

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta**

Neoadjuvantní imunoterapie nádorů

Bakalářská práce

Klára Martínková

Školitel: RNDr. Jan Ženka, CSc.

České Budějovice 2023

Bakalářská práce

Martínková, K., 2023: Neoadjuvantní imunoterapie nádorů. [Neoadjuvant immunotherapy of cancer. Bc. Thesis, in Czech.] – 59 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace

The aim of this bachelor thesis was to summarize knowledge about neoadjuvant immunotherapy and outline its potential in cancer treatment. Attention was paid to the MBTA therapy, which shows extraordinary results. Part of this thesis was also devoted to immunosuppression, which is induced by tumor resection.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích, dne 12. dubna 2023

.....

Klára Martínková

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli panu RNDr. Janu Ženkovi, CSc. za cenné rady, věcné připomínky a věnovaný čas při jeho odborném vedení mé bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat své rodině za podporu během celého studia.

Obsah

1	ÚVOD	1
2	CÍLE PRÁCE	2
3	NÁDOROVÁ ONEMOCNĚNÍ.....	3
3.1	NÁDOROVÉ BUŇKY	3
3.2	PŘÍČINY VZNIKU NÁDORŮ	4
3.3	SIGNÁLY NÁDOROVÉHO ONEMOCNĚNÍ.....	5
3.4	ŠÍŘENÍ NÁDORU	5
4	KLASIFIKACE NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ.....	7
4.1	BENIGNÍ NÁDOR	7
4.2	MALIGNÍ NÁDOR	7
4.2.1	Melanom.....	7
5	IMUNITNÍ SYSTÉM	9
5.1	VROZENÁ (NESPECIFICKÁ) IMUNITA	9
5.2	ADAPTIVNÍ (SPECIFICKÁ) IMUNITA	10
5.3	PROTINÁDOROVÉ IMUNITNÍ MECHANISMY	11
5.3.1	T lymfocyty	12
5.3.2	NK buňky	12
5.3.3	Makrofágy	13
5.3.4	Neutrofily (neutrofilní granulocyty).....	13
5.3.5	Dendritické buňky	14
5.4	ÚNIK NÁDOROVÝCH BUNĚK PŘED IMUNITNÍM SYSTÉMEM.....	14
5.4.1	Imunoeditace nádoru	15
5.4.2	Mechanismy odolnosti nádoru vůči imunitnímu systému.....	16
6	NÁDOROVÁ TERAPIE.....	18
6.1	CHIRURGIE	18
6.2	CHEMOTERAPIE	18
6.3	RADIOTERAPIE	19
6.4	IMUNOTERAPIE.....	19
7	NEOADJUVANTNÍ IMUNOTERAPIE	21
7.1	NAČASOVÁNÍ PODÁNÍ NEOADJUVANTNÍ IMUNOTERAPIE	21
7.2	TYPY NEOADJUVANTNÍ IMUNOTERAPIE.....	22
7.2.1	Monoklonální protilátky	23
7.2.2	Protinádorové vakcíny.....	24
7.2.3	ICIs (Inhibitory imunitních kontrolních bodů).....	24
7.2.4	HIT-IT (Lidská intratumorální imunoterapie).....	28
7.2.5	MBTA imunoterapie	29
7.3	TYPY MALIGNÍCH NÁDORŮ LÉČENÝCH NEOADJUVANTNÍ IMUNOTERAPIÍ.....	34
7.4	NEOADJUVANTNÍ IMUNOTERAPIE V SOUVISLOSTI S JINÝMI LÉČEBNÝMI POSTUPY	35
7.4.1	Imunosuprese vyvolána chirurgickým zákrokem.....	35
7.4.2	Porovnání s neoadjuvantní chemoterapií.....	38
8	NÁVRH EXPERIMENTU S NEOADJUVANTNÍ IMUNOTERAPIÍ MELANOMU (B16-F10)	40
9	DISKUSE.....	41
10	ZÁVĚR	44
11	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	45
12	POUŽITÁ LITERATURA.....	48

1 Úvod

Nové poznatky o vztahu mezi imunitním systémem a nádory udělaly v posledních letech velký pokrok umožňující vývoj imunoterapie, která představuje naději v léčbě rakoviny. Imunoterapie je rychle se rozvíjející léčebná metoda dnešní doby a lze ji považovat za již běžně užívanou metodu při léčbě nádorových onemocnění.

Velký potenciál má zejména neoadjuvantní imunoterapie, která zaujímá stále významnější roli v léčbě nádorových onemocnění. Neoadjuvantní terapii lze chápat jako léčbu podávanou před lokální terapií za cílem usnadnění chirurgického zákroku. V dnešní době je již koncept neoadjuvantní terapie více rozšířen a nabízí více léčebných postupů (Trimble a kol., 1993). Nové imunoterapeutické přístupy se primárně zaměřují na zvýšení imunitní odpovědi proti nádorovým buňkám a zlepšení celkového vyléčení pacienta (Galli a kol., 2020).

Zájem o neoadjuvantní imunoterapii je částečně založen na nedávných preklinických studiích na myších modelech, kdy imunoterapie podána před resekcí nádoru vedla k lepší imunitní odpovědi a dlouhodobému přežití jedince, než stejná terapie podána adjuvantně (Liu a kol., 2016). Preklinické studie svými výsledky poskytly silný impuls pro snahu o zavedení neoadjuvantní imunoterapie do klinických studií.

Složitost interakcí mezi imunitním systémem a nádorovým mikroprostředím představují skutečnou výzvu při snaze vyvinout nové léčebné metody neoadjuvantní imunoterapie. Dosavadní poznatky jsou ovšem důkazem, že se jedná o velmi nadějnou léčebnou terapii, která často dosahuje svými preklinickými studiemi obdivuhodných výsledků.

2 Cíle práce

- Cílem práce je vypracování rešerše známých poznatků týkajících se neoadjuvantní nádorové imunoterapie.
- Vypracování návrhu experimentu s neoadjuvantní nádorovou imunoterapií na myším modelu melanomu (B16-F10).

3 Nádorová onemocnění

Nádorové onemocnění je označení velmi různorodé skupiny chorob, kdy dochází k nekontrolovatelnému růstu a šíření buněk, které se vymykají buněčné kontrole a chovají se jako buňky abnormální (Mathur a kol., 2015). V češtině má toto onemocnění svůj laický název rakovina, pod kterým je také nejvíce známé.

Podle vyhodnocení dostupných mezinárodních dat z roku 2019 je rakovina po kardiovaskulárních onemocněních na druhém místě v počtu úmrtí (Ritchie a kol., 2018).

3.1 Nádorové buňky

Buňky, které byly výše popsány jako abnormální, se nazývají buňky nádorové. Vznikají přeměnou somatických buněk pod vlivem několika různých signálů, např. volných radikálů způsobujících mutaci jejich DNA. Rakovinné buňky bývají považovány za nesmrtelné buňky díky jejich schopnosti se nekonečně dělit a bránit se buněčné smrti nazývané apoptóza (Hegde a kol., 2013).

Pro změny u rakovinných buněk vznikl návrh hovořící o šesti základních fyziologických vlastnostech, které jsou nezbytné při přeměně ze somatických buněk. Mezi tyto vlastnosti patří: soběstačnost v produkci růstových signálů, necitlivost k signálům zastavujícím buněčný cyklus, posílení angiogeneze, invaze do tkání a tvorba metastáz, neomezený replikační potenciál a únik před apoptózou. Pro akumulaci všech těchto vlastností je podmínkou nestabilita genomu (Hanahan & Weinberg, 2000). V roce 2011 byl tento návrh rozšířen o nové vlastnosti. Konkrétně se jednalo o schopnost úniku před destrukcí imunitním systémem, genovou nestabilitu a přítomnost mutací, schopnost změnit energetický metabolismus a vznik zánětu podporující karcinogenezi (Hanahan & Weinberg, 2011). Tento soubor deseti vlastností byl poté rozšířen o senescentní buňky, zpřístupnění fenotypické plasticity, polymorfní mikroby a bezmutační epigenetické přeprogramování. V současné době tedy hovoříme o čtrnácti základních vlastnostech asociovaných se vznikem nádorů. Každá z těchto fyziologických změn představuje svým projevem úspěšné překonání protirakovinného obranného mechanismu, který se vyskytuje ve všech buňkách a tkáních (Hanahan, 2022).

Lidská somatická buňka má omezený počet buněčného dělení, zatímco rakovinná buňka se může obvykle dělit neomezeně. Zkracování telomerů, koncových repetitiv na chromozomech, je důležitým krokem v procesu stárnutí tělních buněk. S každým buněčným dělením dochází ke zkracování telomerů, dokud se buňka nemůže již dále dělit. Rakovinné buňky mají schopnost aktivovat enzym telomerázu fungující jako reverzní transkriptáza, která prodlužuje telomery. Telomeráza udržuje telomery v rakovinných buňkách a tím jim umožňuje se nekonečně dělit a dochází k nádorovému bujení (Shay a kol., 2001).

3.2 Příčiny vzniku nádorů

Nádorová onemocnění nevznikají ze dne na den. Příčinou je akumulace několika změn, které přispívají ke vzniku nádorových buněk. Příčiny vzniku nádorového onemocnění jsou různé, a ne vždy zcela vysvětlené. Na vzniku onemocnění se podílí velké procento faktorů jak vnějších, tak i vnitřních. Mezi hlavní rizikové vnější faktory se řadí tabák, chemikálie, sluneční záření a infekce. Mezi rizikové vnitřní faktory se řadí dědičnost, hormony, imunitní stav a náhodné mutace. Také životospráva jedince patří k jednomu z nejdůležitějších faktorů. Konkrétně se jedná o špatné stravovací návyky spojené s nezdravou stravou a nedostatečnou fyzickou aktivitou, obezitu, stres a znečištěné životní prostředí. Rakovina je nebezpečnou nemocí, právě kvůli schopnosti všech faktorů působit společně na podpoře karcinogeneze v těle (Mathur a kol., 2015). Jednou z příčin vzniku a rozvoje nádorového bujení mohou být také infekční, bakteriální, virová a parazitární onemocnění (Krejsek a kol., 2016).

Pro správné fungování buněk je také důležitá dostupnost všech životně důležitých živin a vhodné množství antioxidantů přijímaných z potravy. Z tohoto poznatku vyplývá, že při nedostatečném přísunu životně důležitých živin dochází ke změnám na buněčné úrovni. Mezi tyto změny patří také schopnost efektivně opravit DNA v těchto buňkách a tím se mohou stát náchylné k přeměně na rakovinné. Lidské tělo je vybaveno antioxidačními obrannými mechanismy, jedním z nich je produkce antioxidačních enzymů. Mezi tyto enzymy patří superoxiddismutáza, glutathionperoxidáza, kataláza a další. Antioxidační obranné mechanismy se snaží zabránit vzniku oxidačního stresu způsobeného volnými radikály, který působí také jako původce nádorových onemocnění (Ames, 2010).

Vznik nádorů neboli karcinogeneze je složitý vícestupňový proces, kdy genetickými změnami dochází k transformaci somatických buněk na buňky nádorové (Hanahan & Weinberg, 2000).

3.3 Signály nádorového onemocnění

Rakovina jako onemocnění způsobuje změny v genomu. Tato znalost vychází z objevu mutací, které se podílejí na vzniku onemocnění a zároveň ho doprovází po celý jeho průběh. Mezi tyto mutace patří např. produkce onkogenů se zesílenou funkcí a potlačená funkce tumor supresivních genů (antionkogeny) (Hanahan & Weinberg, 2000).

Významnými biochemickými indikátory, které upozorňují na přítomnost nádorového onemocnění, jsou nádorové markery (angl. *tumor markers* TM). Jedná se o skupinu velmi různorodých látek, které lze detekovat v krevním séru či jiných tělesných tekutinách pacienta. Obvykle jsou tyto látky produkovány nádorovými buňkami, ale mohou být i produkovány tělem v reakci na nádor (Nagpal a kol., 2016). Stanovení nádorových markerů může poskytnout bližší informace o vlastnostech a chování nádoru, tudíž mohou sloužit k podpoře stanovené diagnózy. Zároveň se jejich monitorování u pacientů běžně používá buď při kontrole průběhu léčby nebo případné recidivy onemocnění. Mezi nádorové markery některých nádorů patří např. CEA (karcino-embryonální antigen), PSA (prostatický specifický antigen) a mnoho dalších (Zima, 2014).

Jedním z biomarkerů je i vysoký poměr cirkulujících neutrofilů k lymfocytům v periferní krvi pacienta. Zvýšený počet neutrofilů může být indikátorem infekce, zánětu nebo právě rakoviny (Shaul a Fridlender, 2019). Dále také přítomnost enzymu telomerázy souvisí s proliferací buněk, to napovídá, že se jedná o rakovinné buňky nebo kmenové buňky. V tělních buňkách se enzym telomeráza vyskytuje také, ale u většiny těchto buněk je v nedetekovatelném množství (Shay & Bacchetti, 1997).

3.4 Šíření nádoru

Šířením rakovinných buněk vně mimo místo jejich vzniku dochází k tvorbě metastáz, ty bývají nejčastější příčinou úmrtnosti pacientů s rakovinou. Tvorba metastáz je

komplikovaný, ale dobře organizovaný proces. Makroskopický útvar vytvořený na metastazovaném místě nazýváme sekundární nádor (Zhang, 2013).

V nekontrolovatelném růstu nemůže nádor pokračovat na původním místě vzniku a brzy dochází k prostorovému omezení, nedostatku živin a nedostatku kyslíku. Rakovinná buňka v tomto případě přechází na anaerobní glykolytickou dráhu, aby vyrobila energii pro přežití i v podmínkách bez kyslíku. Tento jev, kdy nádorová buňka využívá anaerobní mechanismus, je popisován jako Warburgův efekt. Jako reakce na hypoxický stav a další podněty se následně spustí syntézy proteinů umožňující oddělení a následné přesunutí. Celý proces tvorby metastáz a jejich šíření je nazýván souhrnným názvem metastatická kaskáda. Na počátku kaskády dochází k přechodu z epitelu do mezenchymu (EMT), kdy se polarizovaná epiteliální buňka přeměňuje na pohyblivou mezenchymovou buňku. Následně dochází k invazi nádorových buněk přes bazální laminu do krevní cévy, přežití nádorových buněk v krevním řečišti, opuštění krevní kapiláry a vstup do tkáně vzdáleného orgánu, kde dochází k adaptaci a následné proliferaci. V krevním řečišti se nacházejí buňky imunitního systému, před kterými se nádorové buňky dokáží skrývat, a ne vždy jsou odhaleny (Hegde a kol., 2013).

Z klinických pozorování lze podpořit hypotézu, že metastázy bývají přítomny u nádorů starších, které jsou natolik maligní, aby došlo k jejich šíření. Tato skutečnost je opřena i o klinické pozorování léčby některých rakovin v raném stádiu, kdy lze nádor jednodušeji odstranit z důvodu nepřítomnosti metastáz (Zhang, 2013).

Vývoj nádorového onemocnění by se mohl schematicky shrnout do tří postupných fází: iniciace, podpora a progres. Ve fázi iniciace dochází k akumulaci změn v somatických buňkách, které vedou k nevratným buněčným změnám a ty dávají příčinu vzniku nádorových buněk. Podpora je charakterizována jako přežívání a proliferace vzniklých nádorových buněk. V poslední fázi, kterou představuje progres nádoru, dochází k růstu velikosti nádoru, která může nebo nemusí být spojena s tvorbou metastáz (Rakoff-Nahoum, 2006).

4 Klasifikace nádorových onemocnění

V dnešní době je známo více než 100 různých typů nádorových onemocnění. Jejich název bývá obvykle odvozen z místa jejich výskytu nebo podle typu buněk z kterých nádor vznikl (Hanahan & Weinberg, 2000). Nádorové onemocnění bývá obvykle tvořeno makroskopickým útvarem, existují ale i typy jako je např. leukémie, které netvoří nádor (Sudhakar, 2009).

4.1 Benigní nádor

Nádory, které zůstávají v místě svého vzniku, aniž by napadaly jiné části těla, jsou benigní nádory (nezhoubné). Jsou charakteristické pomalým růstem a znatelným ohraničením. Tento typ nádoru nebývá obvykle problematický. Komplikace mohou nastat s jeho zvětšením, kdy mechanickým tlakem ovlivňuje jiné struktury v blízkosti, to může způsobovat bolest nebo jiné zdravotní komplikace. Benigní nádor je možné chirurgicky odstranit, aniž by hrozil jeho opakovaný výskyt. Existují i specifické typy benigních nádorů se schopností přechodu v nádor maligní (potencionálně maligní) (Patel, 2020).

4.2 Maligní nádor

Nejvíce se v této bakalářské práci odkazuje na nádory maligní (zhoubné). Tento typ nádoru působí agresivně vůči okolní tkáni. Je problematický svým nekontrolovatelným růstem a schopností metastázovat. Léčba těchto nádorů bývá náročnější kvůli nepřesnému ohraničení a častým metastázám. Léčba bývá obvykle kombinovaná a vždy záleží na rozšíření rakoviny v těle. V případě časného zachycení se volí obvykle chirurgické odstranění s možnou adjuvantní léčbou. Pokud k rozšíření nádoru došlo, volí se léčba systémová, jako je chemoterapie nebo imunoterapie (Patel, 2020).

