z., ZHOU, S., WANG, Y., et al. Higher intratumoral infiltrated Foxp3+ Treg numbers and Foxp3+/CD8+ ratio are associated with adverse prognosis in resectable gastric cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2010, 136, p. 1585–1595.
116. SHIM, KS., KIM, KH., HAN, WS., et al. Elevated serum levels of transforming growth factorbeta1 in patients with colorectal carcinoma: its association with tumor progression and its significant decrease after curative surgical resection. *Cancer*, 1999 85, p. 554–561. doi:10.1002/(SICI) 1097-0142(19990201)85:3<554:AID-CNCR6>3.0.CO;2-X.

117. SCHIETINGER, A., GREENBERG, PD. Tolerance and exhaustion: defining mechanisms of T cell dysfunction. *Trends Immunol.* 2014, 35, p. 51–60.
118. SCHMID, P., ADAMS, S., RUGO, HS., et al. Atezolizumab and Nab-Paclitaxel in Advanced Triple-Negative Breast Cancer. *New England Journal of Med.* 2018 Nov 29;379(22):2108-2121. doi: 10.1056/NEJMoa1809615. Epub 2018 Oct 20.
119. SIEGAL, FP., KADOWAKI, N., SHODELL, M., et al. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science*, 1999, 284, p. 1835–1837. 10.1126/science.284.5421.1835.
120. SIEMES, C., LOES, EV., COEBERHT, JWW., et al. C-Reactive Protein Levels, Variation in the C-Reactive Protein Gene, and Cancer Risk: The Rotterdam Study. *Journal of Clinical Oncology*, 2006, 24, p. 5216-5222
121. SUMIMOTO, H., IMABAYASHI, F., IWATA, T., et al. The BRAF-MAPK signaling pathway is essential for cancer-immune evasion in human melanoma cells. *J Exp Med*, 2006, 203, p. 1651–1656. doi: 10.1084/jem.20051848,3]
122. SWAIN, S.M., KIM, S.B., CORTÉS, J. et al. Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel for HER2-positive metastatic breast cancer (CLEOPATRA study): overall survival results from a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 study. *Lancet Oncology*, 2013, 14(6), p. 461-471. doi: 10.1016/S1470-2045(13)70130-X
123. Systém pro vizualizaci onkologických dat – SVOD. Dostupné z: <http://www.svod.cz>
124. SZNOL, M., CHEN, L. Antagonist antibodies to PD-1 and B7-H1 (PD-L1) in the treatment of advanced human cancer--response. *Clin Cancer Res*, 2013, 19, p. 5542.
125. TABERNERO, J., VAN CUTSEM, E., LAKOMÝ R., et al. Aflibercept versus placebo in combination with fluorouracil, leucovorin and irinotecan in the treatment of previously treated metastatic colorectal cancer: prespecified subgroup analyses from the VELOUR trial. *Eur J Cancer*, 2014, 50(2), p. 320–331.
126. TABERNERO, J., YOSHINO, T., COHN, AL., et al. Ramucirumab versus placebo in combination with second-line FOLFIRI in patients with metastatic colorectal carcinoma that progressed during or after first-line therapy with bevacizumab, oxaliplatin, and a fluoropyrimidine (RAISE): a randomised, double-blind, multicentre, phase 3 study. *Lancet Oncol*, 2015, 16(5), p. 499–508.

