

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**  
**Přírodovědecká fakulta**

**Analýza protinádorového efektu ligandu  
fagocytárních receptorů – laminarinu *in vitro***

Bakalářská práce

**Tereza Štajnerová**

Vedoucí práce: prof. RNDr. Jan Kopecký, CSc.

České Budějovice 2015

Štajnerová, T., 2015: Analýza protinádorového efektu ligandu fagocytárních receptorů – laminarinu *in vitro*. [Analysis of antitumor effect of phagocytic receptor's ligand – laminarin *in vitro*. Bc. Thesis in Czech] – 39 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

The aim of the thesis was to review immune mechanisms in antitumor immunity and to verify antitumor effect of phagocytic receptor's ligand – laminarin in *in vitro* experiments. We used various types of cytotoxic tests and we proposed optimal approach for this kind of analysis.

Prohlášení:

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 22. 4. 2015

.....  
Tereza Štajnerová

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala především svému školiteli prof. RNDr. Janu Kopeckému, CSc. za jeho obětavost, cenné rady a ochotu vždy pomoci při vedení této práce. Velký dík patří také všem pracovníkům Katedry medicínské biologie Přf JU za poskytnutí prostředků a zázemí při provádění experimentů. Dále bych ráda poděkovala všem svým kolegyním a kolegům za vytvoření příjemného pracovního prostředí a za pomoc při vyhodnocování pokusů. V neposlední řadě děkuji také své rodině a všem svým blízkým za trpělivost a podporu po celou dobu studia.

1	Úvod	1
1.1	Nádorová onemocnění	1
1.1.1	Příčiny nádorových onemocnění	1
1.2	Protinádorová imunita	2
1.2.1	Adaptivní imunita	3
1.2.2	Vrozená imunita	3
1.3	Mechanismy úniku nádorů imunitnímu systému	6
1.3.1	Imunoediting	7
1.4	Terapie nádorových onemocnění	8
1.4.1	Buněčná terapie	8
1.4.2	Terapie za pomoci protilátek	9
1.4.3	Terapie za pomoci cytokinů	10
1.4.4	Terapie ve fázi výzkumu	10
2	Cíle práce	13
3	Materiál a metody	14
3.1	Chemikálie	14
3.2	Laboratorní zvířata	14
3.3	Buněčná linie	15
3.4	Příprava buněk na cytotoxický test	15
3.5	Princip cytotoxického testu za použití izotopu $^{51}\text{Cr}$	16
3.6	Princip cytotoxického testu Ziva Tox	16
3.7	Analýza dat	17
3.8	Pokus č. 1: Porovnání cytotoxického efektu neutrofilů na melanomové buňky s navázaným ligandem laminarinem DOPE a bez ligandu	18
3.9	Pokus č. 2: Porovnání cytotoxického efektu neutrofilů na buňky melanomu s navázaným laminarinem a za přítomnosti volného laminarinu	18
3.10	Pokus č. 3: Zjišťování cytotoxického efektu metodou počítání buněk v Bürkerově komůrce	19
3.11	Pokus č. 4: Zjišťování cytotoxického efektu pomocí izotopu $^{51}\text{Cr}$	19
4	Výsledky	20
4.1	Pokus č. 1: Porovnání cytotoxického efektu neutrofilů na melanomové buňky s laminarinem DOPE a bez ligandu	20
4.2	Pokus č. 2: Porovnání cytotoxického efektu neutrofilů na buňky melanomu s navázaným laminarinem a za přítomnosti volného laminarinu	21

4.3	Pokus č. 3: Zjišťování cytotoxického efektu metodou počítání buněk v Bürkerově komůrce .....	23
4.4	Pokus č. 4: Zjišťování cytotoxického efektu pomocí izotopu $^{51}\text{Cr}$ .....	24
5	Diskuze .....	26
6	Závěr.....	30
7	Seznam zkratk.....	31
8	Seznam použité literatury .....	33

# 1 Úvod

## 1.1 Nádorová onemocnění

Přes neustálou snahu lékařů a vědeckých pracovníků se na předních místech žebříčků s příčinami smrti stále drží rakovina. Ve spojených státech byla mezi lety 2008-2010 pravděpodobnost onemocnění rakovinou v průběhu života 1:2 pro muže a 1:3 pro ženy (Siegel et al. 2014). Celosvětově v roce 2012 onemocnělo rakovinou 14 milionů lidí a 8,2 milionu nemoci podlehl (Stewart and Wild 2014). Porozumění mechanismům vzniku nádorových onemocnění je klíčovým krokem, aby mohly být vyvíjeny nové, účinnější terapie.