4.2.1 Melanom

Proliferací pigmentových buněk, známých jako melanocyty, dochází k utváření maligního melanomu. Jedná se o poměrně běžný maligní nádor, který může mít potenciálně letální průběh. Protože se jedná o nádorové onemocnění pigmentových buněk, postihuje

melanom nejběžněji kůže. Méně častými variantami výskytu jsou např. melanom oční, slizniční a amelanotický (Fikrle & Pizinger, 2010).

Vznik melanomu souvisí s několika genetickými faktory. Největší predispozici k tomuto nádoru mají lidé s bílou barvou kůže, konkrétně se jedná o lidi s fototypem I. Ten je typický velmi světlou kůží, rezavými vlasy, modrýma očima, četnými pihami a silnou reakcí na sluneční záření. Konkrétně UV záření je významným vnějším faktorem způsobujícím tvorbu melanomu (Fikrle & Pizinger, 2010).

4.2.1.1 Melanom B16-F10

Při experimentech, které se uskutečňují za cílem nalezení vhodné léčby nádorů, se používají nejčastěji myší modely metastatického melanomu B16. Podle způsobu podání nádorových buněk myším může jít o experimentální metastatický model nebo spontánní metastatický model. Oba tyto modely jsou vytvořeny injektováním nádorových buněk do syngenních myší, kdy u experimentálního modelu je tomu tak intravenózně, zatímco u spontánního modelu subkutánně (Nakamura a kol., 2002).

Obecně lze melanom B16 popsat jako málo imunogenní nebo až neimunogenní nádor. Z tohoto důvodu je považován za nejlepší k testování různých metod imunoterapie, protože jeho léčba představuje velkou výzvu. Melanom B16-F10 je jedním ze čtyř typů myšího melanomu B16. Buněčná linie B16-F10 se osvědčila svojí agresivitou a schopností metastázovat do plic. V preklinických studiích se tato buněčná linie běžně používá k *in vivo* experimentům (Overwijk a Restifo, 2000; Nakamura a kol., 2002).

5 Imunitní systém

Systém s funkcí udržování homeostázy proti působení nejen vnějších ale i vnitřních škodlivých faktorů je znám jako imunitní systém. Na rozdíl od jiných systémů se nejedná o anatomickou strukturu s přesným ohraničením (Ferenčík a kol., 2004).

V imunitním systému probíhají neustále rozpoznávací reakce, které přispívají k udržování integrity organismu. Tyto rozpoznávací schopnosti umožňují imunitnímu systému vykonávat tři důležité funkce: obranyschopnost, autotoleranci a imunitní dohled. Rozpoznání vnějších škodlivin a patogenních mikroorganismů spolu s jejich toxiny je známo pod pojmem obranyschopnost imunitního systému. Autotoleranci lze chápat jako rozpoznání vlastních tkání organismu, které se následně udržují v toleranci. Poslední funkcí imunitního systému je imunitní dohled neboli obrana organismu před starými, poškozenými, nádorově transformovanými nebo jinak pozměněnými vlastními buňkami (Hořejší a kol., 2017).

Imunitní systém nevynechává ze svého dohledu žádnou část těla organismu, a proto dochází ke značné spotřebě zdrojů za vzniku velkého množství různorodých buněk a molekul. Právě tyto složky imunitního systému jsou zodpovědné za jeho správné fungování v boji proti všem škodlivým faktorům (Nicholson, 2016). Imunitní systém se dělí na dva základní obranné subsystémy, mezi kterými dochází k neustálým interakcím. Jde o vrozenou a adaptivní imunitu, které se liší podle míry jejich specifičnosti. U obou typů imunity jsou přítomny složky jak humorální, tak buněčné (Marshall a kol., 2018; Hořejší a kol., 2017).

5.1 Vrozená (nespecifická) imunita

Nespecifické imunitní mechanismy založené na předem připravených molekulách a buňkách v organismu tvoří tzv. vrozenou imunitu, která je známa i pod názvem přirozená imunita. Při imunitní reakci se na potřebné místo dostanou nejdříve buňky vrozené imunity, tím představuje vrozená imunita první obranný mechanismus po setkání s antigenem. K imunitní reakci dochází během několika minut po detekci patogena v organismu. Rychlá odezva je jednou z předních vlastností vrozené imunity. Protože se jedná o nespecifickou imunitu, spoléhá vrozená imunita na nižší výběr receptorů, než je tomu u adaptivní imunity (Hato a Dagher, 2015; Turvey a Broide, 2010).

Klíčovou roli hrají buňky vrozeného imunitního systému i při aktivaci a řízení reakcí adaptivní imunity (Janeway a kol., 2001).

Buněčné složky nespecifické imunity se skládají z fagocytujících buněk (makrofágy, monocyty, neutrofilů, eozinofilů), antigen prezentujících buněk (např. dendritické buňky) a buněk přirozených zabíječů (NK buňky). Mezi humorální složky vrozeného imunitního systému patří např. interferony (IFN), přirozené protilátky, pentraxiny a soubor zhruba 30 sérových a membránových proteinů, který se označuje komplement. Nedílnou součástí vrozené imunity jsou i epiteliální buňky vykonávající hned několik důležitých funkcí. Jednou z těchto funkcí je produkce cytokinů a chemokinů (Hořejší a kol., 2017; Hato a Dagher, 2015). Právě cytokiny a chemokiny jsou schopné vyvolat zánět. Na místo zánětu se jako první dostaví neutrofilů s makrofágy a až po aktivaci antigenem se dostaví i složky adaptivní imunity. Schopnost vrozené imunity vyvolat zánět lze tedy považovat za jednu z nejpodstatnějších (Janeway a kol., 2001).

Nespecifická imunita bývá účinná proti mnoha různým patogenním organismům díky schopnosti buněčných receptorů rozpoznat typické strukturní nebo funkční molekuly patogenů známých pod zkratkou PAMP (angl. *pathogen-associated molecular patterns*). Vrozený imunitní systém rozpoznává sdílené struktury patogenů, zatímco adaptivní imunitní systém rozpoznává individuální struktury. Podstatnými receptory, které rozpoznávají PAMPs jsou PRR (angl. *pattern recognition receptor*), z nichž nejvýznamnější jsou Toll-like receptory (TLR) a receptory skupiny CLR (angl. *C-type lectin receptors*). Řada TLR může být také stimulována molekulami, které se uvolňují z poškozených buněk a tkání (Hořejší a kol., 2017). Takové molekuly mají název DAMPs (angl. *damage associated molecular patterns*). DAMPs se podílejí na iniciaci neinfekční zánětlivé odpovědi, kterou dochází k aktivaci vrozené imunity. Hlavní funkcí TLR je indukce sekrece protizánětlivých cytokinů a aktivace některých membránových receptorů, které jsou nezbytné pro interakci s antigenně specifickými složkami imunitního systému. Aktivací membránových receptorů zajišťují TLR spojení imunitní odpovědi vrozené a adaptivní imunity. Podíl TLR na regulaci zánětlivé odpovědi a aktivaci vrozené i adaptivní imunity hraje významnou roli při nádorových onemocněních (Sameer a Nissar, 2021).

5.2 Adaptivní (specifická) imunita

Adaptivní imunita, na rozdíl od přirozené, bývá spuštěna až po setkání se specifickým antigenem (např. na povrchu nádorových buněk). Ten bývá rozeznán antigenně specifickým receptorem T lymfocytu (TCR) a specifickou protilátkou neboli imunoglobulinem (Ig).

Protilátky jsou produkovány plazmatickými buňkami, které se diferencovaly z B lymfocytů. Jde tedy o imunitu na antigenu závislou a zároveň antigenně specifickou. Pro správnou funkci specifické imunity je nezbytná i aktivita vrozené imunity. Obě tyto kategorie imunitního systému spolu neustále interagují (Hořejší a kol., 2017).

Tvorba protilátek závisí na interakci mezi antigen prezentující buňkou (APC) a T lymfocylem, který rozpozná antigen na APC. Aby mohly APC předložit antigeny nebo jejich fragmenty T lymfocytům, vkládají je do svých povrchových molekul. Jedná se o molekuly hlavního histokompatibilního komplexu (MHC), které slouží jako prostředník v komunikaci buněk imunitního systému (Nicholson, 2016). T lymfocyty rozpoznávají antigenní peptidy na molekulách MHC pomocí TCR a s ním asociovaných molekul (Vivier a Malissen, 2005).

Charakteristickým znakem adaptivní imunity je imunologická paměť, která umožňuje rychlejší a silnější imunitní odpověď na konkrétní antigen, s kterým se už organismus setkal (Hořejší a kol., 2017). Za vytvoření imunologické paměti jsou zodpovědné dlouhodobé paměťové T a B lymfocyty, které byly vytvořeny během prvního setkání se specifickým antigenem (Bonilla a Oettgen, 2010). Nevýhodou, kterou může adaptivní imunita představovat, je doba od prvního setkání s antigenem a následná expanze antigen specifických T a B lymfocytů, která může trvat až 5 dní (Turvey a Broide, 2010).

5.3 Protinádorové imunitní mechanismy

Imunitní systém představuje klíčový prvek v prevenci rozvoje a progresu rakoviny. Termín protinádorová imunita označuje imunitní reakce jak vrozené, tak adaptivní imunity, které vedou ke kontrole nádorů. Pomocí antigenů exprimovaných nádorovými buňkami je imunitní systém schopen detekovat a následně eliminovat nádorové buňky. Pokud dojde k nepřítomnosti nebo nedostatečnosti jedné nebo více složek protinádorové imunity, může se zvýšit šance výskytu rakoviny (Barbosa a kol., 2021).

Cílem imunity je eliminace všeho škodlivého, tedy i nádorových buněk. Toho lze docílit pomocí několika buněk imunitní soustavy, z nichž nejúčinnější jsou cytotoxické T lymfocyty (Tc) a přirození zabíječi (NK buňky). Oba typy buněk spouštějí intracelulární děje vedoucí k apoptóze cílové buňky. Na eliminaci nádorových buněk mají významný podíl také např. dendritické buňky (DC) a makrofágy (Martínez-Lostao a kol., 2015). Aby mohlo dojít k interakci mezi nádorovou buňkou a buňkou imunitního systému je potřeba řada komplexních mechanismů, které tuto interakci umožní (Munhoz a Postow, 2016).

Právě posílení nebo použití některých protinádorových imunitních mechanismů a buněk je hlavním záměrem imunoterapie v boji proti rakovině.

5.3.1 T lymfocyty

Jak již bylo zmíněno výše, T lymfocyty jsou jedny z nejvíce účinných buněk v protinádorové imunitní odpovědi. T lymfocyty se dělí podle funkcí na několik typů lymfocytů, z nichž nejdůležitější v protinádorové imunitě jsou pomocné T lymfocyty (Th) a cytotoxické T lymfocyty (Tc). Dělení T buněk závisí také na tom, jaké koreceptory exprimují. Th lymfocyty nesou koreceptor CD4, který rozpoznává antigeny exprimované na MHC II molekulách. CD4⁺ T lymfocyty jsou hlavními producenty cytokinů, které aktivují ostatní imunitní buňky a regulují imunitní odpověď. Tc lymfocyty jsou nositeli koreceptoru CD8 a rozpoznávají antigeny ve spojení s MHC I molekulami. Právě CD8⁺ T lymfocyty mají schopnost rozeznat abnormální buňky a následně je likvidovat. K eliminaci využívají CD8⁺ T lymfocyty mechanismy přímého kontaktu s cílovou buňkou, nebo sekretují toxiny do extracelulárních prostorů (Hořejší a kol., 2017; Waldman a kol., 2020).

5.3.2 NK buňky

Dalšími cytotoxickými lymfocyty, které hrají významnou roli v protinádorové imunitní odpovědi, jsou přirození zabijáci (NK buňky). Jedná se o buňky vrozené imunity, které oproti Tc lymfocytům postrádají specifitu. Zároveň v porovnání s Tc lymfocyty nevyžadují předchozí expozici antigenu. NK buňky mají několik mechanismů, které vedou k ochraně organismu před infikovanými nebo pozměněnými buňkami (Abel a kol., 2018). Kromě cytotoxických mechanismů exprimují NK buňky některé cytokiny, např. IFN- γ a TNF α (angl. *tumor necrosis factor*), tím se podílejí na regulaci imunitního systému (Sungur a Murphy, 2014).

Na svém povrchu mají NK buňky širokou škálu stimulačních a inhibičních receptorů umožňujících imunitní dohled. Právě inhibiční receptory NK buněk jsou zaměřené na nádorové buňky, které exprimují velmi nízké hladiny molekul MHC I jako formu úniku před imunitním systémem. NK buňky jsou schopné tyto nízké hladiny detekovat a následně eliminovat nádorové buňky (Gonzalez a kol., 2018).

Protože se jedná o cytotoxické lymfocyty, tak jedním z mechanismů, jak NK buňky mohou ničit např. nádorové buňky, je pomocí přímého kontaktu. Dalším významným mechanismem je iniciace apoptózy, která je zprostředkována cytolytickými granulemi (Abel a kol., 2018). Granule v cytoplazmě NK buněk obsahují cytolytické proteiny perforin a granzymy. Pomocí perforinu dochází k tvorbě pórů v buněčné membráně cílové buňky, kudy následně proniknou granzymy a vyvolají apoptózu (Gonzalez a kol., 2018).

5.3.3 Makrofágy

Důležitými buňkami vrozeného imunitního systému jsou fagocytické makrofágy. Jejich hlavní úlohou je udržování homeostázy organismu a iniciace opravy postižené tkáně. Aby mohly makrofágy plnit tyto úlohy, vykonávají hned několik funkcí, mezi které patří odstraňování mrtvých buněk a dalšího tkáňového odpadu, fagocytování mikroorganismů, produkce cytokinů, produkce toxinů, prezentace antigenu, iniciace opravy tkáně a regulace zánětu (Hořejší a kol., 2017; Gonzalez a kol., 2018).

Makrofágy jsou mimořádně heterogenní populací buněk a mohou se nacházet v různých stavech v závislosti na stimulech z prostředí. Nejvíce studované jsou makrofágy skupiny M1 a M2. Působením cytokinu $\text{IFN}\gamma$ se aktivují prozánětlivé makrofágy označované jako M1, které prostřednictvím produkce cytokinů a oxidu dusnatého ničí nádorové buňky. Zároveň makrofágy M1 fungují jako APC aktivující Tc lymfocyty. Pomocí exprimování prozánětlivých cytokinů dostávají makrofágy M1 další imunitní buňky do místa zánětu a udržují je aktivními. Naopak makrofágy M2 fungují protizánětlivě a k jejich aktivaci dochází v přítomnosti cytokinu IL-4. Makrofágy M2 jsou funkčně rozmanitější a exprimují různé kombinace protizánětlivých cytokinů a chemokinů, pomocí nichž ukončují zánět. Dále se M2 makrofágy uplatňují v regulaci procesů vedoucích k opravě poškozené tkáně. Protizánětlivé makrofágy M2 mají i nepříznivé účinky, kdy svojí aktivitou mohou podpořit růst nádoru (Ostrand-Rosenberg, 2008; Ross a kol., 2021).

5.3.4 Neutrofily (neutrofilní granulocyty)

Nejhojnějšími leukocyty v krvi jsou neutrofily, představující první obrannou linii při infekcích a zánětech. Neutrofily využívají řadu mechanismů pro boj s mikroorganismy nebo např. nádorovými buňkami. Mezi tyto obranné mechanismy patří fagocytóza, tvorba neutrofilních extracelulárních pastí (NET), produkce cytokinů a chemokinů, uvolňování proteázy a další (Uribe-Querol a Rosales, 2015).

Bylo prokázáno, že neutrofily mají vlastnosti, které buď brání nebo podporují proliferaci nádoru. Jedná se o neutrofily spojené s nádorem (TAN). Neutrofily s protinádorovými vlastnostmi mohou zabíjet nádorové buňky prostřednictvím cytotoxicity závislé na protilátkách nebo přímou cytotoxicitou. Díky jejich schopnosti zabíjet nádorové buňky, mohou neutrofily aktivně bránit výskytu metastáz (Granot a Jablonska, 2015).

Při iniciaci rakoviny dochází k vyvolání zánětu v reakci na poškození tkáně, a právě neutrofily jsou klíčovou složkou zánětu. Protože se jedná o buňky s vysokou plasticitou, tak se neutrofily mohou přizpůsobit různému nádorovému mikroprostředí. Takové přizpůsobení umožňuje neutrofilům vyvíjet různé účinky na nádor. Této skutečnosti by se mohlo využít ve prospěch léčeného pacienta a pomocí podané imunoterapie by bylo neutrofilům zabráněno přeprogramování na protinádorové TAN (Xiong a kol., 2021).

5.3.5 Dendritické buňky

Při iniciaci a regulaci protinádorové imunitní odpovědi hrají klíčovou roli také antigen prezentující buňky (APC). Pravděpodobně nejúčinnější APC jsou dendritické buňky (DC), které slouží jako spojující článek mezi vrozenou a adaptivní imunitou. Hlavní funkcí DC je zachycení cizího antigenu, jeho zpracování a následné prezentování tohoto antigenu nebo jeho fragmentů v komplexu s molekulami MHC I a II třídy. Prezentováním antigenu dojde ke zrání a aktivaci specifických Tc lymfocytů, které jsou schopné identifikovat nádorové buňky daného antigenu a ničí je (Markov a kol., 2016). Pro optimální stimulaci imunitní reakce, tedy i T lymfocytů a NK buněk, produkují DC řadu cytokinů, mezi které patří např. IL-1, IL-6, IL-12, IFN- γ a TNF- α (Hořejší a kol., 2017; Sungur a Murphy, 2014).