- 127.** TAMAYO, MB., CORNELIO, GH., PATCHEN, ML., et al. A phase Ib/II, dose-escalating, safety, and efficacy study of imprime PGG and cetuximab in patients with advanced colorectal cancer (CRC). *J Clin Oncol*, 2010, 28(suppl 15), e14103.
- 128.** TENG, W.L., NGIOW, S.F., RIBAS, A., et al. Classifying Cancers Based on T-cell Infiltration and PD-L1. *Cancer Res*, 2015, 75(11), p. 2139–45.
- 129.** TEPLINSKY, E., KOMAL, J. Antibody-Drug Conjugates and T-DM1. *Contemporary Oncology*, 2014. [cit. 19.8.2019] Dostupné z: <https://www.onclive.com/publications/contemporary-oncology/2014/february-2014/antibody-drug-conjugates-and-t-dm1>
- 130.** THORNE, C., LEE, AV. Cross talk between estrogen receptor and IGF signaling in normal mammary gland development and breast cancer. *Breast Dis*, 2003, 17, p. 105–114.
- 131.** TODOROVIC-RAKOVIC, N. TGF-beta 1 could be a missing link in the interplay between ER and HER-2 in breast cancer. *Med Hypotheses*, 2005, 65, p. 546–551. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mehy.2005.03.019>
- 132.** TUMEH, PC., HARVIEW, CL., YEARLEY, JH., et al. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature*, 2014, 515, p. 568–571.
- 133.** TWELVES, C., CORTES, J., VAHDAL, L., et al. Efficacy of eribulin in women with metastatic breast cancer: a pooled analysis of two phase 3 studies. *Breast Cancer Res Treat*, 2014, 148(3), p. 553–561. doi: 10.1007/s10549-014-3144-y.
- 134.** VALENZUELA, J., SCHMIDT, C., MESCHER, M. The roles of IL-12 in providing a third signal for clonal expansion of naive CD8 T cells. *J Immunol*, 2002, 169, p. 6842–6849. 10.4049/jimmunol.169.12.6842.
- 135.** VAN ALLEN, EM., et al. Genomic correlates of response to CTLA-4 blockade in metastatic melanoma. *Science*, 2015, 350. p. 207–211.
- 136.** VAN CUTSEM, E., KÖHNE, CH., HITRE, E., et al. Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*, 2009, 360(14), p. 1408–1417.
- 137.** VAN CUTSEM, et al. Open-label phase III trial of panitumumab plus best supportive care compared with best supportive care alone in patients with chemotherapyrefractory metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*, 2007, 25(13), p. 1658–1664.

138. VETIZOU, M., et al., Anticancer immunotherapy by CTLA-4 blockade relies on the gut microbiota. *Science*, 2015, 350, p. 1079–1084.
139. VONDERHEIDE RH, LO RUSSO PM, KHALIL M, GARTNER EM, KHAIRA Tremelimumab in combination with exemestane in patients with advanced breast cancer and treatment-associated modulation of inducible co-stimulator expression on patient T cells. *Clin Cancer Res*, 2010, 16, p. 3485–3494. <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR>.
140. VONDERHEIDE, RH., LORUSSO, PM., KHALIL, M., et al. Tremelimumab in combination with exemestane as novel immunotherapy for patients with advanced breast cancer. *J Clin Oncol*, 2009, 27(suppl), abstr. 3034.
141. VORLICEK, J., HAJEK, R., ADAM, Z. et al. Cílená léčba v onkologii. *Remedia*, 2005, 4–5.
142. WAGNER, AD., THOMSEN, C., HAERTING, J., et al. Vascular-endothelial-growth-factor (VEGF) targeting therapies for endocrine refractory or resistant metastatic breast cancer. *Cochrane Database Syst Rev*, 2012, 7, CD008941.
143. WANG, SE., SHIN, I., WU, FY., FRIEDMAN, DB., et al. HER2/Neu (ErbB2) Signaling to Rac1-Pak1 Is Temporally and Spatially Modulated by Transforming Growth Factor {beta}. *Cancer Res*, 2006, 66, p. 9591–9600. <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-2071>.
144. WHERRY, EJ., et al. T cell exhaustion. *Nature Immunology*, 2011, 12, p. 492–499. doi:10.1038/ni.2035.
145. WITKIEWIZ, AK., WHITAKER-MENEZES, D., DASGUPTA, A., et al. Using the „reverse Warburg effect“ to identify high-risk breast cancer patients: stromal MCT4 predicts poor clinical outcome in triplenegative breast cancers. *Cell Cycle*, 2012, 11, p. 1108–1117. <http://dx.doi.org/10.4161/cc.11.6.19530>.
146. WOLCHOK, JD., KLUGER, H., CALLAHAN, MK., et al. Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. *N Engl J Med*, 2013, 369, p. 122–133
147. WU, AH., YU, MC., TSENG, CC., et al. Epidemiology of soy exposures and breast cancer risk. *Br J Cancer*, 2008, 98(1), p. 9–14.
148. YOO, YA., KIM, YH., KIM, JS., et al. The functional implications of Akt activity and TGF-beta signaling in tamoxifen-resistant breast cancer. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1783, p. 438–447.