### 1.1.1 Příčiny nádorových onemocnění

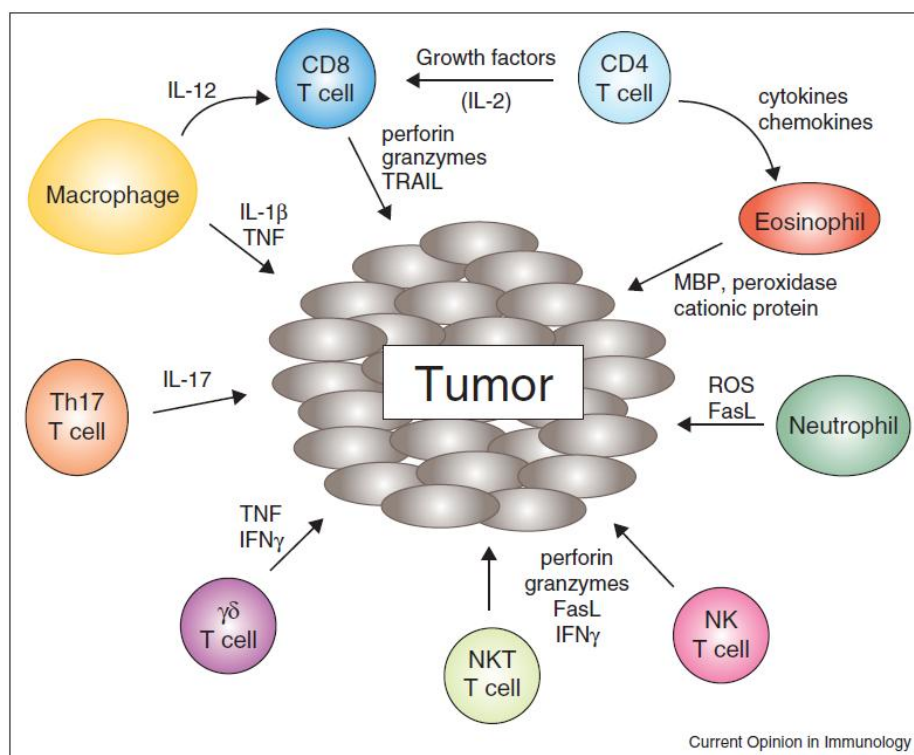
Mezi základní charakteristiky nádorových buněk patří růst bez působení růstových faktorů, unikání programované buněčné smrti, schopnost neomezeného růstu, stimulace angiogeneze, neschopnost reagovat na růstové supresory a schopnost tvorby metastáz v jiných tkáních (Hanahan and Weinberg 2011). K tomu dochází nejčastěji selháním regulace buněčného dělení nebo sociálního chování buněk. Příčinou bývá mutace v určité části DNA, která kóduje opravné systémy organismu nebo tzv. protoonkogeny či antionkogeny. V případě protoonkogenů se jedná o jejich zvýšenou aktivitu, naopak u antionkogenů je jejich aktivita snižena. Mutace v DNA mohou být vyvolány různými faktory, které můžeme dělit následujícím způsobem:

- a) **Fyzikální** – známé je negativní působení rentgenového či ionizujícího záření, UVA i UVB složka slunečního záření způsobující melanomy.
- b) **Chemické** – do této skupiny patří tzv. karcinogeny jako např. těžké kovy, aromatické uhlovodíky, dále látky odvozené z dehtu obsažené v cigaretách a způsobující rakovinu plic, hrtanu atd., alkohol a některé konzervační látky.
- c) **Biologické** – RNA i DNA viry (např. lidský papilomavirus (HPV), virus Epstein-Barr (EBV), HIV), bakterie (*Helicobacter pylori*), mohli bychom sem řadit i hormony, jejichž vlivu nasvědčuje zvýšený výskyt nádorových onemocnění při hormonálních změnách v klimakteriu u žen.
- d) **Dědičnost** – podstatným faktorem ovlivňujícím vznik nádorových onemocnění je v některých případech dědičnost. V posledních letech dochází k častějšímu genetickému testování u lidí s výskytem rakoviny v rodině, zejména pokud jde o

rakovinu prsu, vaječníků, tlustého střeva nebo některých vzácnějších onemocnění. To napomáhá prevenci vzniku onemocnění a případně včasnému odhalení.

## 1.2 Protinádorová imunita

Imunitní systém má za úkol udržovat homeostatické prostředí. To zahrnuje obranu před vnějšími škodlivými vlivy, ale i odstraňování potenciálních vnitřních nebezpečí jako jsou např. staré, poškozené či zmutované buňky a v neposlední řadě dohlíží na to, aby nebyly ničeny buňky vlastní, zdravé. Na těchto funkcích mají podíl dvě složky imunitního systému; vrozená (neadaptivní, nespecifická) a získaná neboli adaptivní (specifická) imunita. Na Obr. 1 jsou znázorněny buňky imunitního systému a jejich odpovědi na nádor. Obě složky imunity se podílejí na protinádorové imunitě a jejich mechanismy jsou rozebrány níže.



**Obr. 1:** Buňky imunitního systému, jejich působení na nádor a na sebe navzájem. (TRAIL= *TNF-related apoptosis-inducing ligand*, ROS=*reactive oxygen species*, MBP=*major basic protein*)(Darcy et al. 2014).

### 1.2.1 Adaptivní imunita

Specifická imunita je vývojově mladší než nespecifická. Vyskytuje se poprvé až u obratlovců, reaguje na antigen v řádu dnů a využívá imunologické paměti, kdy po setkání s již známým antigenem je schopna odpovědět mnohem rychleji, než při setkání s novým, neznámým antigenem. Hlavními složkami adaptivní imunity jsou T- a B-lymfocyty a humorální mechanismy.

### 1.2.2 Vrozená imunita

Evolučně starší část imunitního systému se nachází v různých podobách i u mnoha nižších organismů. Imunitní odpověď na stimulaci antigenem je rychlá – v řádu minut až hodin a nemá imunologickou paměť. Mezi hlavní efekторы nespecifické imunity patří dendritické buňky, makrofágy, přirození zabíječi (= NK buňky, z angl. *natural killers*) a neutrofilní, eozinofilní a bazofilní granulocyty, z nichž nejvýznamnější jsou první jmenované, zkráceně nazývané neutrofilny. Většina těchto buněk je schopna fagocytózy, což je hlavní obranný mechanismus přirozené imunity. Dendritické buňky, monocyty a makrofágy slouží navíc také jako antigen prezentující buňky (APC = *antigen presenting cells*) pro T lymfocyty, čímž hrají důležitou „startovací“ roli pro specifickou část imunitního systému.