Dnes již existují adjuvancia, tj. látky zesilující imunitní reakci, zaměřené na DC, např. vakcíny na bázi DC. Hlubší pochopení molekulárních mechanismů, kterými různé podskupiny DC fungují v souvislosti s nádory, by mohlo vést ke zvýšení jejich využití v nádorové imunoterapii zaměřené na posílení aktivity T lymfocytů (Wculek a kol., 2020; Hořejší a kol., 2017).

5.4 Únik nádorových buněk před imunitním systémem

I přes to, že nádorové buňky mohou působit jako zcela odlišné od buněk normálních a mělo by dojít k jejich rozpoznání imunitním systémem, k tomu mnohdy nedochází. K úspěšnému rozvoji protinádorové imunity často brání celá řada faktorů. Jedním z důvodů

je, že nádorová buňka má řadu mechanismů, které brání imunitnímu systému v jejím rozpoznání. Někdy se mohou naopak nádorové buňky lišit velmi málo od buněk normálních a imunitní systém je přehlíží (Ferenčík a kol., 2005).

Mikroprostředí nádoru je tvořeno složitou sítí buněk a humorálních látek, ty mohou posunout protinádorovou imunitní odpověď ve vlastní prospěch. Z toho vyplývá, že rakovina není pouze útvar transformovaných buněk, a že velkou část nádorové hmoty tvoří různé buňky organismu (Bissell a Radisky, 2001). Mezi buňky, které se mohou vyskytovat v nádorovém mikroprostředí, patří fibroblasty, pericyty, adipocyty a hlavně imunitní buňky (Galli a kol., 2020).

5.4.1 Imunoeditace nádoru

Proces, kterým imunitní systém ovlivňuje vývoj nádoru se nazývá imunoeditace nádorů. Vztah mezi imunitním systémem a nádorem prochází podle hypotézy imunoeditace třemi fázemi, a proto se někdy tento proces označuje jako 3E. Jedná se o fáze, které se nazývají: eliminace, rovnováha a únik (angl. *elimination, equilibrium, escape*). V průběhu těchto fází dochází k postupné ztrátě imunogenicity nádorových buněk, tedy jejich schopnosti vyvolat imunitní odpověď. Nádorové buňky se pod selekčním tlakem ze strany imunitního systému mění a získávají imunosupresivní mechanismy umožňující progresi onemocnění (O'Donnell a kol., 2019).

Fáze eliminace odpovídá teorii imunitního dohledu, kdy složky vrozené a adaptivní imunity spolupracují při rozpoznání a eliminaci nádorových buněk. Někdy ale není imunitní systém dostatečně rychlý při eliminaci všech pozměněných buněk. Nádor je schopný v průběhu svého vývoje akumulovat další mutace, které umožní nádorovým buňkám se vyhnout eliminaci a tím nádor postupuje do fáze rovnováhy (O'Donnell a kol., 2019).

Jedná se o nejdelší fázi, která ustanoví rovnováhu mezi imunitním systémem a nádorovými buňkami. Imunitní systém kontroluje růst nádoru ve stavu funkční dormance. Fáze rovnováhy může skončit třemi různými situacemi. První situací může být kompletní eliminace nádorových buněk. Druhou situací je dlouhodobé udržení rovnováhy mezi imunitním systémem a nádorovými buňkami, které může trvat po celý život pacienta. Ve třetí situaci získávají nádorové buňky schopnosti vyhnout se kontrole imunitního systému. Může k tomu dojít na základě několika vlivů, např. oslabením imunitního systému nemocí, akumulací dalších mutací a další (Hořejší a kol., 2017).

Tím nádor vstupuje do třetí fáze a zcela uniká kontrole imunitního systému a začíná nekontrolovaně růst. V této fázi, kdy má nádor již řadu mechanismů odolnosti vůči imunitnímu systému, bývá klinicky detekovatelný (Šťastný a Říhová, 2015).

5.4.2 Mechanismy odolnosti nádoru vůči imunitnímu systému

Nádorové buňky se mohou vyhýbat imunitě prostřednictvím různých mechanismů, které běžně zahrnují ztrátu antigenicity a imunogenicity. Další úniková strategie souvisí s produkcí cytokinů a imunosupresivních faktorů, s jejichž pomocí mohou nádorové buňky vytvořit imunosupresivní nádorové mikroprostředí, které brání efektivní imunitní odpovědi (Tang a kol., 2020). Těchto mechanismů nabývá nádorová buňka prostřednictvím mutací nebo delecí genů. To dělá z nádorových buněk mimořádně heterogenní buňky s vysokou variabilitou (Šťastný a Říhová, 2015). Významnými únikovými mechanismy jsou např. ztráta antigenicity, dysfunkce dendritických buněk, produkce faktorů inaktivujících T lymfocyty, snížená exprese molekul MHC I, zvýšená exprese molekul PD-L1 (Tang a kol., 2020).

Potlačení aktivity T lymfocytů je klíčovým mechanismem nádorového úniku před imunitním systémem. K potlačení aktivity T lymfocytů může dojít skrze inhibici některých mechanismů rozpoznání a prezentování antigenu (např. inhibice funkce antigen prezentujících buněk). Pokud si nádor zachová dostatečnou antigenicitu pro jeho rozpoznání imunitním systémem, uplatní se v úniku před eliminací především mechanismy snižující imunogenicitu nádoru, jako např. exprimování ligandu PD-L1 (Kim a Cho, 2022).

Nádorové buňky mohou ztratit svojí antigenicitu, aby zabránily imunitní reakci. Ke ztrátě antigenicity může dojít buď mutací, která ztrácí původní nádorové antigeny, nebo v důsledku mutace prezentace antigenu buňkám imunitního systému. Některé nádorové buňky mohou v časně fázi vývoje zcela postrádat mutaci zajišťující tvorbu nádorových antigenů (Beatty a Gladney, 2015).

Existuje také řada mechanismů, pomocí kterých dokáže nádor potlačit nebo zcela utlumit funkce DC. K inhibici zrání DC dochází prostřednictvím produkce nádorových faktorů, jako např. IL-6, IL-10, IL-35 (Tang a kol., 2020; Kim a Cho, 2022). Nádor může také potlačit nebo blokovat funkci DC vychytávat a zpracovávat nádorové antigeny. Zmíněné mechanismy inhibice DC spolu s řadou dalších mechanismů vedou nejčastěji k rozvoji tolerance T lymfocytů vůči nádoru (Markov a kol., 2016).

Velmi účinně mohou nádory tlumit T lymfocyty prostřednictvím přímého kontaktu. Právě exprese molekuly PD-L1 (programmed cell death ligand 1) na nádorových buňkách představuje důležitý inhibiční mechanismus. Na ligand PD-L1 se váže receptor PD-1 (programmed cell death protein 1), který je exprimován zejména aktivovanými T lymfocyty. PD-1 se řadí mezi tzv. kontrolní body imunitního systému (angl. *immune checkpoints*). Funkcí PD-1 je inhibice adaptivní i vrozené imunitní odpovědi a nádorové buňky toho mohou využít pro únik před imunitním systémem (Han a kol., 2020).

Lepší pochopení mechanismů odolnosti rakoviny vůči imunitnímu systému by mohlo pomoci při výběru léčebného postupu u pacientů. Zejména pro nádorové imunoterapie je pochopení těchto mechanismů kritické a pomohlo by určit, u kterých pacientů je největší pravděpodobnost, že daná imunoterapie bude účinná a s co nejmenšími vedlejšími účinky (Beatty a Gladney, 2015).

6 Nádorová terapie

V závislosti na typu rakoviny, její lokalizaci a stadiu progresu je zvolena léčba a její postup (Abbas a Rehman, 2018).

Léčba rakoviny představuje velmi složitý proces a často se chirurgické metody, radioterapie, chemoterapie a imunologie používají ve vzájemné kombinaci. Léčba podaná po primární terapii (zpravidla operaci) se označuje jako adjuvantní terapie, zatímco léčba podaná před primární terapií se označuje jako neoadjuvantní terapie. Cílem vzájemné kombinace léčebných terapií je zvýšit pravděpodobnost vyléčení a zamezení recidivy onemocnění (West a Jin, 2015).

6.1 Chirurgie

Jedná se o nejstarší onkologickou disciplínu, která stále zůstává nejúčinnější a nejběžněji užívanou u mnoha benigních a maligních nádorů. Výhodou chirurgie je, že ve srovnání s chemoterapií a radioterapií nezpůsobuje značná poškození okolních tkání (Abbas a Rehman, 2018).

Odstranění celého nádoru bývá náročné, obzvláště pokud se jedná o nádor maligní s metastázami. Zároveň je obtížné detekovat izolované nádorové buňky, které se mohou vyskytovat na jiných místech v těle. V kombinaci s imunoterapií se využívá schopnosti imunitního systému eliminovat mikrometastázy, snížení rozsáhlosti chirurgického zákroku a také snížení pravděpodobnosti recidivy onemocnění (O'Donnell a kol., 2019).

6.2 Chemoterapie

Pro léčbu maligních nádorů se nejčastěji volí chemoterapie. Během chemoterapie se užívají cytostatika, léky pro protinádorovou léčbu. Cílem chemoterapie je eliminace nádorových buněk. Cytostatika nejsou specifická pro nádorové buňky, proto také dochází k poškození zdravých buněk. Nejčastěji dochází k poškození u tkání s rychlou obnovou, jako jsou např. vlasové folikuly, buňky reprodukčních orgánů, buňky gastrointestinálního traktu nebo buňky kostní dřeně (Vorlíček, 2013; Amjad a kol., 2022).

V současné době se chemoterapie podává nejčastěji neoadjuvantně, adjuvantně nebo v kombinaci s jinou léčebnou terapií. Podání chemoterapie jako přídatné léčby adjuvantně ve

spojení např. s chirurgickým zákrokem, eliminuje zbylé nádorové buňky, mikrometastázy a tím přispívá k celkovému vyléčení (DeVita a Chu, 2008). Při neoadjuvantním podání je hlavním záměrem zmenšení nádoru. Spolu s chemoterapií se dnes může podávat i imunoterapie, aby bylo dosaženo co největší účinnosti léčby (Vorlíček, 2013).

6.3 Radioterapie

Použití ionizujícího záření při radioterapii je velmi účinnou metodou především k léčbě zhoubných nádorů. Záření tvoří ionty a ukládá energii do buněk, kterými prochází. Uložená energie vede k přímé destrukci rakovinných buněk, nebo u nich vyvolá genetické změny vedoucí k buněčné smrti (Abbas a Rehman, 2018).

Mechanismus radioterapie spočívá v poškození DNA rakovinných buněk pomocí vysokoenergetického záření, tím dochází ke ztrátě schopnosti replikace a buňky odumírají. Nežádoucím účinkem radioterapie je, stejně jako u chemoterapie, že dochází k zásahu i zdravých buněk ležících v okolí ozařovaného nádoru. Radioterapie se obvykle používá k doplnění jiné léčebné metody (Baskar a kol., 2012).

6.4 Imunoterapie

V posledních letech došlo k významnému pokroku v imunoterapii nádorových onemocnění, tento pokrok je zejména díky bližšímu pochopení mechanismů imunitního systému. Nové poznatky umožňují aktivně pracovat na nových způsobech léčby nádorových onemocnění. Imunoterapie je momentálně velmi atraktivní léčebnou metodou. Jak už z názvu vyplývá, jedná se o léčbu zaměřující se na imunitní systém léčeného jedince. Hlavním cílem imunoterapie je primárně obnovení reaktivity imunitního systému jedince v boji proti nádorovým buňkám (Tan a kol., 2020).

Tato myšlenka vzešla ze schopnosti nádorového mikroprostředí zneužít mechanismy zánětu ve svůj vlastní prospěch a tím uniknout imunitnímu systému. Rozsáhlé klinické studie prokázaly, že tyto negativní mechanismy je možné pomocí vhodných imunoterapeutických zásahů efektivně zablokovat a umožnit tak protinádorovou reakci imunitního systému (Krejsek a kol., 2016).

Aby bylo možné plně využít potenciál imunoterapie, je kladen důraz na správné začlenění této terapie do hlavních onkologických postupů, jako je chirurgie rakoviny,

chemoterapie a radioterapie (O'Donnell a kol., 2019). Podle načasování se imunoterapie dělí na neoadjuvantní a adjuvantní. Pod pojmem adjuvantní terapie je chápána léčba podávána po hlavním onkologickém postupu. Cílem této léčby je eliminovat metastázy a tím pomoci ke zvýšení míry vyléčení (Bilusic, 2022).

V této bakalářské práci budou představeny metody podání imunoterapie před hlavním onkologickým postupem neboli neoadjuvantní imunoterapie.

7 Neoadjuvantní imunoterapie

Léčebná terapie podávána před hlavním onkologickým postupem je známa jako neoadjuvantní terapie. Jedná se o velmi nadějnou formu imunoterapie, která si dává cílem zmenšení rozsáhlosti hlavní léčby, jako je např. chirurgický zákrok. Zároveň je jejím cílem zmenšit rozšíření rakoviny a případně zničení vzniklých metastáz. Potenciál neoadjuvantní imunoterapie je viděn i u některých pacientů, kdy zabraňuje pooperačním komplikacím (Bilusic, 2022).

Neoadjuvantní imunoterapie má oproti adjuvantní imunoterapii několik významných výhod. Mezi tyto výhody patří např. usnadnění interakce mezi imunitními buňkami a nádorovým mikroprostředím v důsledku neporušené struktury lymfatického systému, detekce nádorových markerů, nižší náklady díky menšímu počtu dávek (Bilusic, 2022), vyvolání rozsáhlejší imunitní odpovědi proti většímu počtu nádorových antigenů (Topalian a kol., 2020) a další. Na základě několika porovnávajících studií byl také prokázán větší počet nádorově specifických CD8⁺ T buněk v krvi po podání neoadjuvantní imunoterapie (Liu a kol., 2016). Zvýšené množství aktivovaných T buněk může po operaci zmírnit imunosupresi a snížit tak pravděpodobnost recidivy onemocnění (Topalian a kol., 2020).

Na základě vědeckých prací a klinických studií z posledních let se neoadjuvantní imunoterapie jeví jako velmi účinná alternativa jiných léčebných metod, jako je právě adjuvantní terapie (Krishnamoorthy a kol., 2021).

Podání imunoterapie před zákrokem, tedy v době, kdy je primární nádor stále přítomen a lymfatický systém nenarušen, může vyvolat silnější a širší imunitní reakci. Intaktní nádorové mikroprostředí může mít minimální heterogenitu nádorového antigenu a tím dochází snáz k zahájení protinádorové odpovědi a eliminaci mikrometastáz (Mittendorf a kol., 2022).

7.1 Načasování podání neoadjuvantní imunoterapie

Faktor, který velmi ovlivňuje účinnost neoadjuvantní imunoterapie, je načasování resekce nádoru. Studie z roku 2019 zkoumala na myších modelech 4T1.2 a E0771 se spontánně metastatickým karcinomem prsu, jak doba trvání neoadjuvantní imunoterapie ovlivní dlouhodobé přežití. Optimální účinnosti bylo dosaženo resekci primárního nádoru 4-5 dní po prvním podání neoadjuvantní imunoterapie. Prodloužením této doby na 10 dní či její zkrácením na 2 dny vedlo ke ztrátě účinnosti neoadjuvantní imunoterapie (Liu a kol., 2019).

Výsledky této studie naznačují, že pro dosažení optimální účinnosti neoadjuvantní imunoterapie je potřeba správně stanovit časový rozestup mezi léčbou a chirurgickým zákrokem.

Optimální časový bod pro resekci nádoru po podání neoadjuvantní imunoterapie není zatím znám. Prokázané ovšem je, že prodloužení léčby, ať už neoadjuvantní nebo adjuvantní, vede ke zvýšení systémové imunitní poruchy ve tkáních, jako jsou např. játra (Liu a kol., 2019).

Například výsledky klinické studie LCMC3 zaznamenaly u 10 ze 101 léčených pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic (NSCLC) progresi onemocnění během neoadjuvantního podání atezolizumabu (monoklonální protilátka proti PD-L1). Právě progresi onemocnění v důsledku indukce nežádoucích účinků imunoterapie bývá u některých pacientů jedním z vedlejších účinků a vede k odložení chirurgických plánů (Ahern a kol., 2021). Nejčastěji k odložení plánované operace dochází v důsledku zhoršení stavu pacienta nereagujícího na zvolenou neoadjuvantní imunoterapii. Důvodem je, že momentálně neexistuje diagnostický nástroj, který by pomohl upřesnit vhodnost pacienta na zvolenou imunoterapii. Včasné rozpoznání nereagujících pacientů na neoadjuvantní imunoterapii by mohlo zabránit progresi onemocnění např. změnou léčebného plánu (Liu a kol., 2019; Galli a kol., 2020).

Obavy z odložení plánované resekce nádoru jsou pravděpodobně jedním z hlavních důvodů, proč i přes veškeré své prokázané výhody, často lékaři nezařazují neoadjuvantní imunoterapie do léčebného plánu pacienta (Lee a kol., 2021). Podle získaných dat od Liu a kol. (2019) se v současné době jeví krátkodobé podávání neoadjuvantní imunoterapie bezprostředně před operací jako dostatečné k vyvolání účinné protinádorové imunity a zároveň je tím sníženo i riziko rozvoje závažných nežádoucích účinků.