149. YOON, HH., ORROCK, JM., FOSTER, NR., et al. Prognostic impact of FoxP3+ regulatory T cells in relation to CD8+ T lymphocyte density in human colon carcinomas. *PLoS One*, 2012, 7, e42274.
150. YOSHIDA, Y., NAITO, M., YAMADA, T., et al. Adoptive chemoimmunotherapy using activated $\alpha\beta$ T cells for stage IV colorectal cancer. *Anticancer Res*, 2016, 36, p. 3741–3746.
151. YOSHINO, T., et al. Results of a multicenter, randomized, double--blind, phase III study of TAS-102 vs. placebo, with best supportive care in patients with metastatic colorectal cancer refractory to standard therapies. *Ann Oncol*, 2014, 25(suppl 2), p. 114.
152. ZAJAC, AJ., BLATTMAN, JN, MURALI-KRISHNA, K., et al. Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. *J. Exp. Med*, 1998, 188, p. 2205–2213. doi:10.1084/jem.188.12.2205.
153. ZAMAI, L., PONTI, C., MIRANDOLA, P., et al. NK cells and cancer. *J Immunol*, 2007, 178, p. 4011–4016.
154. ZÁVADOVÁ E., SAVARY, CA., TEMPLIN, S., et al. Maturation of dendritic cells from ovarian cancer patients. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2001, 48(4), p. 289–296.
155. ZÁVADOVÁ, E., ŠPAČEK, J., et al. Imunoterapie nádorových onemocnění. *Prague ONCO journal*, 2014, p. 35–38.
156. ZÁVADOVÁ, E., VOČKA, M., PETRUŽELKA, L. et al. Cellular and humoral immunodeficiency in breast cancer patients resistant to hormone therapy. *Neoplasma*, 2014, 61(1), p. 90–98.
157. ZITVOGEL, L., et al. The microbiome in cancer immunotherapy: Diagnostic tools and therapeutic strategies. *Science*, 2018, 359, 6382, p. 1366–1370, doi: 10.1126/science.aar6918.

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Časový vývoj incidence (počet nových případů na 100 000 osob) a mortality (počet úmrtí v souvislosti s diagnózou na 100 000 osob) pro diagnózu karcinomu prsu u žen v České republice. ..	32
Graf 2: Časový vývoj zastoupení jednotlivých klinických stadií karcinomu prsu u žen v ČR.	32
Graf 3: Časový vývoj incidence kolorektálního karcinomu (počet nových případů na 100 000 osob) a mortality (počet úmrtí v souvislosti s diagnózou na 100 000 osob) v České republice.	33
Graf 4: Časový vývoj zastoupení jednotlivých klinických stadií kolorektálního karcinomu v ČR.	33

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr 1: Mechanismy protinádorové imunity	13
Obr 2: Tři fáze nádorového imunoeditačního procesu (teorie 3E)	18
Obr 3: Vyčerpané a nefunkční T lymfocyty	19
Obr 4: Mutační nálož u solidních tumorů	22
Obr 5: Imunofenotyp	26
Obr 6: Immunoscore	28
Obr 7: Schematický model účinku monoklonálních protilátek prostřednictvím imunitního systému	39
Obr 8: Mechanismy účinku monoklonálních protilátek proti receptoru HER-2	49
Obr 9: Nepřímá sendvičová ELISA	62
Obr 10: Výsledky koncentrací imunosupresivních cytokinů u pacientů s lokálně pokročilým kolorektálním karcinomem	67
Obr 11: Srovnání absolutních hodnot imunitních buněk periferní krve u pacientů s kolorektálním karcinomem (CRC) s kontrolní skupinou	69
Obr 12: Výsledky koncentrace imunosupresivních cytokinů u pacientek s hormonálně dependentním karcinomem prsu	70
Obr 13: Výsledky koncentrace cytotoxických T lymfocytů u pacientek s hormonálně dependentním karcinomem prsu	71
Obr 14: Kaplan-Meierovy křivky přežití bez onemocnění	74
Obr 15: Rizikové faktory pro kolorektální karcinom	75

SEZNAM TABULEK

Tab 1: Faktory podílející se na malfunkci imunitního systému u onkologických pacientů.....	20
Tab 2: Kolorektální karcinom – základní charakteristika pacientů a zdravých kontrol (soubor č. 1)	58
Tab 3: Ca prsu. –. základní charakteristika pacientů a zdravých kontrol (soubor č.2)	60