#### a) Dendritické buňky

Patří mezi APC a představují důležitý spojovací článek mezi vrozenou a adaptivní imunitou. Na svém povrchu mají MHC antigenní komplexy, které po navázání antigenu umožňují jeho prezentaci T-lymfocytům, čímž aktivují imunitní odpověď adaptivního systému. Tato jejich schopnost je v poslední době využívána k aktivaci imunitního systému v případě vakcíny proti rakovinným onemocněním (kapitola 1.4.1.). Nezralé buňky, monocyty, putují z kostní dřeně do tkání, kde dozrávají v dendritické buňky (či makrofágy) za působení interleukinu 4 (IL-4) a *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF).

#### b) NK buňky

Jsou jedním z hlavních efektorů tzv. *Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity* (ADCC), což je mechanismus, při kterém se receptor na povrchu NK buněk naváže na protilátku na povrchu cizorodé buňky a po uskutečnění této vazby se NK buňka aktivuje. Aktivovaná NK buňka je schopna uvolnit perforin a granzym B nebo může produkovat *tumor necrosis factor* (TNF), což má za následek apoptózu cílové buňky.



NK buňky jsou ale schopny rozpoznávat antigeny přímo, nejen ve spojitosti s ADCC, a to díky různým receptorům, které obsahují na buněčném povrchu. Přes tzv. stresové ligandy jsou schopny rozpoznávat i nádorové buňky, u kterých došlo ke ztrátě MHC molekuly. Zatímco např. T-buňky potřebují k rozpoznání cílové buňky lidský leukocytový antigen (*human leukocyte antigen* = HLA) třídy I, pro aktivaci NK buněk není exprese tohoto antigenu nutná. Aktivace NK buněk je řízena řadou inhibičních a stimulačních signálů, které buňka přijímá prostřednictvím receptorů (mezi nejvýznamnější patří např. *killer immunoglobulin-like receptor* = KIR či *natural cytotoxicity receptor* = NCR) (Vivier et al. 2008). Pokud buňka exprimuje ve zvýšené míře aktivační signály či je u ní snížena exprese inhibičních signálů jako je např. HLA I, je NK buňkou rozpoznána jako patogen. Takové chování se často vyskytuje právě u nádorových buněk, s jejichž rozpoznáním *in vitro* pak nemají NK buňky problém (Vivier et al. 2008).

Roli NK buněk v protinádorové imunitě naznačují výzkumy, které prokazují vyšší výskyt spontánních nádorových onemocnění u myši s deficiencí NK buněk (Haliotis et al. 1985) a vyšší výskyt metastáz (Gorelik et al. 1982).

Ve fázi eliminace imunoeditingu hrají NK buňky důležitou roli při odstraňování nádorových buněk. Po prezentaci p53 dojde nádorová buňka do fáze senescence a produkuje řadu cytokinů, které navádí NK buňky na senescentní tumory (Iannello et al. 2013).

### c) **Neutrofilly**

Tvoří asi dvě třetiny bílých krevních buněk. Mají schopnost fagocytózy a hrají důležitou roli v průběhu zánětu. Proces fagocytózy je celkem dobře prozkoumaný, jinak je toho o neutrofilech známo málo, zvláště co se protinádorového účinku týče.

Fagocytující buňky, mezi které neutrofilly patří, rozpoznávají patogen za pomoci struktur na povrchu cizorodých buněk. Tyto struktury jsou nazývány *pathogen associated molecular patterns* (PAMPs), patří mezi ně např. peptidoglykany, glukany, manany či endotoxiny jako je třeba lipopolysacharid a vážou se na receptory na povrchu fagocytujících buněk nazývané *pattern recognition receptors* (PRRs). Mezi nejvýznamnější PRRs patří dectin-1 rozeznávající  $\beta$ -glukany (např. laminarin), manózový receptor a galaktózový receptor. PAMPs jsou specifické pouze pro cizorodé buňky a na organismu vlastních buňkách se vyskytují, pouze pokud jsou ve stavu apoptózy. Toho využívají některé terapie zaměřené na značení nádorových buněk pomocí PAMPs, které pak napomáhají rozpoznání a eliminaci těchto buněk fagocytujícími buňkami (kapitola 1.4).

Teprve několik let zpátky byl objeven nový způsob, který používají neutrofilie v boji proti patogenům. Nazývá se *neutrophil extracellular traps* (NETs) a je založen na tvoření sítí z chromatinových vláken. Tyto sítě slouží k eliminaci mikrobů, aktivaci dendritických buněk a T buněk, ale mohou se účastnit i některých autoimunních chorob (Brinkmann and Zychlinsky 2012).

Neutrofilie cirkulující v krvi jsou k místu zánětu (tedy i tumoru) naváděny pomocí různých chemokinů a cytokinů (např. TNF- $\alpha$  či IFN- $\gamma$ ) produkovaných jak nádorovými buňkami, tak i lymfocyty či makrofágy. Granulocyty, které již namigrovaly do nádoru jsou pak označovány jako *tumor-associated neutrophils* (TAN) a také mají vliv na navádění dalších neutrofilů do nádoru (Kobayashi 2006). Fridlender et al. (2009) ve své práci ukazuje, že populace TAN může v závislosti na podmínkách v prostředí nádoru působit jako „pronádorová“ (N2 fenotyp) i protinádorová (N1 fenotyp). Na to, v jaký fenotyp se neutrofilie vyvinou má hlavní vliv cytokin TGF- $\beta$  (*transforming growth factor- $\beta$* ), za jehož přítomnosti vzniká výhradně fenotyp N2 a po jeho blokádě naopak fenotyp N1 (Fridlender and Albelda 2012). Při studiu literatury je tedy třeba mít na paměti, že za stejných podmínek mohou vyjít naprosto odlišné výsledky podle toho, která populace neutrofilů v onom pokuse převažuje.