7.2 Typy neoadjuvantní imunoterapie

V současné době se již klinicky používá několik typů imunoterapie a řada dalších je ve fázi výzkumu. Obecně je cílem každé protinádorové imunoterapie využití imunitních mechanismů buď k posílení nebo vyvolání protinádorové imunitní reakce. Současné imunoterapeutické metody se dělí podle jejich funkce a mechanismů na skupiny, jako jsou např. inhibitory imunitních kontrolních bodů (ICIs), cytokiny, protinádorové vakcíny, toll-like

receptor agonisté, adoptivní imunoterapie, monoklonální protilátky a mnoho dalších (Ackerman a kol., 2022).

Bilusic a Gulley ve své studii uvádí, že každá imunoterapie by mohla být pravděpodobně úspěšná v neoadjuvantním podání. K přijetí tohoto tvrzení není zatím dostatečný počet preklinických a klinických studií zaměřených na podání běžně užívaných imunoterapií v době před operací (Bilusic a Gulley, 2021).

Níže popsané budou imunoterapie, které se běžně podávají neoadjuvantně, nebo které vykazují potenciál v neoadjuvantním nastavení.

7.2.1 Monoklonální protilátky

Tato imunoterapeutická léčba vychází ze schopnosti B lymfocytů produkovat protilátky rozpoznávající specifický antigen. Monoklonální protilátky (mAb) jsou připravovány jedním ze subtypů B lymfocytů. Příprava a produkce lidských mAb je příliš komplikovaná, a proto se v klinické praxi běžně používají některé humanizované protilátky (Cwiertka a kol., 2004).

Protilátka obsahuje dva fragmenty Fab vázající antigen a jeden fragment Fc, který zprostředkovává interakce protilátky s buňkami imunitního systému. Protilátky se dělí do pěti tříd: IgA, IgD, IgE, IgG a IgM. Protilátkové terapie nejčastěji používají IgG díky jeho schopnosti interagovat s NK buňkami, DC, neutrofily a jinými významnými buňkami protinádorové imunity (Zahavi a Weiner, 2020).

Protilátky využívají několika mechanismů, jak mohou bojovat proti nádorovým buňkám. Nejběžněji se pacientům podává mAb zaměřená na jedinečný nádorový antigen nebo na antigen nadměrně exprimovaný nádorovými buňkami. Interakce mezi protilátkou a buňkou imunitního systému vede k buněčné cytotoxicitě závislé na protilátce (ADCC) nebo cytotoxicitě závislé na komplementu (CDC). Jedním z mechanismů, jak mohou protilátky aktivovat efektorové mechanismy imunity (např. fagocytózu a ADCC), je pomocí označení nádorových buněk určených k likvidaci. Monoklonální protilátky se také využívají k aktivaci nebo inhibici signalizace pomocí navázání na receptory buněčného povrchu. Tím mohou mAb např. inhibovat signalizaci růstového faktoru VEGF (angl. *vascular endothelial growth factor*), který má v nádoru zvýšenou hladinu (Scott a kol., 2012).

Neoadjuvantní mAb zaznamenaly v kombinaci s chemoterapií velký úspěch při léčbě karcinomu prsu. Právě u tohoto typu nádoru se mAb osvědčily svou všestranností, kdy mohou označovat nádorové buňky, přímo je napadat, inhibovat jejich růst a blokovat inhibitory imunitního systému (Behl a kol., 2023).

7.2.2 Protinádorové vakcíny

S prohlubováním znalostí o biologii nádorů se vyvinuly protinádorové vakcíny preventivní a terapeutické. Preventivní vakcíny se uplatňují v prevenci maligních nádorů vyvolaných infekčním činitelem a terapeutické vakcíny se používají k léčbě nádorových onemocnění. Vakcíny proti rakovině jsou zaměřené na vyvolání imunitní odpovědi proti použitým nádorovým antigenům (Vonka, 2006).

Terapeutické protinádorové vakcíny se používají jako jedna z možných imunoterapií k léčbě aktivního onemocnění. Prvním typem jsou vakcíny na bázi dendritických buněk, které indukují imunitní reakci aktivací T lymfocytů. Principem DC protinádorové vakcíny je použití *ex vivo* diferencovaných DC vzniklých z izolovaných monocytů, které dozrály vlivem růstového hormonu GM-CSF a IL-4. Během inkubační doby jsou DC podány nádorové antigeny. Po podání vakcíny pacientovi indukují zralé DC proliferaci NK buněk, cytotoxickou aktivitu CD8⁺ lymfocytů a produkci IFN- γ (Calmeiro a kol., 2020).

Dalšími typy terapeutických protinádorových vakcín jsou např. peptidové vakcíny, DNA vakcíny a vakcíny ze živých rekombinantních virů a bakterií (Vonka, 2006).

Ačkoliv by protinádorové vakcíny mohly být používány neoadjuvantně, jeví se do budoucnosti jako účinnější v kombinaci s jinými imunostimulačními přístupy (např. s ICI) a to v pooperačním podání, aby bylo zabráněno relapsu (Lin a kol., 2022).

7.2.3 ICIs (Inhibitory imunitních kontrolních bodů)

Za vysoký zájem o imunoterapii jsou zodpovědné především inhibitory imunitních kontrolních bodů (ICIs). Základní princip této imunoterapie momentálně spočívá v podání protilátek proti tzv. inhibičním receptorům. Za normálních podmínek zajišťují kontrolní body ochranu organismu před patogeny a jinými škodlivými faktory z vnějšího prostředí a zároveň tlumí autoreaktivitu T lymfocytů. Nádorové buňky jsou schopny využít tento mechanismus ve svůj vlastní prospěch a s jeho pomocí se ukrýt před zneškodněním imunitním systémem (Hořejší a kol., 2017).

7.2.3.1 Kontrolní body a jejich vlastnosti

Schopnost T lymfocytů rozpoznat a následně zničit nádorové buňky závisí především na dvou mechanismech. První je prostřednictvím TCR rozpoznávající specifický nádorový antigen prezentovaný molekulou MHC, kdy dojde k proliferaci T buněk a cytotoxické aktivitě. Druhý typ signalizace je nespecifický a založený na rozpoznání kontrolních bodů imunitního systému, kam patří např. inhibiční ligandy PD-L1 a PD-L2 a kostimulační faktory CD80 a CD86. Při rozpoznání některého z inhibičních ligandů dojde ke snížené proliferaci efektorových buněk, inhibici jejich sekrece cytokinů a může být indukovaná jejich apoptóza. V případě, že T lymfocyt neobdrží dostatečný signál od kostimulačních faktorů, dojde k jeho anergii a nedozraje v buňku efektorové. Hlavními receptory těchto kontrolních bodů jsou CD28, cytotoxický T-lymfocyt antigen 4 (CTLA-4) nebo dráha programované buněčné smrti 1(PD-1). Nádorové buňky jsou schopné zvýšenou expresí některého z jmenovaných ligandů uniknout eliminaci imunitním systémem. Naopak kostimulační molekuly jsou nádorovými buňkami exprimovány minimálně nebo vůbec (Han a kol., 2020; Zatloukalová a kol., 2016).

PD-1 je inhibiční receptor na T lymfocytech. Jeho aktivita je kritická pro regulaci reakce adaptivní imunity. Ligandy pro PD-1 jsou PD-L1 a PD-L2. Exprese PD-L2 je zaznamenána nejvíce u DC, makrofágů, monocytů a B lymfocytů. Z toho vychází předpoklad, že jeho exprese je omezena pouze na antigen prezentující buňky. PD-L1 je exprimován T a B lymfocyty, makrofágy, DC a některými epiteliálními buňkami. Exprese PD-L1 je zaznamenána především při zánětu nebo nádorovém onemocnění, kdy prostřednictvím jeho exprese unikají nádorové buňky imunitě. Zvýšená exprese PD-L1 byla zaznamenána v prostředí bohatém na CD8⁺ lymfocyty, Th cytokiny a IFN- γ (Philips a kol., 2020). Exprese a aktivita PD-L1 v nádorovém mikroprostředí vede nejen k přežití nádorových buněk, ale také přispívá k progresi onemocnění (Han a kol., 2020). Po vazbě PD-1 na své ligandy dojde k inhibici proliferace T lymfocytů a inhibici produkce protizánětlivých cytokinů (Urwyler a kol., 2020).

CTLA-4 a CD28 se vážou na ligandy CD80 a CD86. Vazba CD28 s některým z ligandů působí jako kostimulační faktor pro T lymfocyty. Naopak CTLA-4 funguje jako inhibitor a po navázání na jeden z ligandů může snížit signalizaci CD28 vedoucí ke snížené aktivitě efektorových buněk. CTLA-4 tedy působí jako kompetitivní homolog CD28. Kromě

přímé inhibice T lymfocytů může CTLA-4 také snižovat expresi CD80 a CD86 na APC a zesiluje imunosupresi zprostředkovanou regulačními T lymfocyty (He a Xu, 2020).

Další inhibiční látky jsou např. TIM-3, LAG-3, TIGIT a BTLA. Nejvíce prozkoumány a testovány jsou ICIs zaměřené na inhibici PD-1 a CTLA-4 (He a Xu, 2020).

7.2.3.2 Mechanismus a typy ICIs

Hlavním záměrem podání ICIs je obnovení imunitní reaktivity pomocí blokace vazby imunitních kontrolních bodů na nádorových buňkách s receptory na T lymfocytech. Vysoká hladina kontrolních bodů je jedním z charakteristických znaků nádorového mikroprostředí. Protože se jedná o povrchové molekuly, lze jejich aktivitu snadno inhibovat pomocí protilátek, které brání vazbě ligand-receptor. Oproti chemoterapii je podáním ICIs vyvolána stálější reakce s trvalými účinky. Nejúspěšnější ICIs jsou zaměřené na inhibici PD-1 a CTLA-4 (He a Xu, 2020).

Již v roce 2000 vstoupily do klinických studií na pacientech dvě testované protilátky blokující CTLA-4, jednalo se o ipilimumab a tremelinumab. Roku 2011 byl ipilimumab schválen FDA jako plně humánní monoklonální protilátka proti CTLA-4. Jedná se o anti-CTLA-4 protilátku. Podání této protilátky má v dnešní době relativně nízkou míru odezvy a zároveň dochází často k indukci toxicity (Ribas a Wolchok, 2018).

Současné poznatky naznačují, že blokáda dráhy PD-1 je podle všeho jedním z nejvýznamnějších pokroků v léčbě rakoviny. Schváleno FDA je momentálně pět anti-PD-1 nebo anti-PD-L1 protilátek, nejčastěji jsou používány pembrolizumab a nivolumab (Ribas a Wolchok, 2018).

Imunoterapie založená na blokaci receptoru PD-1 funguje následovně. Aktivací T lymfocytů dojde k jejich cirkulaci krví, aby našly specifický antigen prezentovaný nádorovými buňkami. Jakmile je antigen rozpoznán, spouští aktivita TCR expresi regulačního receptoru PD-1 a produkci IFN- γ spolu s dalšími cytokiny. Na to reaguje nádorová buňka prostřednictvím aktivace interferon-gamma receptoru (IFNGR) expresí PD-L1, na který se váže PD-1, čímž se vypne protinádorová odpověď T lymfocytu. Podáním protilátek anti-PD-1 nebo anti-PD-L1 se blokuje tato negativní interakce (Ribas a Wolchok, 2018).

Podání anti-PD-1 nebo anti-PD-L1 má u některých nádorů míru odezvy v rozmezí 50-90 %. Mezi tyto nádory patří Hodgkinův lymfom, karcinom z Merkelových buněk a

desmoplastický melanom. U běžnějších variant se účinnost pohybuje v nižších procentech (Ribas a Wolchok, 2018).

7.2.3.3 Účinky ICIs

Účinnost ICIs se potvrdila především v léčbě solidních nádorů, zejména melanomu, nemalobuněčného karcinomu plic (NSCLC) a karcinomu močového měchýře. I přes to, že existuje více typů ICIs se v klinické praxi nejvíce používají léky cílené na PD-1 a CTLA-4 (Urwyler a kol., 2020). Bloádou PD-1 může být zvýšena i aktivita jiných prvků imunitního systému, např. aktivita NK buněk, produkce protilátek a další. Výhodou ICIs je také možnost trvalé imunitní odpovědi díky schopnosti vytvoření imunitní paměti T lymfocyty. Momentálně představuje překážku k tvorbě imunitní paměti odolnost některých nádorů vůči ICIs nebo jejich úplná neúčinnost na některé nádorové typy (Ribas a Wolchok, 2018).

I přes veškerá pozitiva, která ICI imunoterapie nabízí, na ni reaguje pouze zlomek pacientů. Důvodem je pravděpodobně vysoká variabilita nádorového mikroprostředí. Pokud vezmeme dva nádory stejného typu, oba mohou exprimovat na svém povrchu jiné látky. ICIs mají nízkou odezvu i u mnoha typů nejběžnějších rakovin, jako je např. kolorektální karcinom, kde anti-PD-1/PD-L1 nevykazuje téměř žádné účinky (He a Xu, 2020).

Klinicky vykazovaly ICIs četné imunitně související nežádoucí účinky (irAE). Nádorové mikroprostředí je kromě nádorových buněk plné různých buněk imunitního systému včetně T lymfocytů, B lymfocytů, NK buněk, makrofágů, DC, neutrofilů a dalších. Kromě efektorových T lymfocytů, na které jsou ICIs primárně cílené, se v imunitě nachází i regulační a paměťové T lymfocyty. Podáním bloády PD-1 může dojít k zesílení působení regulačních T lymfocytů vedoucí k imunosupresi. Predikce imunitní toxicity zůstává také velkou výzvou. Podle dosavadního výzkumu vykazují jednotlivé ICIs specifickou orgánovou toxicitu. Běžně dochází k toxicitě kožního, gastrointestinálního, jaterního, respiračního a endokrinního systému (Urwyler a kol., 2020). ICIs se mohou podávat samostatně nebo v kombinaci. Při podání protilátek v kombinaci, tedy proti CTLA-4 i proti PD-1, byla zaznamenána vyšší míra odpovědi pacientů na léčbu. Negativum kombinované léčby představuje zvýšená hladina toxicity (Ribas a Wolchok, 2018).

Neoadjuvantní podání ICIs vykazuje lepší výsledky klinického použití díky nižší toxicitě a menšímu počtu komplikací v perioperační době. V kombinaci s chemoterapií může

být naopak dosaženo větší patologické úlevy s celkovým zlepšením operability nádoru za cenu zvýšení irAE. Probíhající klinické studie se zaměřují hlavně na získání odpovědí, které by pomohly optimalizovat účinky ICIs v neoadjuvantním podání. Neoadjuvantní podání ICIs vykazuje ve srovnání s adjuvantní terapií celkový přínos pro přežití pacienta. Neoadjuvantní imunoterapie se také osvědčila porovnáním s neoadjuvantní chemoterapií, která vykazovala vyšší četnost odložení chirurgického zákroku oproti ICIs imunoterapii (Ge a Huang, 2022).

7.2.4 HIT-IT (Lidská intratumorální imunoterapie)

Novou léčebnou strategií je intratumorální (IT) imunoterapie, jejímž cílem je vytvoření vlastní vakcíny pomocí nádoru. Tato terapie spočívá v podání přímých injekcí do nádoru za účelem vyvolání vysoké koncentrace produktů stimulujících imunitu (Marabelle a kol., 2017). V současné době již probíhají klinické studie u pacientů s recidivující rakovinou testující lidskou intratumorální imunoterapii (HIT-IT) za využití různých imunitních produktů a jejich účinnosti v boji s nádory. Potenciál HIT-IT je viděn i u nižší míry toxicity této imunoterapie v porovnání se systémově podávanými imunoterapiemi (Champiat a kol., 2021).

V roce 2021 byl uskutečněn krátkodobý experiment, který testoval, zda krátkodobá monoterapie využívající intratumorální (IT) podání imunocytokinů (IC) vyvolá imunitní reakce, které by vedly k zabránění recidivy nádoru po jeho chirurgické resekci a opětovné stimulaci. Podán byl IC obsahující IL-2 navázaný na anti-GD2 monoklonální protilátku. K experimentu byly použity myši s melanomem, který exprimoval GD2 a po dobu 5 dní byly léčeny 50 µg IT-IC. Po 3 dnech od dokončení léčby došlo k resekci nádoru, kterou následovalo opětovné nakažení se vznikem plicních metastáz. Získané výsledky byly velmi příznivé k neoadjuvantní IT-IC. Myši, které dostávaly právě tuto léčbu, měly silnou imunologickou paměť proti recidivě nádoru po operaci a zároveň tato paměť sloužila jako prevence plicních metastáz. Na základě výsledků tohoto experimentu by bylo výhodné se nadále věnovat IT-IC jako případné neoadjuvantní imunoterapii pro prevenci recidivy (Aiken a kol., 2021).

V kombinaci s běžnými léčebnými terapiemi (především s radioterapií) představuje neoadjuvantní HIT-IT vhodnou metodu pro spuštění protinádorové imunity a zároveň slouží jako prevence recidivy rakoviny. Neoadjuvantním podáním HIT-IT by také mohlo být dosaženo cíle využít síly imunoterapie s minimalizací irAE (Champiat a kol., 2021; Hong a kol., 2020).

7.2.5 MBTA imunoterapie

Na Katedře medicínské biologie Jihočeské univerzity je již jedenáctým rokem rozvíjena nádorová imunoterapie založená na synergii látek stimulujících silnou vrozenou imunitní odpověď s následnou aktivací adaptivní imunity. Konkrétně se jedná o takzvanou MBTA terapii, která byla vyvinuta RNDr. Ženkou, CSc. a jeho kolegy. Tento inovativní imunoterapeutický přístup vykazuje závratné terapeutické odpovědi u myší se subkutánními nádory, včetně melanomu, adenokarcinomu pankreatu, feochromocytomu a sarkomu. V následující části bude tato imunoterapie spolu s jejími přednostmi blíže představena. Zároveň dojde k nastínění potenciálního přínosu zmiňované imunoterapie na léčbu pacienta.