Při mnoha nádorových onemocněních znamená zvýšený počet neutrofilů zhoršenou prognózu (např. metastatický melanom či renální karcinom). Naopak v případě žaludečního karcinomu je neutrofilie spojena s příznivou prognózou. Což odráží dvojakou povahu neutrofilů ve vztahu k nádorovým onemocněním.

#### **d) Eozinofily**

Eozinofilní granulocyty patří mezi druhé nejčastější granulocyty cirkulující v krvi. Jejich zvýšený počet v krvi bývá zaznamenán u různých nemocí, jako jsou alergie nebo neoplastické a myeloproliferativní nemoci či při přítomnosti některých parazitů. Ví se také, že se často vyskytují v nádorovém infiltrátu a v mnoha případech je jejich přítomnost ve zvýšené míře brána jako příznivý prognostický faktor. Naopak např. u Hodgkinova lymfomu přítomnost eozinofilů zhoršuje prognózu (Von Wasielewski et al. 2000).

Zvýšená infiltrace eozinofilů byla prokázána u nádorů obsahujících nekrotickou tkáň (Stenfeldt et al. 2004). Mrtvé nádorové buňky totiž produkují řadu faktorů, které navádějí eozinofily k nádoru (Lotfi et al. 2007). Vliv eozinofilů na regresi nádoru prokázala již práce Tepera et al. z roku 1992, kde byly do myši vpravovány nádorové buňky geneticky

upravené tak, aby exprimovaly IL-4. Většina nádorů se u kontrolní skupiny ani neuchytila na rozdíl od myši s imunodeficiencí v oblasti eozinofilů.

Cytotoxicita eozinofilů vůči nádorům je nejpravděpodobněji způsobena uvolněním látek, které obsahují v granulích uvnitř cytoplazmy (Caruso et al. 2011), přesné mechanismy ale ještě nejsou objasněny. Cytotoxický efekt buněčných lyzátů eozinofilů byl prokázán vůči myšimu melanomu B16 (Mattes et al. 2003) stejně jako vůči karcinomu tlustého střeva (Legrand et al. 2010). Eozinofily hrají důležitou roli v biologických terapiích založených na podávání cytokinů, o nichž se zmiňuje kapitola 1.4.3.

**e) NKT buňky**

Zkratka v názvu těchto buněk je převzatá z anglického *natural killer T cells* a značí, že na svém povrchu obsahují receptory typické jak pro NK buňky, tak pro T-lymfocyty. Díky sekreci  $\text{INF}\gamma$  a IL-4 mají nepřímý vliv na protinádorovou imunitu a přímo se jí účastní prostřednictvím molekul jako je perforin, granzym B a FasL. Jejich protinádorový efekt byl prokázán (např. Bellone et al. (2010)).

**f) Makrofágy**

Podobně jako u neutrofilů můžeme i u makrofágů sledovat populaci *tumor-associated macrophages* (TAM) a její dva různé fenotypy M1 a M2, přičemž fenotyp M2 opět podporuje nádorový růst a fenotyp M1 jej potlačuje (Allavena et al. 2008). M1 fenotyp se vyvíjí za přítomnosti  $\text{IFN-}\gamma$ , lipopolysacharidu (LPS) či cytokinu  $\text{TNF-}\alpha$  (Mantovani et al. 2002). M2 fenotyp se ze stejných prekurzorů vyvine, pokud je přítomen některý z interleukinů IL-4, IL-10, IL-14 či  $\text{TGF-}\beta$  (*transforming growth factor  $\beta$* ) (Martinez et al. 2009).

### **1.3 Mechanismy úniku nádorů imunitnímu systému**

Imunitní systém si vyvinul celou řadu mechanismů, jakými potlačuje vlastní imunitní odpověď a zabraňuje jejich prostřednictvím autoimunitním reakcím a dalším nebezpečným stavům. Mezi tyto mechanismy patří: fyzikální bariéry, ztráta antigenu či MHC molekul, sekrece inhibičních cytokinů nebo tvorba supresorových buněk. Bohužel tyto prostředky zneužívají nádorová onemocnění ve svůj prospěch a s jejich pomocí unikají imunitnímu dohledu.

### 1.3.1 Imunoediting

Již na začátku minulého století přišel Ehrlich (1909) s myšlenkou, že má imunitní systém mechanismy, kterými se brání proti nádorovým onemocněním. V té době to byla myšlenka dosti radikální a nebyly žádné prostředky, jak ji potvrdit či vyvrátit. Během několika následujících dekád se teorii nevěnovala přílišná pozornost. Až koncem padesátých let se tématem začal zabývat Burnet (1957) a dal procesu název imunitní dohled (*immunosurveillance*). Od té doby přibývaly výzkumy potvrzující tuto teorii. Bylo však odhaleno, že imunitní dohled má i svou „stinnou stránku“, která naopak podporuje růst nádoru a může ovlivňovat jeho vývoj (Shankaran et al. 2001). To naznačovalo, že celý proces je zřejmě složitější, než se myslelo. Teorie imunitního dohledu byla přejmenována na tzv. „*cancer immunoediting*“ a celý proces byl rozdělen na tři hlavní fáze: *elimination*, *equilibrium*, *escape* = eliminace, rovnováha a únik (Dunn et al. 2002, 2004).

**a) Eliminace** - Schopnost eliminovat nádor byla odhalena při pokusech s imunodeficientními myšmi, kdy bylo prokázáno, že těmto myším se po injikování metylcholantrenu (MCA) vyvíjely nádory častěji a rychleji než kontrole (Shankaran et al. 2001). V tom samém pokusu byl testován i vznik spontánních nádorů, opět byla u imunokompetentních myší výrazně nižší četnost. Tyto a další studie naznačují, že ve fázi eliminace hrají svou roli jak adaptivní, tak přirozená imunita. (Podrobněji v kapitolách 1.2.1 – 1.2.2)

**b) Rovnováha** – Poté, co je odstraněna většina nádorových buněk, některé s odlišnými mutacemi mohou přežít a tyto jsou pak více odolné vůči zbraním imunitního systému. U lidí je znám případ, kdy dva příjemci ledviny od stejného dárce onemocněli melanomem do dvou let po transplantaci (MacKie et al. 2003); později se ukázalo, že dárce byl 16 let před smrtí léčen na melanom a v době darování ledvin byl prohlášen za zdravého. To dokazuje, že stav nádorové nečinnosti může být dlouhodobý. Přesto, že je druhá fáze imunoeditingu ze všech tří fází asi nejméně prozkoumaná, je známo, že klíčovou roli v ní hrají IL-12 a IL-23, které působí antagonisticky (Teng et al. 2012). Důvodem malého počtu výzkumů a poznatků v této oblasti je těžké napodobení tohoto stavu na modelových organismech či v laboratorních podmínkách.

**c) Únik** – Buňky, které přežijí fázi eliminace, jsou během fáze nádorové nečinnosti utvářeny tak, aby unikly imunitnímu systému, a to jak adaptivní složce, tak přirozené. Pokud se tedy buňka dostane do poslední fáze úniku, nádor může růst neomezeně a bez jakékoliv

obranu imunitního systému. Právě v této fázi se nejčastěji nádorové onemocnění začne projevovat klinicky a bývá zahájena léčba. Z tohoto důvodu je porozumění únikovým mechanismům nádorů klíčové pro vývoj nových terapeutických postupů.

Mezi způsoby úniku nádorových buněk imunitnímu systému patří např.:

- produkce inaktivujících či blokujících faktorů (např. TGF  $\beta$ , IL-10, VEGF)
- ztráta nádorových antigenů či MHC I molekul, pomocí nichž jsou nádorové antigeny prezentovány
- působení T regulačních lymfocytů (Treg), které za normálních okolností brání před autoimunitními mechanismy, ale v případě nádorů je jejich funkce spíše škodlivá
- vznik MDSC (myeloid-derived suppressor cell), které potlačují imunitní reakce
- exprese FasL nádorovými buňkami; tato molekula vyvolává apoptózu u Tc lymfocytů
- a mnohé další...

## **1.4 Terapie nádorových onemocnění**

Čím více se dozvídáme o mechanismech úniku nádorů imunitnímu systému, tím lépe se můžeme na tyto mechanismy soustředit a cílit na ně léčbu tím, že je obejdeme či zabráníme nádoru jejich zneužití ve vlastní prospěch. V dřívějších letech byla léčba soustředěna hlavně na chemoterapie či radioterapie, které mají nepříjemné vedlejší účinky v podobě eliminace zdravých buněk. V současné době jsou tyto metody stále na vrcholu žebříčku četnosti používání, ale velký rozvoj nastává v oblasti imunoterapií, což jsou metody zaměřené na povzbuzení imunitního systému pacienta tak, aby proti rakovinným buňkám byl schopen bojovat za pomoci vlastních imunitních mechanismů. Velkou výhodou těchto metod je, že v porovnání s chemoterapiemi nepoškozují zdravé buňky a vedlejší účinky jsou minimální. Níže se tedy zaměřím na nejdůležitější metody z oblasti imunoterapie nádorových onemocnění.

### **1.4.1 Buněčná terapie**

V roce 2010 byla schválena léčba rakoviny prostaty pomocí dendritických buněk u mužů s kastročně rezistentní formou nemoci. Nezralé dendritické buňky z periferní krve pacienta se nechají dozrát *in vitro* v prostředí s GM-CSF a prostatickou kyselou fosfatázou a poté jsou injikovány zpět pacientovi. Léčba vykazuje zvýšení průměrného dožití až o 4,1

měsíce (Kantoff et al. 2010). Na podobném principu staví i imunoterapie českých vědců, která se aktuálně nachází ve třetí fázi klinického testování a má slibné výsledky (Bartůňková et al. 2014). Výhodou jsou zanedbatelné vedlejší účinky, a tak je tímto směrem orientováno mnoho výzkumů. Další strategií, jak rozvinout plný potenciál dendritických buněk je inhibice např. SOCS1, což je látka blokující produkci cytokinů a tím omezující rozvoj imunitní odpovědi (Evel-Kabler et al. 2006). Nedávno se povedlo vyvinout linii dendritických buněk, což napomáhá budoucím výzkumům, přestože je stále nutné mít na paměti morfologické odlišnosti mezi myšimi a lidskými dendritickými buňkami (Marraco et al. 2012).

#### **1.4.2 Terapie za pomoci protilátek**

Protilátky jsou hlavní účinnou složkou v boji proti patogenům a kromě toho často stimulují další buňky imunitního systému. Díky objevu technologií na výrobu monoklonálních protilátek je nyní možné vyrobit protilátku proti téměř jakémukoliv antigenu, a tak je tímto směrem orientováno velké množství výzkumů. V nádorové imunoterapii se využívají buď samotné protilátky anebo jsou protilátky spojeny s radioizotopy či toxickými látkami, které mají cytotoxický efekt a díky vazbě na nádorovou buňku je jejich efekt cílený a zdravé buňky zasahuje minimálně. Tzv. *naked antibodies* neboli holé protilátky se vážou na antigeny nádorových buněk a tím proti nim navádějí efektorové buňky imunitního systému (případně vazbou blokují antigeny, pomocí nichž se nádorová buňka snaží uniknout). Tím je využívána ADCC (*Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*), což je hlavní obranný mechanismus NK buněk (více v kapitole 1.2.2).