7.2.5.1 Složky MBTA terapie

Jedná se o vakcinační strategii obsahující různé imunogenní složky, které stimulují jak vrozené, tak adaptivní imunitní reakce. Již z názvu této imunoterapie vyplývají její hlavní složky: manan-BAM, TLR ligandy a monoklonální anti-CD40 protilátka (MBTA).

První složkou je polysacharid **manan**, získaný z kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. Manan slouží v MBTA terapii jako ligand aktivující fagocytózu. Protože se jedná o polysacharid kvasinky, imunitní systém ho pomocí receptorů rozeznává jako PAMP. K jeho rozeznání dochází buď prostřednictvím manózu vázajícího lektinu (MBL), kdy jde o proces aktivující komplement, nebo manózovým receptorem (MR). K ukotvení mananu na nádorové buňky dochází pomocí druhé složky, kterou je tzv. BAM neboli biokompatibilní kotva pro buněčnou membránu (Lookian a kol., 2021).

BAM je název pro deriváty polyethylenglykolu (PEG), které se uplatnily svou schopností kotvit různé substráty k buněčnému povrchu. To jim umožňuje hydrofobní kyselina olejová, která působí jako kotva mezi buněčnou membránou. Uvádí se, že kyselina olejová má řadu příznivých účinků, mezi které patří zlepšení hojení ran a ochrana před rakovinou. BAM mají také hydrofilní konec umožňující navázání terapeutické látky (Sakai a kol., 2016).

Třetí složkou jsou **TLR agonisté**, které mohou zesilovat účinek PAMPs. Agonisté TLR se prokázaly jako velmi efektivní v aktivaci imunitních buněk a jejich zacílení do nádoru. Pro dosažení co nejsilnější synergie s ostatními složkami MBTA terapie se používá směs tří TLR agonistů obsahující resiquimod, polyinosin-polycytidylovou kyselinu a kyselinu

lipoteichoovou (LTA). Přidání poly(I:C) a LTA do směsi výrazně zvýšilo účinnost MBTA terapie (Caisová a kol., 2018).

Resiquimod (R-848) vykazuje silnou antivirovou a protirakovinnou aktivitu. Funguje jako agonista receptorů TLR7 a TLR8, kdy po vazbě na tyto receptory dojde k aktivaci DC. Zároveň R-848 stimuluje uvolňování cytokinů, jako je např. IL-6, TNF- α a INF- α (Farr a kol., 2021).

Poly(I:C) neboli polyinosin-polycytidylová kyselina je syntetická látka podobná dsRNA a je používána jako agonista TLR3, čímž aktivuje APC a spouští polarizaci makrofágů (Uher a kol., 2021; Lookian a kol., 2021).

LTA není pouze agonistou TLR2, ale je i důležitým ligandem scavengerových receptorů, které se nachází např. u makrofágů, monocytů, trombocytů a endoteliálních buněk. Po aktivaci zánětlivé dráhy TLR2 se zvyšuje sekrece TNF- α . Díky schopnosti LTA interagovat s buněčnými membránami usnadňuje rozpoznání nádorových antigenů dendritickými buňkami (Caisová a kol., 2018; Alquraini a El Khoury, 2020).

Poslední složkou MBTA je protilátka **anti-CD40**. Molekula CD40 patří do superrodiny TNF a zprostředkovává v organismu mnoho regulačních funkcí. Za normálních podmínek je molekula CD40 exprimována různými APC, jako např. DC, monocyty a B lymfocyty. Zároveň mohou být CD40 exprimovány na nádorových buňkách. CD40 se podílí na zánětlivých reakcích, kdy indukují zrání imunoglobulinů, sekreci cytokinů, a proliferaci B lymfocytů. Kromě toho intracelulární signalizace CD40 může vyvolávat apoptózu nádorových buněk. Použitím agonistické protilátky anti-CD40 je podpořena aktivita receptoru CD40 a tím i protinádorová imunitní odpověď (Li a Wang, 2020).

7.2.5.2 Mechanismus MBTA terapie

Prostředí nádoru je spolu s nádorovými buňkami velmi nestabilní a dochází k neustálým změnám antigenicity. Pro jejich rychlé rozpoznání představuje zapojení vrozené imunity do počáteční léčby značnou výhodu oproti adaptivní imunitě, která má opožděnou imunitní reakci. (Uher a kol., 2019)

Vrozená imunita má obtíže s rozpoznáním nádorových buněk. Pro jejich rozpoznání jsou součástí MBTA dvě složky, které vedou k aktivaci vrozené imunity. Přidáním mananu, jenž je ukotven na nádorové buňky pomocí BAM, se dosáhne toho, že manan slouží jako PAMP na nádorové buňce a po jeho rozpoznání prostřednictvím MBL se indukují fagocytární

buňky vrozené imunity. Další složkou aktivující vrozenou imunitu je směs tří TLR agonistů: R-848, poly(I:C) a LTA. Aplikace TLR agonistů spolu s ligandy aktivujícími fagocytózu se dokáže významně zvýšit schopnost imunitních buněk rozpoznat nádorové buňky. Zapojení specifické imunity je podporováno pomocí agonistické protilátky anti-CD40, která aktivuje CD4⁺ lymfocyty prostřednictvím vazby na ligand CD40L. Výsledkem je aktivace APC, které indukují adaptivní imunitní odpověď. Důležitou vlastností adaptivní imunity je schopnost imunitní paměti a podáním této terapie dochází k tvorbě paměťové protinádorové odpovědi (Medina a kol., 2020).

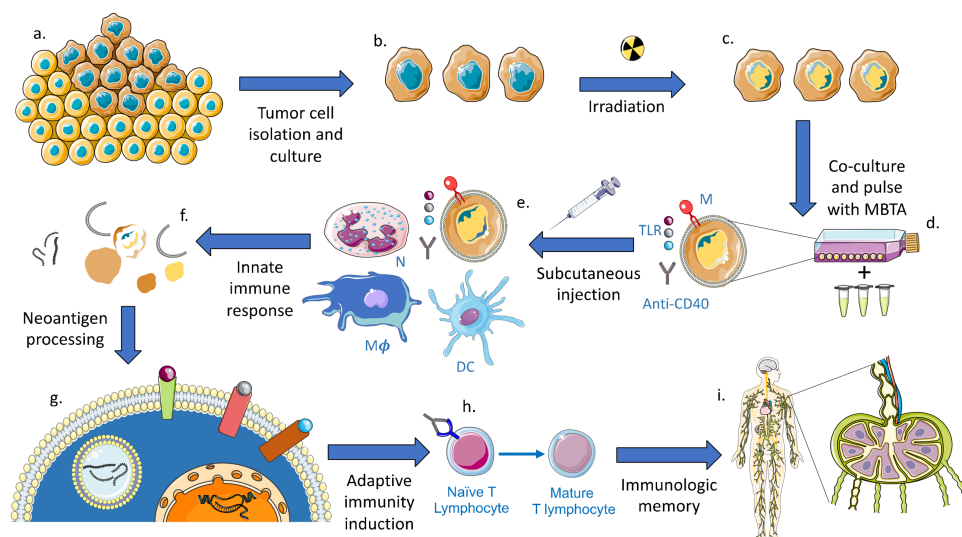
Vzájemné působení anti-CD40, R-848 a poly(I:C) vede k silnému synergickému efektu, který zajistí rozsáhlou expanzi APC a CD8⁺ paměťových buněk (Uher a kol., 2019).

7.2.5.3 Podání MBTA terapie pacientovi

Tento navrhovaný terapeutický přístup využívá primární nádor pacienta jako vakcinační materiál k vytvoření účinné vakcíny.

Nejprve dojde k odebrání nádorové tkáně od pacienta, která se izoluje a rozmnoží v buněčnou kulturu určenou k ozáření. Následně jsou ozářené nádorové buňky kultivovány se všemi složkami MBTA. Po kultivaci se ozářené nádorové buňky injektují subkutánně do periferního místa, aby bylo dosaženo účinné a trvalé imunitní odpovědi adaptivní imunity. Tento přístup nahrazuje přímé injektování samotného MBTA do nádorů, které připadá v úvahu pouze u těch nádorů, které to umožňují. Injektováním se zahájí lokální zánětlivá odpověď vrozené imunity a dojde k rychlému nástupu neutrofilů, makrofágů a DC. Zneškodněním ozářených nádorových buněk dojde k uvolnění antigenů, které jsou zpracovány APC a dochází k indukci adaptivní imunity a tvorbě protinádorové paměti (Lookian a kol., 2021).

Pro lepší představu je uveden obrázek 1 se schématem mechanismu MBTA terapie.



Obr. 1: Přehled mechanismu podání MBTA terapie (Lookian a kol., 2021)

7.2.5.4 Účinky a potenciál MBTA terapie

MBTA imunoterapie spojuje primární atak na úrovni vrozené imunity s následným zapojením adaptivní imunity. Tím dochází k několika významným krokům, které z MBTA terapie dělají velmi účinný léčebný mechanismus.

První a pravděpodobně nejdůležitější účinek MBTA je, že prezentací nádorových antigenů a zapojením adaptivní imunity dochází k navakcinování celého organismu vlastním nádorem. Tak dochází k působení MBTA na existující metastázy. Předpokladem je, že by tato terapie mohla sloužit i jako ochrana organismu před vznikem metastáz v důsledku imunosuprese vyvolané během operace (Ženka, ústní sdělení).

Několikrát byl také prokázán účinek specifické imunitní paměti, kdy díky svému dlouhodobému působení zabránila rozvoji rakoviny i po opakovaném injektování aktivních nádorových buněk. Tento experiment potvrdil princip nádorových vakcín, kde je nutnost opakované aplikace k rozvoji silné adaptivní imunitní odpovědi. K potvrzení došlo po pozorování jevu, kdy myši s rychlou počáteční eliminací subkutánních nádorů vykazovaly sníženou odpověď u metastatických lézí oproti myším, u kterých došlo k eliminaci nádoru během prvních tří týdnů. Důvodem je krátkodobá stimulace nádorovými antigeny vedoucí k nedostatečné aktivaci adaptivní imunity (Caisová a kol., 2019).

Mnoho imunoterapeutických přístupů je cíleno na jednotlivé konkrétní nádorové antigeny a dochází k účinnosti pouze u některých typů rakoviny. Důvodem neúspěšné léčby některých nádorů je jejich vysoká intratumorální heterogenita. Takovým nádorem je například glioblastom (GBM). Pomocí MBTA terapie je možné obejít tuto nádorovou heterogenitu,

protože je tato terapie založena na úplném antigenním profilu a lze ji použít i bez nutnosti zaměření se na konkrétní antigen (Lookian a kol., 2021).

V porovnání s ICIs vykazuje MBTA řadu výhod. U ICIs je jejich účinnost silně orientována na adaptivní imunitu, kdy za využití inhibitorů a aktivátorů kontrolních bodů může dojít k eliminaci imunosupresivních mechanismů nádorových buněk. ICIs představují systémovou léčbu a v důsledku podání protilátek proti inhibičním kontrolním bodům může nastat riziko autoimunity. Účinnost ICIs je poměrně nízká a to pouze u některých nádorů (Michot a kol., 2016). Podle vyjádření dr. Ženky je z důvodu léčebné strategie MBTA terapie principiálně jedno, o jaký typ nádoru při léčbě půjde. Důvodem je unikátnost vakcíny, kterou se pacient bude léčit. Té je dosaženo tak, že právě léčený nádor slouží jako vakcinační materiál až do doby jeho resekce a na světě nenarazíme na dva antigenně totožné nádory. I když se u pacientů bude léčit stejný typ nádoru, nikdy nebude vykazovat stejné složení buněk a látek nádorového mikroprostředí. Například melanom může vykazovat každých 14 dní nové poměry složení a pozměněnou antigenicitu. MBTA představuje tedy terapii, která se umí přizpůsobit jakémukoliv nádoru a je stoprocentně personalizovaná (Ženka, ústní sdělení).

Prokázán je také efekt MBTA terapie na zmenšení nádoru. Zároveň se při léčbě myši nakažených Panc02 (adenokarcinom pankreatu) prokázala možnost úplné eradikace nádoru. U menších nádorů Panc02 byla úplná eradikace 80 %. Překvapivé bylo zjištění, že u větších nádorů Panc02 se pomocí MBTA dosáhlo až 67 % úplné eradikace nádoru (Caisová a kol., 2018). Další experimenty prokázaly 100% rezistenci proti opakovaně podaným nádorovým buňkám Panc02. Aby se ověřilo, zda je imunologická paměť indukovaná terapií MBTA antigenně specifická, provedly se další experimenty. V experimentech byly použity myši s eradikovanými nádory Panc02 pomocí MBTA terapie a byly jim znovu podány nejen nádorové buňky Panc02 ale, i buňky melanomu B16-F10. Všechny myši vykazovaly rezistenci vůči Panc02, zatímco proti B16-F10 nebyla žádná rezistence. Tím došlo k potvrzení, že imunologická paměť indukovaná MBTA terapií je antigenně specifická (Caisová a kol., 2019).

Budoucím použitím MBTA terapie může být její potenciální účinnost při léčbě pacientů s inoperabilními nádory. V případě operabilních nádorů spatřujeme perspektivu v neoadjuvantním použití MBTA, kdy pomocí imunoterapie nejen zmenšíme objem nádoru před operací, ale zároveň vlastním nádorem organismus navakcinujeme. V tom spatřujeme význam na úrovni potlačení vzniku eventuálních metastáz (Uher a kol., 2019).

7.3 Typy maligních nádorů léčených neoadjuvantní imunoterapií

Značná množství klinických studií již prokázala, že u několika typů nádorů je bezpečná neoadjuvantní imunoterapie. Účinnost imunoterapie je velmi variabilní mezi různými typy nádorů a zároveň je omezena různými imunoterapeutickými léky (Bilusic, 2022).

V současnosti je neoadjuvantní imunoterapie schválena FDA (Úřad pro kontrolu potravin a léčiv) pouze v kombinaci s chemoterapií u trojitě negativního karcinomu prsu (TNBC) a nemalobuněčného karcinomu plic (NSCLC). Probíhající a budoucí klinické studie by mohly objasnit roli neoadjuvantní imunoterapie u mnoha jiných typů rakoviny (Mittendorf a kol., 2022). Největší pokroky jsou u probíhajících klinických studií zaznamenány u melanomu, rakoviny močového měchýře a NSCLC (Bilusic, 2022).

Většina probíhajících klinických studií je u NSCLC, rakoviny močového měchýře a rakoviny hlavy a krku s využitím různých postupů léčby a kombinací protilátek blokujících CTLA-4, PD-1 nebo PD-L1. Řada dalších klinických studií probíhá např. s melanomem, rakovinou vaječníků, rakovinou slinivky břišní, rakovinou prsu, kolorektálním karcinomem a sarkomem. U těchto klinických studií se kombinují různé ICI nebo dochází ke kombinaci ICI s konvenčními terapiemi, nejčastěji chemoterapií a radioterapií (O'Donnell a kol., 2019).

Zároveň je nutné zmínit, že u malého počtu pacientů může dojít k nezpůsobilosti provedení operace. Tato nezpůsobilost může být způsobena kvůli progresi onemocnění, pseudoprogresi nebo nežádoucími účinky souvisejícími s uskutečněnou léčbou (Forde a kol., 2018). Z těchto důvodů nepodstoupí operaci přibližně 10 % až 15 % pacientů, kterým byla podána neoadjuvantní imunoterapie s ICI (Benitez a kol., 2020).

U neoadjuvantní ICI je mezi účinností a imunitně podmíněných nežádoucích účincích (irAE) silná nezávislost. Toto tvrzení vychází ze studie, kdy pacientům s melanomem stádia III byly neoadjuvantně podávány ICI v kombinaci (ipilimumab a nivolumab). Předpokladem bylo, že léčbou vyvolané irAE mají vliv na účinnost ICI. Léčba ale vyvolala u vysokého podílu pacientů patologickou odpověď, a to i přes vyšší toxicitu, ke které kombinací léčiv došlo. Z důvodu této nezávislosti mezi účinností a toxicitou je důležité předem identifikovat pacienty, u kterých je pravděpodobné, že budou reagovat na ICI léčbu a není u nich vyšší pravděpodobnost rozvoje závažných irAE (O'Donnell a kol., 2019; Rozeman a kol., 2019).

7.4 Neoadjuvantní imunoterapie v souvislosti s jinými léčebnými postupy

Již několikrát bylo v této práci zmíněno vhodné využití imunoterapie v kombinaci s jinými léčebnými postupy. Na základě získaných poznatků se neoadjuvantní imunoterapie jeví jako ideální v kombinaci s chirurgickým zákrokem pro dosažení celkového uzdravení jedince. Zároveň by správně zvolená neoadjuvantní imunoterapie mohla nahradit jinou léčebnou metodu, která se běžně podává neoadjuvantně, ale s četným množstvím negativních účinků.

7.4.1 Imunosuprese vyvolána chirurgickým zákrokem

V současné době zůstává chirurgické vyjmutí nádoru hlavní léčebnou metodou. Před více než jedním stoletím začaly vznikat první hypotézy o negativním vlivu operace na léčbu rakoviny, nikdy však tyto hypotézy nebyly plně prokázány nebo přijímány (Demicheli a kol., 2008). V roce 2020 bylo ale dokázáno, že chirurgický zásah významně ovlivňuje imunitní systém léčeného jedince vyvoláním imunosuprese. (Tang a kol., 2020).