První monoklonální protilátky (MAbs) byly myší, což značně omezovalo jejich cytotoxický účinek v lidském těle a často docházelo k alergickým reakcím (Stern and Herrmann 2005). Myší MAbs jsou dobře poznatelné podle názvu, který má koncovku *-omab* (např. Tositumomab). Postupem času byly vyvíjeny humanizované a chimérické protilátky (koncovky *-ximab* a *-zumab*), druhé jmenované mají variabilní část myšího původu a konstantní lidského, humanizované protilátky jsou lidského původu z 95% (Stern and Herrmann 2005) a většina v současné době používaných protilátek je právě z této kategorie. Od humanizovaných protilátek byl již jen krůček k vyvinutí plně lidských, které dnes již také nejsou výjimkou (např. Ipilimumab).

### 1.4.3 Terapie za pomoci cytokinů

Princip metody je založen na vpravení cytokinů vyvolávajících migraci či proliferaci buněk imunitního systému do těla pacienta, převážně intravenózně. Nejběžněji se používá růstový faktor interleukin-2 (IL-2), což je cytokin ovlivňující dozrávání leukocytů, především T-lymfocytů. I přes značné vedlejší účinky je běžně používán při léčbě maligních melanomů a renálního karcinomu. Další používaný cytokin je IL-25, jeho působení má také za následek eozinofilii a díky tomu supresi nádoru (Benatar et al. 2010); nebo IL-21, který aktivuje T-buňky a NK buňky, ale na rozdíl od IL-2 má menší vedlejší účinky (Davis et al. 2009).

Interferon  $\alpha$  (IFN $\alpha$ ) je cytokin produkovaný buňkami přirozené imunity. Jeho účinky se projevují především v reakci na virové infekce, ale jeho využití je i v protinádorové terapii. Podporuje proliferaci B buněk, aktivuje NK buňky a zvyšuje expresi MHC antigenů. Jeho použití je schváleno pro léčbu leukémií, melanomu či lymfomů (Dunn et al. 2006). Podobné účinky má i použití INF $\beta$  a IFN $\gamma$ , u kterého byla nedávno prokázána schopnost zastavovat růst melanomových buněk (Braumüller et al. 2013).

### 1.4.4 Terapie ve fázi výzkumu

Imunoterapie proti nádorovým onemocněním je v poslední době velmi rychle se rozvíjející oblast, a tak jsou různé nové přístupy ve fázi výzkumu či klinického testování. Níže jsou uvedeny některé z nich, které se zdají být na dobré cestě.

Takzvaná *adoptive T cell therapy* využívá T-lymfocyty k zapojení imunitního systému a podnícení trvalé imunitní odpovědi proti nádorovým buňkám. Při terapii jsou využívány různé druhy T-lymfocytů jako např. tumor infiltruující lymfocyty (TILs) či T-lymfocyty různým způsobem upravené *ex-vivo*. Již přes dvacet let se úspěšně používá inkubace T-lymfocytů s IL-2 (LAK buňky). Po navrácení takto upravených lymfocytů pacientovi dochází k trvalé imunitní reakci zvláště v případě metastazujícího melanomu či renálního karcinomu (Klapper et al. 2008). V současné době se k této terapii používají tumor infiltruující lymfocyty získané z nádorové tkáně (Rosenberg et al. 2011). T-lymfocyty jsou využívány i v dalších léčebných postupech. Jedním z nich je použití T-lymfocytů geneticky upravených tak, aby exprimovaly receptory pro nádorově specifické antigeny. Receptory jsou buď klasické, běžně se vyskytující u T-buněk (TCR) nebo tzv. chimérické antigenní receptory (CARs), které jsou složeny ze dvou částí; jedna se váže na T-buňku (nejčastěji na CD3 receptor) a druhá na nádorovou buňku přes nádorově specifický antigen. Tím je

zajištěna vazba T-lymfocytů k nádorovým buňkám a je kombinována cytotoxicita CD8+ T-lymfocytů a na MHC molekulách nezávislá rozpoznávací schopnost monoklonálních protilátek (obzvláště významné u leukémií jako je např. chronická lymfatická leukémie). Při klinických testech dokonce některé takto upravené buňky přetrvaly v těle pacienta jako paměťové buňky, čímž byla zajištěna jejich trvalá funkce (Kalo set al. 2011).

Jedna z terapií proti nádorovým onemocněním se zaměřuje na MDSCs (z angl. *myeloid-derived suppressor cells*), což je heterogenní populace myeloidních buněk vznikajících v prostředí chronického zánětu. Produkci různých cytokinů inhibují proliferaci a aktivaci T-lymfocytů a v zánětlivém prostředí (což zahrnuje i oblast nádoru) potlačují protinádorovou imunitu (Gabrilovich et al. 2012). Inhibicí funkce či proliferace MDSCs je možné zvýšit imunitní odpověď proti nádorovým buňkám a v současné době je již několik takových inhibitorů používáno a různé další jsou ve fázi klinického testování (Wesolowski et al. 2013).

Nádorové buňky prezentují na svém povrchu CD47 molekulu, která po interakci s SIRP $\alpha$  inhibiční molekulou na makrofázích funguje jako „*don't eat me*“ signál a zabraňuje tak eliminaci nádoru. Při blokaci CD47 monoklonální protilátkou dochází ke zvýšené fagocytóze nádorových buněk makrofágy (Willingham et al. 2012). Tato terapie má nepříjemný vedlejší účinek ve formě anémie, jelikož CD47 je přítomen i na erytrocytech. Již se ale pracuje na vývoji látky pro blokaci SIRP $\alpha$ , která by měla mít podobný efekt bez vedlejších účinků na erytrocyty. (Weiskopf et al. 2013)

Vakcíny proti nádorovým onemocněním staví na stejném základu jako očkování proti infekčním nemocem. Princip spočívá v rozvinutí imunologické paměti pomocí očkování, aby v případě styku s patogenem organismus reagoval ještě před rozvojem nemoci. V případě rakovinných onemocnění lze tento preventivní princip použít u těch, které jsou způsobeny viry a již je běžné např. očkování proti viru HPV či HBV. Další vakcíny nemají preventivní funkci, ale spíše stimulační a jsou aplikovány až v průběhu nemoci. Staví na injikování peptidů, proteinů, rekombinantních mikroorganismů, podání mrtvých nádorových buněk či stimulovaných dendritických buněk, jak již bylo popsáno v kapitole 1.4.1.

Jedním z nových přístupů je i tzv. *immune checkpoint blokada*, což by bylo možné přeložit jako blokace kontrolních bodů. Jedná se zvláště o dva body a to antigen CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4*) a membránový protein programované



buněčné smrti PD-1, který má dva ligandy – PD-L1 a PD-L2. První jmenovaný slouží jako inhibitor imunitní reakce a jeho blokáce má pozitivní vliv na funkci T-lymfocytů proti nádoru. Receptor PD-1 na povrchu imunitní buňky se za normálních okolností váže na PD-L1, čímž se zastaví imunitní funkce buňky. Nádorové buňky jsou schopné exprimovat na svém povrchu PD-L1, čímž se vyhýbají útoku T-lymfocytů. Blokáci kontrolních bodů dochází ke zvýšené protinádorové imunitní odpovědi a v případě CTLA-4 jsou již několik let úspěšně používány terapie založené na tomto principu. Léky zaměřené na blokáci PD-1 jsou zatím ve fázi výzkumu a ukazuje se, že současné zablokování obou kontrolních bodů má synergické účinky (Wolchok et al. 2013).

Již více než 10 let je zkoumán vliv agonistů buněčných receptorů na imunitní odpověď proti nádoru. Principem této metody je navázání ligandu na nádorovou buňku, čímž je buňka označena jako cíl pro buňky imunitního systému. V několika pracích bylo prokázáno, že ligand Toll-like receptoru (TLR) lipopolysacharid (LPS) má signifikantní vliv na regresi nádoru (Chicoine et al. 2001, Mariani et al. 2007). Proti výsledkům jejich prací se staví relativně čerstvá práce Janotové et. al (2014), která poukazuje na vysoké koncentrace LPS použité v těchto testech. Výsledky tak spíše potvrzují toxicitu samotného LPS, než jeho naváděcí funkci pro buňky vrozené imunity. V té samé práci Janotová et al. (2014) ve svém pokusu potvrzuje vliv LPS i jako agonisty s důrazem na jeho nízkou, netoxickou koncentraci a používá jej spolu s ligandy fagocytárních receptorů. Výsledky práce jsou velmi pozitivní a ukazují dlouhotrvající přežití až u 80% testovaných myší. Tato studie je zatím ale pouze v začátku a vyžaduje podrobnější prozkoumání problematiky *in vitro* a nahrazení pro člověka toxického LPS jinou látkou.

## 2 Cíle práce

- Podrobná literární rešerše o imunitě proti nádorům
- Prokázání protinádorového účinku ligandu fagocytárního receptoru laminarinu navázaného na nádorové buňky rozpoznávané buňkami přirozené imunity *in vitro*
- Nalezení vhodné metody na určování cytotoxického efektu buněk přirozené imunity na nádorové buňky s navázanými ligandy fagocytárních receptorů

### 3 Materiál a metody

#### 3.1 Chemikálie

- **Azid sodný**
- **DOPE** - N-(Succinimidyl-oxy-glutaryl)-L- $\alpha$ -phosphatidylethanolamin, Dioleoyl (NOF Corporation, Japonsko)
- **EDTA** - kyselina ethylendiamintetraoctová (Sigma- Aldrich, USA)
- **FCS** - fetální bovinní sérum (Sigma-Aldrich, USA)
- **Chroman sodný** - roztok ( $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ ) (PerkinElmer, USA)
- **L-glutamin** (PAA-The Cell Culture Company, USA)
- **Laminarin**- z *Laminaria digitata* (Sigma-Aldrich, USA)
- **Merkaptoetanol** - (PAA-The Cell Culture Company, USA)
- **Penicilin/streptomycin antibiotika** (PAA-The Cell Culture Company, USA)
- **Phorbol 12-myristate 13-acetate**
- **PBS** - fosfátový pufr s chloridem sodným (pH 7,3-7,4), (Sigma-Aldrich, USA)
- **RPMI 1640** (Sigma- Aldrich, USA)
- **Scintilační roztok** - Ultima Gold<sup>TM</sup> (PerkinElmer, USA)
- **Thioglykolátové medium** (Difco Fluid Thyogycolate medium, 3% roztok ve vodě, Becton, Dickinson, USA)
- **Triton X-100** (Serva, Německo)
- **Trypanová modř** (Sigma-Aldrich, USA)
- **Trypsin** (Sigma-Aldrich, USA)
- **Ziva<sup>TM</sup> Tox Ultrasensitive Cytotoxicity Assay** (Jaden BioScience Inc., USA)

#### 3.2 Laboratorní zvířata

V pokusu byly použity myši C57BL/6N, samice ve stáří cca 6 týdnů, od Charles River Laboratories. Byly chovány ve sterilních boxech za neomezeného přístupu ke sterilní pitné vodě a krmivu ve formě suchých pelet. V místnosti byla zajištěna konstantní teplota 22°C, relativní vlhkost 65% a fotoperioda 12/12 hodin.