7.4.1.1 Projev imunosuprese vyvolané chirurgickým zákrokem

Imunosuprese je stav snížené imunity, kdy imunitní systém není schopen plně reagovat na cizorodé antigeny. Kromě chirurgického zákroku může imunosupresi vyvolat také i chemoterapie a radioterapie (Rice, 2019). Rozsah zákroku má také vliv na míru imunosuprese, čím invazivnější operace, tím horší imunosuprese může u léčeného jedince nastat. Časové rozmezí snížené imunity po operaci může být několik dní nebo také až 6 měsíců (Tang a kol., 2020).

Chirurgické operace představují velký stres pro imunitní systém, který je zákrokem narušen. Při resekci nádoru bývá obvykle odstraněna i normální tkáň nebo lymfatické uzliny v oblastech odvádějících nádorovou tkáň a tím dochází k zásahu do imunity jedince (Tang a kol., 2020; Melero a kol., 2016). Takové narušení vede k potlačení protinádorové imunity, např. ke snížení celkového počtu CD8⁺ T buněk a NK buněk, které sekretují IFN- γ (Krall a kol., 2018; Angka a kol., 2018). Chirurgií také dochází k uvolňování a šíření cirkulujících nádorových buněk (CTC) z důvodu jejich nerozeznání potlačenou protinádorovou imunitou, která tak umožňuje jejich přežití. Operací způsobený stres imunitního systému podporuje u CTC jejich proliferaci a zároveň v nich indukuje změny vedoucí k metastatickému růstu (Tohme a kol., 2017).

Již v roce 1989 vyšel článek s výsledky experimentu, který poukázal na vliv chirurgického traumatu na tvorbu experimentálních metastáz. K experimentu byly využity syngenní myši, kterým byly intravenózně injektovány buňky myšího karcinomu mléčné žlázy (TA3Ha). Myši byly rozděleny do tří skupin, kdy jim následně bylo injektováno 10^5 , 10^6 a dvakrát 10^6 nádorových buněk TA3Ha. Nejprve došlo k injektování nádorových buněk myším bez chirurgického zákroku, kdy u žádné skupiny nedošlo k rozvoji nádoru. Poté se během experimentu různě porovnávaly dávky nádorových buněk u operovaných a neoperovaných myší. Obzvláště zajímavou součástí experimentu bylo injektování 10^5 nádorových buněk myším 1,7 a 10 dní po operaci jater. Výsledky potvrdily, že chirurgické trauma přispívá k tvorbě metastáz, kdy injektování nádorových buněk 1 den po operaci vedlo k tvorbě nádoru u 36 % myší, zatímco u třetí skupiny, které byly nádorové buňky injektovány 10 dní po operaci, byl výskyt nádoru na 0 %. Experiment také podpořil úvahu, že zánět spojený s hojením ran napomáhá růstu nádoru (Murthy a kol., 1989).

Zánět bývá vyvolán v reakci na tkáňové trauma, kdy dochází k aktivaci vrozené imunity. Nejvíce se na iniciaci a následném udržení zánětu podílejí molekuly DAMPs (Damage-associated molecular patterns), které se u pacientů po operaci vyskytují ve vyšších koncentracích (Tang a kol., 2020). Zánětlivá reakce je zásadní nejen v obraně hostitele proti mikrobiální infekci, ale také v opravě a regeneraci tkáně. Změny spojené se zánětlivou reakcí pravděpodobně poskytují vhodné podmínky pro zachycení CTC a jejich následný růst nejen lokálně, ale i na vzdálených místech v podobě metastáz (Tohme a kol., 2017). Vliv má operace a zánět také pravděpodobně na probuzení tzv. spících nádorových buněk (DCC). Jedná se o nádorové buňky, které se již během progresu primárního nádoru rozšířily do vzdálených míst a tam vstoupily do dormance, přičemž nedochází k jejich zvětšování. Tyto DCC jsou velmi těžce detekovatelné nejen současnými lékařskými postupy, ale i samotným imunitním systémem (Park a Nam, 2020).

7.4.1.2 Snížení imunosuprese pomocí neoadjuvantní imunoterapie

Problém pooperačního imunosupresivního stavu představuje nejen vysoká pooperační recidiva, ke které dochází u 20-66 % operovaných, ale hlavně vysoká úmrtnost způsobena vzniklými metastázami po resekci primárního nádoru (Tang a kol., 2020). S vysokou metastatickou recidivou se setkávají především pacienti s nádorem prsu, kolorektálním karcinomem a rakovinou plic (Riihimäki a kol., 2018). Dodnes není metastatická recidiva

zcela vysvětlena, a to brání nejen vývoji, ale i aplikaci účinných léčebných metod, které by mohly potenciálně snížit tvorbu metastáz.

Na základě poznatků z několika studií se jeví neoadjuvantní imunoterapie v kombinaci s chirurgickým zákrokem jako nadějná metoda, jak imunosupresi zabránit a tím tedy i zmírnit potenciální metastatickou recidivu vyvolanou chirurgickým zákrokem (Bakos a kol., 2018).

Například podání imunoterapie zaměřené na posílení NK buněk před operací by mohlo předejít jejich sníženému počtu v reakci na chirurgické trauma. Vliv sníženého množství nebo cytotoxicity NK buněk na recidivu nádoru byl prokázán již několikrát nejenom preklinickými studiemi, ale také těmi klinickými. V roce 2012 byly provedeny dvě klinické studie, kdy se odběrem krve u pacientů s rakovinou zjišťovala cytotoxicita NK buněk na nádorové buňky K562. V první studii byla krev odebrána dvěma pacientům s rakovinou v různých časových bodech okolo chirurgického zákroku. Výsledky potvrdily sníženou cytotoxicitu NK buněk v 1. a 3. den postoperačně. Hodnoty z preoperačního dne dosáhli pacienti až 29. a 36. den postoperačně. V rámci druhé studie šlo o pozorování vlivu podání oslabeného kmene viru vakcinie neoadjuvantně na cytotoxicitu NK buněk. Krev byla odebrána dvěma pacientům, jako tomu bylo u první studie, a zároveň byla odebrána i jednomu zdravému jedinci pro kontrolu výsledků. Z vyhodnocených dat vychází, že po podání neoadjuvantní vakcinace došlo ke zvýšení cytotoxicity NK buněk u obou pacientů ve srovnání s kontrolní krví (Tai a kol., 2012).

Další možnou terapií, která by mohla působit proti stavu imunosuprese v důsledku narušení imunitní rovnováhy je MBTA. Zde je hlavní myšlenkou, že by došlo k posílení imunity ještě v době před operací a zároveň by byla vytvořena imunitní paměť, která by působila na nádorové buňky po operaci. Toho lze docílit právě pomocí MBTA, která používá k imunizaci složky vrozené i adaptivní imunity. Nešlo by pouze o ochranu před uniklými nádorovými buňkami z odstraňovaného nádoru, ale i o zneškodnění nádorových buněk, které kolují v krvi spolu s případnými mikrometastázami. U mnoha nádorových buněk nemusí dojít k propuknutí onemocnění, protože jsou udržovány imunitním systémem. Velký stres spojený s operací působí imunosupresivně a posouvá rovnováhu imunity ve směru rozvoje metastáz. Cílem MBTA je posun této rovnováhy ve prospěch imunity, aby byl imunitní systém připraven na resekci nádoru a zabránil komplikacím a recidivě onemocnění (Ženka, ústní sdělení).

Uskutečněné studie nám podporují hypotézu, že podáním neoadjuvantní imunoterapie by mohlo dojít k překonání pooperační imunosuprese a k odstranění vzniklých nebo potenciálních metastáz. Mezi slibné patří zejména terapie, které mohou aktivovat jak

adaptivní, tak vrozenou imunitu léčeného jedince. V zájmu dosažení lepších výsledků u onkologických pacientů by mělo být bližší zkoumání neoadjuvantní imunoterapie, která by již v době operace připravila imunitu k boji s nádorovými buňkami a zároveň by snížila vyvolanou imunosupresi a omezila její důsledky (Bakos a kol., 2018; Ženka, ústní sdělení).

7.4.2 Porovnání s neoadjuvantní chemoterapií

V kombinaci s chirurgickým zákrokem představuje neoadjuvantní podání některé z běžně užívaných léčebných metod výhody oproti adjuvantnímu podání. Neoadjuvantní chemoterapie se také může u některých typů nádorů používat jako standardní terapie, např. u osteosarkomu. Při podání chemoterapie před chirurgickým zákrokem je hlavním cílem zmenšit nádory a přispět tak k usnadnění jejich kompletní resekce. Předoperační podání chemoterapie také pravděpodobně způsobuje, v porovnání s pooperačním podáním, méně nežádoucích účinků (Lordick a Gockel, 2016). Výhodu také představuje pozorování odpovědi pacienta na neoadjuvantní chemoterapii. Pozorování může vést ke stanovení přesnější diagnózy a optimalizaci plánovaného chirurgického zákroku, nebo včasné změně léčebného plánu (Hayes a Schott, 2015).

I přes veškeré výhody neoadjuvantní chemoterapie je zde stále mnoho negativních účinků, které podporují hypotézu, že neoadjuvantní imunoterapie je výhodnější léčebnou metodou v kombinaci s chirurgickým zákrokem. Během podstupování neoadjuvantní terapie by mělo být snahou plně využít této doby ke zlepšení celkového zdravotního stavu pacienta (Lordick a Gockel, 2016). U pacientů podstupujících chemoterapii běžně dochází k mnoha negativním účinkům, které ovlivňují jejich běžný život (Arunachalam a kol., 2021).

Ačkoli se během imunoterapie i chemoterapie léčí pomocí léků, obě tyto metody fungují na rozdílném principu. Zatímco chemoterapie působí na rychle rostoucí buňky a brání v jejich proliferaci, imunoterapie pomáhá imunitnímu systému lépe identifikovat nádorové buňky, jejich napadení a následnému zneškodnění (Rowden, 2021).

Chemoterapie není schopna rozpoznat nádorové buňky a působí i na normální buňky v těle. Problém představuje zejména schopnost chemoterapeutických léčiv vyvolat myelosupresi, a tím dochází také k vyvolání imunosuprese. K myelosupresi dochází snížením aktivity kostní dřeně, a dochází k útlumu krvetvorby, kdy klesá tvorba erytrocytů, trombocytů a leukocytů. Právě snížená tvorba leukocytů přispívá k imunosupresi (Steele, 2002). Snížená funkce imunitního systému vede ke zvýšenému riziku onemocnění infekční chorobou a

pacient může být ohrožen na životě. Propuknutí infekčního onemocnění je hlavní příčinou úmrtí pacientů s rakovinou (Elhadi a kol., 2021).

U chemoterapeutických léčiv je hranice přínosu a toxicity v poměrně těsném vztahu, obzvláště pokud se chemoterapie nepoužívá jako primární léčebná metoda (Krzyzanowska a kol., 2005). Imunoterapie představuje léčebnou terapii, která oproti chemoterapii indukuje imunologickou paměť imunitního systému a zároveň ho aktivuje proti rakovině. Pro dosažení dlouhodobých léčebných účinků je imunitní paměť nezbytná. Díky posílení imunitního systému pomocí imunoterapie může dojít také ke snížení nežádoucích účinků. Zásahu na tom, kromě imunologické paměti, mají pravděpodobně mechanismy autotolerance vlastních antigenů u T a B lymfocytů, kdy např. aktivní imunizace protinádorovými vakcínami vede k mírným vedlejším účinkům (Schirmacher, 2019).

8 Návrh experimentu s neoadjuvantní imunoterapií melanomu (B16-F10)

Na základě získaných poznatků o neoadjuvantní imunoterapii se potvrdilo, že se jedná o velmi nadějnou nádorovou terapii. Domníváme se, že MBTA imunoterapie v neoadjuvantním provedení představuje vhodnou léčebnou terapii, která by v budoucnosti mohla mít rozsáhlé využití. Pro zavedení MBTA do standardní praxe je potřeba uskutečnit ještě několik experimentů, které by pomohly urychlit zavedení preklinických a následně klinických studií.

Na základě předložených materiálů od dr. Ženky navrhují provedení dalšího experimentu na obtížně léčitelném myším melanomu B16-F10. Záměrem experimentu by mělo být pozorování výskytu imunosuprese po resekci primárního nádoru s cílem poukázání na škodlivost operace.

Chceme prokázat, že je vhodnější s operací počkat a před ní nejprve navakcinovat organismus vlastním nádorem.

Do pokusu bude zařazeno 36 myší.

V den -12 píchnout 30 myším s.c. do pravé slabiny po 400 000 B16-F10 buněk.

V den -6 píchnout všem 36 myším s.c. do levé slabiny po 200 000 B16-F10 buněk (reprezentují metastázy).

V den 0 rozdělit myši po šesti do šesti skupin:

- 1/ aplikace 50 μ l MBTA do pravého nádoru ve dny 0, 1, ... 7, 8, ... 14, 15
- 2/ aplikace 50 μ l PBS do pravého nádoru ve dny 0, 1, ... 7, 8, ... 14, 15
- 3/ odoperování pravých nádorů v den 2
- 4/ aplikace 50 μ l MBTA do pravého nádoru ve dny 0, 1, ... 7, 8, ... 14, 15, jejich odoperování v den 17
- 5/ aplikace 50 μ l PBS do pravého nádoru ve dny 0, 1, ... 7, 8, ... 14, 15, jejich odoperování v den 17
- 6/ myši bez pravého nádoru, v den 2 mimikrování operace pravé slabiny

Měření velikosti nádorů bude prováděno obden, místo po odoperování nádorů bude pouze sledováno. Klíčovým bude růst nádorů v levé slabině.

9 Diskuse

Neoadjuvantní imunoterapie představuje nadějný terapeutický přístup, s jehož použitím by mohla být usnadněna léčba nádorových onemocnění. I přestože radikální chirurgický zákrok vede u řady pacientů k úplnému vyléčení, velká část pacientů recidivuje v důsledku imunosuprese. Právě neoadjuvantní imunoterapie představuje účinný způsob, jak předejít rozsahu zákroku zmenšením velikosti nádoru, a tím zmírnit či zabránit imunosupresi.

Podání imunoterapie před chirurgickým zákrokem nabízí kromě zmenšení velikosti nádoru i další výhody. Pozitivně přijímanou hypotézou je, že ponechání celého nádoru po dobu podávání neoadjuvantní imunoterapie vyvolá silnější a širší imunitní odpověď T buněk. Tato hypotéza byla podpořena preklinickou studií z roku 2016, kdy došlo k expanzi nádorově specifických CD8⁺ T buněk v periferní krvi po podání neoadjuvantní imunoterapie (Liu a kol., 2016). Je prokázáno že podání imunoterapie neoadjuvantně usnadňuje interakce mezi buňkami imunitního systému s nádorovým mikroprostředím. Důvodem je, že nedošlo k narušení struktury lymfatického systému a imunitní systém není zatížen léčbou operovaného místa. To z neoadjuvantní imunoterapie činí více efektivní v posílení imunitního systému, než je tomu u adjuvantní imunoterapie (Bilusic, 2022).

I přes veškeré zmíněné výhody, co by tato léčebná metoda mohla poskytnout, nebo co již poskytuje, je důležité zmínit, že je stále mnoho nezodpovězených otázek. Mezi tyto otázky patří především ty, které se týkají ideálního načasování a délky, po kterou bude neoadjuvantní imunoterapie podávána s ohledem na plánovanou resekci nádoru. S tím souvisí také nezodpovězené otázky ohledně počtu předoperačních dávek a stanovení časového intervalu mezi dávkami. Dále se jedná o otázky ohledně predikce reaktivity pacienta na podanou léčbu. Obecně lze říci, že neoadjuvantní imunoterapie je poměrně nový termín a bude podléhat dalším výzkumům.

Aktuálním problémem klinicky používané adjuvantní i neoadjuvantní imunoterapie se zdá být vyhodnocení pacientů, u kterých by mohla být daná imunoterapie přínosná. Jedním z důvodů je pravděpodobně nedostatek znalostí ohledně mechanismů úniku rakoviny před imunitním systémem. Další problém představuje chybějící diagnostický nástroj, který by mohl pomoci lékaři vyhodnotit a předpovědět pravděpodobnou léčebnou odpověď na zvolenou terapii. Existence diagnostického nástroje by pomohla selektování pacientů, pro které bude

konkrétní imunoterapie přínosná, nebo by se na základě získaných dat změnil navrhovaný terapeutický přístup (Galli a kol., 2020).

Nedefinováno zůstává i optimální rozvržení neoadjuvantní imunoterapie a chirurgického zákroku (Liu a kol., 2019). Pro stanovení optimálního rozvržení je ale důležité porozumět, kdy přesně dochází k rozvoji dostatečné imunitní odpovědi (např. expenzi T buněk) a v jakém bodě dochází opět k negativnímu ovlivnění těchto parametrů nádorem (O'Donnell a kol., 2019). Vhodné načasování léčby je důležité u všech strategií neoadjuvantní imunoterapie, nejedná se pouze o kombinaci s chirurgickým zákrokem. Pro maximalizování účinnosti a bezpečnosti je důležité rozšířit nynější vědomosti načasování podání látek stimulujících imunitu (Liu a kol., 2019; Hong a kol., 2020).

V bakalářské práci byla také porovnána neoadjuvantní chemoterapie s neoadjuvantní imunoterapií. Hlavním cílem bylo poukázat na imunosupresivní účinky chemoterapie a jejich efekt na imunitu léčeného jedince. Chemoterapie není zaměřená pouze na nádorové buňky a negativně tím ovlivňuje pacienta v mnoha aspektech života. Zásadním se jeví negativní vliv chemoterapie na krvetvorbu, kdy se snižuje i tvorba leukocytů. Imunitní systém hraje důležitou roli v boji s rakovinou a snížená tvorba leukocytů vede k imunosupresi, která může pacienta ohrozit. Porovnáním chemoterapie a imunoterapie došlo k validaci myšlenky, že chirurgický zákrok v kombinaci s neoadjuvantní imunoterapií by spíše přispěl ke zlepšení výsledků pacienta a jeho rekonvalescenci po resekci primárního nádoru (Burton a kol., 2022).

Momentálně chybí imunoterapie, která by vedla ke zlepšení imunitního systému před operací tak, aby se zabránilo imunosupresi a zároveň se přispělo k celkovému uzdravení jedince po operaci.

Právě MBTA imunoterapie vyvíjena pod vedením dr. Ženky představuje unikátní léčebnou terapii, která spojuje primární atak na úrovni vrozené imunity s následným zapojením adaptivní imunity. Její unikátnost spočívá v použití léčeného nádoru jako vakcinačního materiálu, kterým se navakcinuje celý organismus pacienta. Zapojením adaptivní imunity dochází k tvorbě antigenně specifické imunitní paměti, která účinně reaguje na případné metastázy, které se mohou v důsledku imunosuprese po chirurgickém zákroku projevit.

Neoadjuvantní imunoterapie je v dosavadní době schválena pro léčbu několika typů rakoviny, jako např. karcinom prsu a NSCLC. Zavedením MBTA terapie by mohlo dojít k rozšíření léčby všech nádorů. Důvodem je, že MBTA terapie využívá k tvorbě vakcinace

nádorové buňky přímo od pacienta a je tedy stoprocentně personalizovaná. Z toho vyplývá, že její účinnost je antigenně specifická proti léčenému nádoru.

Důležité je zmínit, že neoadjuvantní imunoterapie nemá za cíl odstranění primárního nádoru. Předpokládá se, že její největší potenciál je v kombinaci s chirurgickým zákrokem. Podle dr. Ženky (ústní sdělení) by měla účinná neoadjuvantní imunoterapie dosahovat tří hlavních cílů. Protože se jedná o imunoterapii podávanou před hlavní léčebnou metodou, nejčastěji chirurgickým zákrokem, mělo by dojít k posílení imunitního systému, aby došlo nejen k připravenosti organismu před zákrokem, ale zároveň ke zmenšení nádoru a tím i menší invaznosti prováděného zákroku. Dosažením tohoto cíle může dojít až k potlačení imunosuprese, která je standardně vyvolaná chirurgickým zákrokem. Zároveň by měla eliminovat všechny cirkulující nádorové buňky a případné metastázy, aby bylo zabráněno recidivě onemocnění. Dalším cílem by měla být budoucí ochrana proti metastázám, které by se případně mohly objevit již v době po zákroku. MBTA imunoterapií jsme schopni dosáhnout všech výše zmíněných cílů.

10 Závěr

- Byla provedena rešerše shrnující současné poznatky o neoadjuvantní nádorové imunoterapii.
- Byl vypracován návrh experimentu za použití neoadjuvantní imunoterapie na myším melanomu B16-F10.

11 Seznam použitých zkratk

ADCC – buněčná cytotoxicita závislá na protilátce

anti-CD40 – protilátka proti molekulám CD40

APC – antigen prezentující buňky

BAM – biokompatibilní kotva membrán

CD4 – koreceptor pomocného T lymfocytu

CD40L – ligand CD40

CD8 – koreceptor cytotoxického T lymfocytu

CDC – cytotoxicita závislá na komplementu

CEA – karcino-embryonální antigen

CLR – c-type lectin receptors

CTC – cirkulující nádorové buňky

CTLA-4 – cytotoxic T-lymphocyte antigen 4

DAMPs – damage-associated molecular patterns

DC – dendritické buňky

DCC – spící nádorové buňky

dsRNA – dvouvláknová ribonukleová kyselina

EMT – epiteliálně mezenchymální tranzice

GBM – glioblastoma multiforme (glioblastom)

GD2 – disialogangliosid

HIT-IT – lidská intratumorální imunoterapie

IFN – interferon

IFNGR – interferon-gamma receptor

Ig – imunoglobulin

IL – interleukin

irAE – imunitně podmíněné nežádoucí účinky

ICIs – inhibitory imunitních kontrolních bodů

IT-IC – intratumorální podání imunocytkinu

LTA – kyselina lipoteichoová

mAb – monoklonální protilátka

MBL – manózu vázající lektin

MBTA – manan-BAM, TLR ligandy, anti-CD40 imunoterapie

MHC – hlavní histokompatibilní komplex

MR – manózový receptor

NET – neutrofilní extracelulární past

NK – přirozený zabiják (natural killer)

NSCLC – nemalobuněčný karcinom plic (non-small lung cancer)

PAMPs – pathogen associated molecular patterns

PBS – phosphate buffered saline

PD-1 – programmed cell death protein 1

PD-L1 – programmed death ligand 1

PD-L2 – programmed death ligand 2

PEG – polyethylenglykol

PHEO – feochromocytom

Poly(I:C) – kyselina polyinosinická-polycytidylická

PSA – prostatický specifický antigen

PRR – pattern recognition receptor

R-848 – resiquimod

TA3Ha – karcinom mléčné žlázy

TAN – neutrofily spojené s nádorem

Tc – cytotoxický T lymfocyt

TCR – receptor T lymfocytu

Th – pomocný T lymfocyt

TLR – Toll-like receptor

TM – nádorové markery (tumor markers)

TNBC – trojitě negativní karcinom prsu (triple-negative breast cancer)

TNF – tumor necrosis factor

VEGF – vascular endothelial growth factor

12 Použitá literatura

ABBAS, Z., & REHMAN, S. (2018). An Overview of Cancer Treatment Modalities. In H. N. SHAHZAD, *Neoplasms* (pp. 139-157). IntechOpen.

ABEL, A. M., YANG, C., THAKAR, M. S., & MALARKANNAN, S. (2018). Natural Killer Cells: Development, Maturation, and Clinical Utilization. *Frontiers in Immunology*, 9(1869).

ACKERMAN, R. S., MUNCEY, A. R., ALDAWOODI, N. N., KOTHA, R., & GARCIA GETTING, R. E. (2022). Cancer Immunotherapies: What the Perioperative Physician Needs to Know. *Current Oncology Reports*, 24(4), 399-414.

AHERN, E., SOLOMON, B. J., HUI, R., PAVLAKIS, N., O'BYRNE, K., & HUGHES, B. G. M. (2021). Neoadjuvant immunotherapy for non-small cell lung cancer: right drugs, right patient, right time?. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 9(6), 2248.

AIKEN, T. J., KOMJATHY, D., RODRIGUEZ, M., FEILS, A., GILLIES, S. D., ERBE, A. K., RAKHMILEVICH, A. L., & SONDEL, P. M. (2021). Short-course neoadjuvant intratumoral immunotherapy establishes immunologic memory in murine melanoma. *Journal of Clinical Oncology*, 39(15), 21561.

ALQURAINI, A., & EL KHOURY, J. (2020). Scavenger receptors. *Current Biology*, 30(14), R790-R795.

AMES, B. N., 2010. Prevention of Mutation, Cancer, and Other Age-Associated Diseases by Optimizing Micronutrient Intake. *J Nucleic Acids*, 2010(725071).

AMJAD, M. T., CHIDHARLA, A., & KASI, A. (2022). Cancer Chemotherapy. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.

ANGKA, L., MARTEL, A. B., KILGOUR, M., JEONG, A., SADIQ, M., TANESE DE SOUZA, C., BAKER, L., KENNEDY, M. A., KEKRE, N., & AUER, R. C. (2018). Natural Killer Cell IFN γ Secretion is Profoundly Suppressed Following Colorectal Cancer Surgery. *Annals of Surgical Oncology*, 25, 3747-3754.

ARUNACHALAM, S. S., SHETTY, A. P., PANNIYADI, N., MEENA, C., KUMARI, J., RANI, B., DAS, P., & KUMARI, S. (2021). Study on knowledge of chemotherapy's adverse effects and their self-care ability to manage - The cancer survivors impact. *Clinical Epidemiology and Global Health*, 11.

BAKOS, O., LAWSON, C., ROULEAU, S., & TAI, L. -H. (2018). Combining surgery and immunotherapy: turning an immunosuppressive effect into a therapeutic opportunity. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 6(86).

BARBOSA, A. M., GOMES-GONÇALVES, A., CASTRO, A. G., & TORRADO, E. (2021). Immune System Efficiency in Cancer and the Microbiota Influence. *Pathobiology*, 88(2), 170-186.

BASKAR, R., LEE, K. A., YEO, R., & YEOH, K. -W. (2012). Cancer and Radiation Therapy: Current Advances and Future Directions. *International Journal of Medical Sciences*, 9(3), 193-199.

BEATTY, G. L., & GLADNEY, W. L. (2015). Immune escape mechanisms as a guide for cancer immunotherapy. *Clinical Cancer Research*, 21(4), 687-692.

BEHL, A., WANI, Z. A., DAS, N. N., PARMAR, V. S., LEN, C., MALHOTRA, S., & CHHILLAR, A. K. (2023). Monoclonal antibodies in breast cancer: A critical appraisal. *Critical Reviews in Oncology / Hematology*, 183(103915).

BENITEZ, J. C., REMON, J., & BESSE, B. (2020). Current Panorama and Challenges for Neoadjuvant Cancer Immunotherapy. *Clinical Cancer Research*, 26(19), 5068–5077.

BILUSIC, M. (2022). What are the advantages of neoadjuvant immunotherapy over adjuvant immunotherapy?. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 22(6), 561–563.

BILUSIC, M., & GULLEY, J. L. (2021). Neoadjuvant Immunotherapy: An Evolving Paradigm Shift?. *Journal of the National Cancer Institute*, 113(7), 799–800.

BISSELL, M. J., & RADISKY, D. (2001). Putting Tumours in Context. *Nature Reviews Cancer*, 1(1), 46-54.

BONILLA, F. A., & OETTGEN, H. C. (2010). Adaptive immunity. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2), 33-40.

BURTON, E. M., AMARIA, R. N., CASCONI, T., CHALABI, M., GROSS, N. D., MITTENDORF, E. A., SCOLYER, R. A., SHARMA, P., & ASCIERTO, P. A. (2022). Neoadjuvant immunotherapy across cancers: meeting report from the Immunotherapy Bridge—December 1st–2nd, 2021. *Journal of Translational Medicine*, 20(271).

CAISOVÁ, V., UHER, O., NEDBALOVÁ, P., JOCHMANOVÁ, I., KVARDOVÁ, K., MASÁKOVÁ, K., KREJČOVÁ, G., PAĐOUKOVÁ, L., CHMELAR, J., KOPECKÝ, J.,

& ŽENKA, J. (2018). Effective cancer immunotherapy based on combination of TLR agonists with stimulation of phagocytosis. *International Immunopharmacology*, 59, 86-96.

CAISOVA, V., LI, L., GUPTA, G., JOCHMANOVA, I., JHA, A., UHER, O., HUYNH, T. -T., MIETTINEN, M., PANG, Y., ABUNIMER, L., NIU, G., CHEN, X., KUMAR GHAYEE, H. K., TAÏEB, D., ZHUANG, Z., ZENKA, J., & PACAK, K. (2019). The Significant Reduction or Complete Eradication of Subcutaneous and Metastatic Lesions in a Pheochromocytoma Mouse Model after Immunotherapy Using Mannan-BAM, TLR Ligands, and Anti-CD40. *Cancers*, 11(654).

CALMEIRO, J., CARRASCAL, M. A., TAVARES, A. R., FERREIRA, D. A., GOMES, C., FALCÃO, A., CRUZ, M. T., & NEVES, B. M. (2020). Dendritic Cell Vaccines for Cancer Immunotherapy: The Role of Human Conventional Type 1 Dendritic Cells. *Pharmaceutics*, 12(2): 158.

CWIERTKA, K., HAJDÚCH, M., TROJANEC, R., & ŠPAČKOVÁ, K. (2004). Terapeutické monoklonální protilátky v onkologii. *Klinická farmakologie a farmacie*, 18(3), 165-170.

DEMICHELI, R., RETSKY, M. W., HRUSHESKY, W. J. M., BAUM, M., & GUKAS, I. D. (2008). The effects of surgery on tumor growth: a century of investigations. *Annals of Oncology*, 19(11), 1821-1828.

DEVITA, V. T., & CHU, E. (2008). A History of Cancer Chemotherapy. *Cancer Research*, 68(21), 8643–8653.

ELHADI, M., KHALED, A., & MSHERGHI, A. (2021). Infectious diseases as a cause of death among cancer patients: a trend analysis and population-based study of outcome in the United States based on the Surveillance, Epidemiology, and End Results database. *Infect Agents Cancer*, 16(72).

FARR, M. A., JOSHI, T. P., & LEWIS, D. J. (2021). Resiquimod: a new topical immune-response modifier for the treatment of actinic keratosis. *Expert Opinion on Emerging Drugs*, 26(4), 433-434.

FERENČÍK, M., ROVENSKÝ, J., SHOENFELD, Y., & MAŤHA, V. (2005). Imunitní systém: informace pro každého. Grada.

FIKRLE, T., & PIZINGER, K. (2010). Maligní melanom. *Onkologie*, 4(4), 225-228.

FORDE, P. M., CHAFT, J. E., SMITH, K. N., ANAGNOSTOU, V., COTTRELL, T. R., HELLMANN, M. D., ZAHURAK, M., YANG, S. C., JONES, D. R., BRODERICK, S., BATTAFFARANO, R. J., VELEZ, M. J., REKHTMAN, N., OLAH, Z., NAIDOO, J., MARRONE, K. A., VERDE, F., GUO, H., ZHANG, J., et al. (2018). Neoadjuvant PD-1 Blockade in Resectable Lung Cancer. *The New England Journal of Medicine*, 378(21), 1976-1986.

GALLI, F., VERA AGUILERA, J., PALERMO, B., MARKOVIC, S. N., NISTICÒ, P., & SIGNORE, A. (2020). Relevance of immune cell and tumor microenvironment imaging in the new era of immunotherapy. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 39(89).

GE, S., & HUANG, C. (2022). Immune checkpoint inhibitors in neoadjuvant therapy of non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Thoracic Disease*, 14(2), 333–342.

GONZALEZ, H., HAGERLING, C., & WERB, Z. (2018). Roles of the immune system in cancer: from tumor initiation to metastatic progression. *Genes & Development*, 32(19-20), 1267-1284.

GRANOT, Z., & JABLONSKA, J. (2015). Distinct Functions of Neutrophil in Cancer and Its Regulation. *Mediators of Inflammation*, 2015(701067).

HAN, Y., LIU, D., & LI, L. (2020). PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. *American Journal of Cancer Research*, 10(3), 727-742.

HANAHAN, D., & WEINBERG, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100(1), 57-70.

HANAHAN, D., & WEINBERG, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646-674.

HANAHAN, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, 12(1), 31-46.

HATO, T., & DAGHER, P. C. (2015). How the Innate Immune System Senses Trouble and Causes Trouble. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 10(8), 1459-1469.

HAYES, D. F., & SCHOTT, A. F. (2015). Neoadjuvant Chemotherapy: What Are the Benefits for the Patient and for the Investigator?. *JNCI Monographs*, 2015(51), 36-39.

HE, X., & XU, C. (2020). Immune checkpoint signaling and cancer immunotherapy. *Cell Research*, 30(8), 660-669.

HEGDE, M. V., MALI, A. V., & CHANDORKAR, S. S. (2013). What is a Cancer Cell? Why does it Metastasize?. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 14(6), 3987-3989.

HOŘEJŠÍ, V., BARTŮŇKOVÁ, J., BRDIČKA, T., & ŠPÍŠEK, R. (2017). *Základy imunologie* (6., aktualizované vydání). Stanislav Juhaňák - Triton.

HONG, W. X., HAEBE, S., LEE, A. S., WESTPHALEN, C. B., NORTON, J. A., JIANG, W., & LEVY, R. (2020). Intratumoral immunotherapy for early-stage solid tumors. *Clinical Cancer Research*, 26(13), 3091-3099.

CHAMPIAT, S., TSELIKAS, L., FARHANE, S., RAOULT, T., TEXIER, M., LANOY, E., MASSARD, C., ROBERT, C., AMMARI, S., De Baère, T., & MARABELLE, A. (2021). Intratumoral Immunotherapy: From Trial Design to Clinical Practice. *Clinical Cancer Research*, 27(3), 665-679.

JANEWAY, C. A., TRAVERS, P., WALPORT, M., & SHLOMCHIK, M. J. (2001). *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease* (5th ed.). Garland Science. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10757/>

KIM, S. K., & CHO, S. W. (2022). The Evasion Mechanisms of Cancer Immunity and Drug Intervention in the Tumor Microenvironment. *Frontiers in Pharmacology*, 13(868695).

KRALL, J. A., REINHARDT, F., MERCURY, O. A., PATTABIRAMAN, D. R., BROOKS, M. W., DOUGAN, M., LAMBERT, A. W., BIERIE, B., PLOEGH, H. L., DOUGAN, S. K., & WEINBERG, R. A. (2018). The systemic response to surgery triggers the outgrowth of distant immune-controlled tumors in mouse models of dormancy. *Science Translational Medicine*, 10(436).

KREJSEK, J., ANDRÝS, C., & KRČMOVÁ, I. (2016). *Imunologie člověka*. Garamon.

KRISHNAMOORTHY, M., LENEHAN, J. G., & MALEKI VAREKI, S. (2021). Neoadjuvant Immunotherapy for High-Risk, Resectable Malignancies: Scientific Rationale and Clinical Challenges. *Journal of the National Cancer Institute*, 113(7), 823-832.

KRZYŻANOWSKA, M. K., TREACY, J., MALONEY, B., LAVINO, A., & JACOBSON, J. O. (2005). Development of a Patient Registry to Evaluate Hospital

Admissions Related to Chemotherapy Toxicity in a Community Cancer Center. *Journal of Oncology Practice*, 1(1), 15-19.

LEE, J. M., KIM, A. W., MARJANSKI, T., FALCOZ, P. E., TSUBOI, M., WU, Y. L., SUN, S. W., & GITLITZ, B. J. (2021). Important Surgical and Clinical End Points in Neoadjuvant Immunotherapy Trials in Resectable NSCLC. *JTO Clinical and Research Reports*, 2(10): 100221.

LI, D. -K., & WANG, W. (2020). Characteristics and clinical trial results of agonistic anti-CD40 antibodies in the treatment of malignancies. *Oncology Letters*, 20(5): 176.

LIN, M. J., SVENSSON-ARVELUND, J., LUBITZ, G. S., MARABELLE, A., MELERO, I., BROWN, B. D., & BRODY, J. D. (2022). Cancer vaccines: the next immunotherapy frontier. *Nature Cancer*, 3(8), 911-926.

LIU, J., BLAKE, S. J., YONG, M. C. R., HARJUNPÄÄ, H., FOONG NGIOW, S., TAKEDA, K., YOUNG, A., O'DONNELL, J. S., ALLEN, S., SMYTH, M. J., & TENG, M. W. L. (2016). Improved Efficacy of Neoadjuvant Compared to Adjuvant Immunotherapy to Eradicate Metastatic Disease. *Cancer Discovery*, 6(12), 1382-1399.

LIU, J., O'DONNELL, J. S., YAN, J., MADORE, J., ALLEN, S., SMYTH, M. J., & TENG, M. W. L. (2019). Timing of neoadjuvant immunotherapy in relation to surgery is crucial for outcome. *OncoImmunology*, 8(5).

LOOKIAN, P. P., ZHAO, D., MEDINA, R., WANG, H., ŽENKA, J., GILBERT, M. R., PACÁK, K., & ZHUANG, Z. (2021). Mannan-BAM, TLR Ligands, Anti-CD40 Antibody (MBTA) Vaccine Immunotherapy: A Review of Current Evidence and Applications in Glioblastoma. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7): 3455.

LORDICK, F., & GOCKEL, I. (2016). Chances, risks and limitations of neoadjuvant therapy in surgical oncology. *Innovative Surgical Sciences*, 1(1), 3-11.

MARABELLE, A., TSELIKAS, L., DE BAERE, T., & HOUOT, R. (2017). Intratumoral immunotherapy: using the tumor as the remedy. *Annals of oncology*, 28(12), 33-43.

MARKOV, O. V., MIRONOVA, N. L., VLASOV, V. V., & ZENKOVA, M. A. (2016). Molecular and Cellular Mechanisms of Antitumor Immune Response Activation by Dendritic Cells. *Acta Naturae*, 8(3), 17-30.

MARSHALL, J. S., WARRINGTON, R., WATSON, W., & KIM, H. L. (2018). An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*, 14(49).

MARTÍNEZ-LOSTAO, L., ANEL, A., & PARDO, J. P. (2015). How Do Cytotoxic Lymphocytes Kill Cancer Cells?. *Clinical Cancer Research*, 21(22), 5047–5056.

MATHUR, G., NAIN S., & SHARMA P. K., 2015. Cancer: An Overview. *Academic Journal of Cancer Research*, 8(1).

MEDINA, R., WANG, H., CAISOVA, V., CUI, J., INDIG, I. H., UHER, O., YE, J., NWANKWO, A., SANCHEZ, V., WU, T., NDUOM, E., HEISS, J., GILBERT, M. R., TERABE, M., HO, W., ZENKA, J., PACAK, K., & ZHUANG, Z. (2020). Induction of Immune Response Against Metastatic Tumors via Vaccination of Mannan-BAM, TLR Ligands and Anti-CD40 Antibody (MBTA). *Advanced Therapeutics*, 3(9): 2000044.

MELERO, I., BERRAONDO, P., RODRÍGUEZ-RUIZ, M. E., & PÉREZ-GRACIA, J. L. (2016). Making the Most of Cancer Surgery with Neoadjuvant Immunotherapy. *Cancer Discovery*, 6(12), 1312-1314.

MICHOT, J. M., BIGENWALD, C., CHAMPIAT, S., COLLINS, M., CARBONNEL, F., POSTEL-VINAY, S., BERDELOU, A., VARGA, A., BAHLEDA, R., HOLLEBECQUE, A., MASSARD, C., FUEREA, A., RIBRAG, V., GAZZAH, A., ARMAND, J. P., AMELLAL, N., ANGEVIN, E., NOEL, N., BOUTROS, C., et al. (2016). Immune-related adverse events with immune checkpoint blockade: a comprehensive review. *European Journal of Cancer*, 54, 139-148.

MITTENDORF, E. A., BURGERS, F., HAANEN, J., & CASCONI, T. (2022). Neoadjuvant Immunotherapy: Leveraging the Immune System to Treat Early-Stage Disease. *American Society of Clinical Oncology Educational Book*, 42, 189-203.

MUNHOZ, R. R., & POSTOW, M. A. (2016). Recent advances in understanding antitumor immunity. *F1000Research*, 5(2545).

MURTHY, S. M., GOLDSCHMIDT, R. A., RAO, L. N., AMMIRATI, M., BUCHMANN, T., & SCANLON, E. F. (1989). The influence of surgical trauma on experimental metastasis. *Cancer*, 64(10), 2035-2044.

NAGPAL, M., SINGH, S., SINGH, P., CHAUHAN, P., & ZAIDI, M. A. (2016). Tumor markers: A diagnostic tool. *National Journal of Maxillofacial Surgery*, 7(1), 17-20.

NAKAMURA, K., YOSHIKAWA, N., YAMAGUCHI, Y., KAGOTA, S., SHINOZUKA, K., & KUNITOMO, M. (2002). Characterization of mouse melanoma cell lines by their mortal malignancy using an experimental metastatic model. *Life Sciences*, 70(7), 791-798.

NICHOLSON, L. B. (2016). The immune system. *Essays in Biochemistry*, 60(3), 275–301.

O'DONNELL, J. S., SMYTH, M. J., BLANK, C. U., HOEFSEMIT, E. P., & TENG, M. W. L. (2019). The Promise of Neoadjuvant Immunotherapy and Surgery for Cancer Treatment. *Clinical Cancer Research*, 25(19), 5743-5751.

O'DONNELL, J. S., TENG, M. W. L., & SMYTH, M. J. (2019). Cancer immunoediting and resistance to T cell-based immunotherapy. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 16(3), 151-167.

OSTRAND-ROSENBERG, S. (2008). Immune surveillance: a balance between protumor and antitumor immunity. *Current Opinion in Genetics & Development*, 18(1), 11-18.

OVERWIJK, W.W., & RESTIFO, N.P. (2000). B16 as a Mouse Model for Human Melanoma. *Current Protocols in Immunology*, 39: 20.1.1-20.1.29. <https://doi.org/10.1002/0471142735.im2001s39>.

PARK, S. -Y., & NAM, J. -S. (2020). The force awakens: metastatic dormant cancer cells. *Experimental & Molecular Medicine*, 52, 569–581.

PATEL, A. (2020). Benign vs Malignant Tumors. *JAMA Oncology Patient Page*, 6(9).

RAKOFF-NAHOUM, S. (2006). Why Cancer and Inflammation?. *Yale Journal of Biology and Medicine*, 79(3-4), 123-130.

RIBAS, A., & WOLCHOK, J. D. (2018). Cancer immunotherapy using checkpoint blockade. *Science*, 359(6382), 1350-1355.

RICE, J. M. (2019). Immunosuppression. In *Tumour Site Concordance and Mechanisms of Carcinogenesis* (pp. 159-163). International Agency for Research on Cancer.

RIIHIMÄKI, M., THOMSEN, H., SUNDQUIST, K., SUNDQUIST, J., & HEMMINKI, K. (2018). Clinical landscape of cancer metastases. *Cancer Medicine*, 7(11), 5534–5542.

RITCHIE, H., SPOONER, F., & ROSER, M. (2018). Causes of death. Published online at [OurWorldInData.org](https://ourworldindata.org/causes-of-death). Retrieved from: 'https://ourworldindata.org/causes-of-death' [Online Resource]

ROSS, E. A., DEVITT, A., & JOHNSON, J. R. (2021). Macrophages: The Good, the Bad, and the Gluttony. *Frontiers in Immunology*, 12(708186).

ROWDEN, A. (2021). Immunotherapy vs. chemotherapy. *MedicalNewsToday*. Retrieved from: '<https://www.medicalnewstoday.com/articles/immunotherapy-vs-chemotherapy>' [Online resource]

ROZEMAN, E. A., MENZIES, A. M., VAN AKKOOI, A. C. J., ADHIKARI, C., BIERMAN, C., VAN DE WIEL, B. A., SCOLYER, R. A., KRIJGSMAN, O., SIKORSKA, K., ERIKSSON, H., BROEKS, A., VAN THIENEN, J. V., GUMINSKI, A. D., ACOSTA, A. T., TER MEULEN, S., KOENEN, A. M., BOSCH, L. J. W., SHANNON, K., PRONK, L. M., GONZALEZ, M., et al. (2019). Identification of the optimal combination dosing schedule of neoadjuvant ipilimumab plus nivolumab in macroscopic stage III melanoma (OpACIN-neo): a multicentre, phase 2, randomised, controlled trial. *The Lancet Oncology*, 20(7), 948–960.

SAKAI, S., NOMURA, K., MOCHIZUKI, K., & TAYA, M. (2016). Anchoring PEG-oleate to cell membranes stimulates reactive oxygen species production. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 147, 336-342.

SAMEER, A. S., & NISSAR, S. (2021). Toll-Like Receptors (TLRs): Structure, Functions, Signaling, and Role of Their Polymorphisms in Colorectal Cancer Susceptibility. *BioMed Research International*, 2021(1157023).

SCOTT, A. M., ALLISON, J. P., & WOLCHOK, J. D. (2012). Monoclonal antibodies in cancer therapy. *Cancer Immunity*, 12(1): 14.

SCHIRRMACHER, V. (2019). From chemotherapy to biological therapy: A review of novel concepts to reduce the side effects of systemic cancer treatment (Review). *International Journal of Oncology*, 54(2), 407-419.

SHAUL, M. E., & FRIDLENDER, Z. G. (2019). Tumour-associated neutrophils in patients with cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 16(10), 601-620.

SHAY, J. W., & BACCHETTI, S. (1997). A Survey of Telomerase Activity in Human Cancer. *European Journal of Cancer*, 33(5), 787-791.

SHAY, J. W., ZOU, Y., HIYAMA, E., & WRIGHT, W. E. (2001). Telomerase and cancer. *Human Molecular Genetics*, 10(7), 677-685.

STEELE, T. A. (2002). Chemotherapy-induced immunosuppression and reconstitution of immune function. *Leukemia Research*, 26(4), 411-414.

SUDHAKAR, A. (2009). History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods. *Journal of Cancer Science & Therapy*, 1(2).

SUNGUR, C. M., & MURPHY, W. J. (2014). Positive and Negative Regulation by NK Cells in Cancer. *Critical Reviews in Oncogenesis*, 19(1-2), 57-66.

ŠŤASTNÝ, M., & ŘÍHOVÁ, B. (2015). Únikové strategie nádorů pozornosti imunitního systému. *Klinická onkologie*, 28(4), 4S28–4S37.

TAI, L. -H., TANESE DE SOUZA, C., BÉLANGER, S., LY, L., ALKAYYAL, A. A., ZHANG, J., RINTOUL, J. L., ANANTH, A. A., LAM, T., BREITBACH, C. J., FALLS, T. J., KIRN, D. H., BELL, J. C., MAKRIGIANNIS, A. P., & AUER, R. A. (2012). Preventing Postoperative Metastatic Disease by Inhibiting Surgery-Induced Dysfunction in Natural Killer Cells. *Cancer Research*, 73(1), 97-107.

TAN, S., LI, D., & ZHU, X. (2020). Cancer immunotherapy: Pros, cons and beyond. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 124(109821).

TANG, F., TIE, Y., TU, C., & WEI, X. (2020). Surgical trauma-induced immunosuppression in cancer: Recent advances and the potential therapies. *Clinical and Translational Medicine*, 10(1), 199-223.

TANG, S., NING, Q., YANG, L., MO, Z., & TANG, S. (2020). Mechanisms of immune escape in the cancer immune cycle. *International Immunopharmacology*, 86(106700).

TOHME, S., SIMMONS, R. L., & TSUNG, A. (2017). Surgery for cancer: a trigger for metastases. *Cancer Research*, 77(7), 1548-1552.

TOPALIAN, S. L., TAUBE, J. M., & PARDOLL, D. M. (2020). Neoadjuvant checkpoint blockade for cancer immunotherapy. *Science*, 367(6477).

TRIMBLE, E. L., UNGERLEIDER, R. S., ABRAMS, J. A., KAPLAN, R. S., FEIGAL, E. G., SMITH, M. A., CARTER, C. L., & FRIEDMAN, M. A. (1993). Neoadjuvant therapy in cancer treatment. *Cancer*, 72(11), 3515-3524.

TURVEY, S. E., & BROIDE, D. H. (2010). Chapter 2: Innate Immunity. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2), 24-32.

UHER, O., CAISOVA, V., HANSEN, P., KOPECKY, J., CHMELAR, J., ZHUANGD, Z., ZENKA, J., & PACAK, K. (2019). Coley's immunotherapy revived: Innate immunity

as a link in priming cancer cells for an attack by adaptive immunity. *Seminars in Oncology*, 46(4-5), 385-392.

UHER, O., HUYNH, T. -T., ZHU, B., HORN, L. A., CAISOVA, V., HADRAVA VANOVA, K., MEDINA, R., WANG, H., PALENA, C., CHMELAR, J., ZHUANG, Z., ZENKA, J., & PACAK, K. (2021). Identification of Immune Cell Infiltration in Murine Pheochromocytoma during Combined Mannan-BAM, TLR Ligand, and Anti-CD40 Antibody-Based Immunotherapy. *Cancers*, 13(16): 3942.

URIBE-QUEROL, E., & ROSALES, C. (2015). Neutrophils in Cancer: Two Sides of the Same Coin. *Journal of Immunology Research*, 2015(983698).

URWYLER, P., EARNSHAW, I., BERMUDEZ, M., PERUCHA, E., WU, W., RYAN, S., MCDONALD, L., KARAGIANNIS, S. N., TAAMS, L. S., POWELL, N., COPE, A., & PAPA, S. (2020). Mechanisms of checkpoint inhibition-induced adverse events. *Clinical and Experimental Immunology*, 200(2), 141-154.

VIVIER, E., & MALISSEN, B. (2005). Innate and adaptive immunity: specificities and signaling hierarchies revisited. *Nature Immunology*, 6(1), 17-21.

VONKA, V. (2006). Protinádorové vakcíny I. Preventivní vakcíny. *Živa*, 2006(2), 53-54.

VONKA, V. (2006). Protinádorové vakcíny II. Terapeutické vakcíny. *Živa*, 2006(3), 100-104.

VORLÍČEK, J. (2013). Chemoterapie a vy: rady pro nemocné léčené chemoterapií (5., přeprac. a dopl. vyd., 2. vyd. Medical Tribune CZ). Masarykův onkologický ústav Brno ve spolupráci se společností Teva Pharmaceuticals CR a s nakl. Medical Tribune CZ.

WALDMAN, A. D., FRITZ, J. M., & LENARDO, M. J. (2020). A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice. *Nature Reviews Immunology*, 20, 651-668.

WCULEK, S. K., CUETO, F. J., MUJAL, A. M., MELERO, I., KRUMMEL, M. F., & SANCHO, D. (2020). Dendritic cells in cancer immunology and immunotherapy. *Nature Reviews Immunology*, 20, 7-24.

WEST, H., & JIN, J. (2015). Neoadjuvant Therapy. *JAMA Oncology Patient Page*, 1(4): 550.

XIONG, S., DONG, L., & CHENG, L. (2021). Neutrophils in cancer carcinogenesis and metastasis. *Journal of Hematology & Oncology*, 14(173).

ZHANG, X.-H. (2013). Why cancer cells metastasize?. *Medical Hypotheses*, 80(5), 669-671.

ZAHAVI, D., & WEINER, L. (2020). Monoclonal Antibodies in Cancer Therapy. *Antibodies*, 9(3): 34.

ZATLOUKALOVÁ, P., PJECHOVÁ, M., BABČANOVÁ, S., HUPP, T. R., & VOJTĚŠEK, B. (2016). Úloha PD-1/PD-L1 signalizace v protinádorové imunitní odpovědi. *Klinická Onkologie*, 29(4), 72-77.

ZIMA, T. (2014). Nádorové markery. In KRŠKA, Z., et al. *Chirurgická onkologie* (pp. 53-61). Grada.