### 3.3 Buněčná linie

Při pokusech byla používána buněčná linie myšího melanomu B16-F10. Kultivace buněk probíhala v kultivačním médiu RPMI 1640 s 10 % fetálního bovinního séra (FCS) s přísadkou 1% antibiotik, 1% glutaminu a 0,1% merkaptoetanolu při 37°C v termostatu v 5% CO<sub>2</sub> atmosféře.

### 3.4 Příprava buněk na cytotoxický test

Do myšího peritonea byly injekčně vpraveny 2ml 3% roztoku thioglykolátového media. Po čtyřech hodinách byla myš usmrcena zlomením vazů a peritoneum bylo vypláchnuto 4ml chlazeného PBS. Takto získané neutrofilie byly převedeny do media (RPMI, 10% FCS), spočítány v Bürkerově komůrce (za pomoci roztoku trypanové modři, který byl přidán k buněčné suspenzi v poměru 1:1) a naředěny na koncentraci 10<sup>6</sup> buněk/ml.

Buňky myšího melanomu B16-F10 v kultivační lahvi byly 2x opláchnuty PBS, uvolněny pomocí 2ml roztoku versenu s trypsinem (0,02% trypsin a 0,02% EDTA v PBS) a po pětiminutové inkubaci v termostatu (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) převedeny do media. Dále byly spočítány a naředěny na koncentraci 5x10<sup>4</sup>/ml. Polovina buněk byla centrifugována (5min, 4°C, 1000rpm) a resuspendována do objemu 1ml media. K těmto buňkám bylo následně přidáno 100μl 2mM roztoku laminarinu DOPE, směs byla inkubována v termostatu po dobu 30min za občasného protřepání, aby se zamezilo adhezi buněk. Po skončení inkubace byly buňky 2x promyty médiem, aby se odstranil nenavázaný ligand a opět byly naředěny na koncentraci 5x10<sup>4</sup> buněk/ml.

V samotném cytotoxickém testu byl k inkubaci používán 96-jamkový panel s kulatým dnem (Nunc, Dánsko) umístěný v inkubátoru (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Buňky byly do panelu dávkovány v objemu 100μl/jamku (neutrofilie i buňky melanomu) v poměru efektorů k cílům 20:1 (bylo zajištěno, aby výsledný objem suspenze ve všech jamkách byl stejný; v jamkách, kde chyběla některá složka, byla nahrazena médiem RPMI s 10% FCS). Všechny kombinace byly v pokusu zastoupeny ve třech opakováních. Inkubace probíhala po dobu 4 hodin.

### 3.5 Princip cytotoxického testu za použití izotopu $^{51}\text{Cr}$

Testování cytotoxicity založené na uvolnění radioaktivního chromu ( $^{51}\text{Cr}$ ) je dlouholetou osvědčenou technikou. Princip testu spočívá v inkubaci cílových buněk za přítomnosti  $^{51}\text{Cr}$ , čímž je radioaktivní látka vstřebána do buněčné cytoplazmy. Cílové buňky jsou následně inkubovány spolu s efektorovými a po lýze buňky je radioaktivní chrom uvolněn do okolního media. Množství uvolněného chromu je pak změřeno jako množství gama záření vyzařované supernatantem.

V této práci bylo pomocí scintilačního počítače (*Tri-Carb® 2900TR Liquid Scintillation Analyzers; Packard*) měřeno beta záření, které  $^{51}\text{Cr}$  vyzařuje také, ale v menší míře než záření gama. Tento postup vyžadoval přidání scintilačního roztoku ke vzorku supernatantu, což způsobilo přeměnu beta záření na záření světelné, které bylo následně změřeno na scintilačním počítači.

Do testu je nutno zahrnout i kontroly spontánního uvolnění chromu (jamky, kde jsou obsaženy pouze cílové buňky) a maximálního uvolnění chromu (jamky s cílovými buňkami, které jsou uměle lyzovány za pomoci Tritonu X-100).

### 3.6 Princip cytotoxického testu Ziva Tox

Cytotoxické testy se používají k určení toxického efektu určitého agens (buněčného i nebuněčného) na cílovou buňku. Jsou založeny na barvivech, která není mrtvá buňka schopná vyloučit (např. trypanová modř), na uvolnění látek, které byly předtím do buněk uměle vpraveny (např.  $^{51}\text{Cr}$ ) anebo na uvolnění látek, které buňka za normálních okolností obsahuje (např. LDH). Všechny tyto metody závisí na narušení buněčné stěny. Naproti tomu Ziva-Tox měří míru inhibice syntézy buněčné DNA a tato metoda se ukázala v případě cytotoxického efektu neutrofilů na buňky melanomu jako ideální.

Test začíná navázáním BrdU - značící látky na cílové buňky. Přidání BrdU se provádí buď ve stejném okamžiku, kdy přidáváme i efektorové buňky anebo až po působení efektorových buněk po zamýšlenou dobu. Proliferující buňky inkorporují BrdU do nově vznikající DNA místo thyminu. Čím je tedy míra inkorporovaného BrdU vyšší, tím více docházelo k proliferaci buněk. Navazování probíhá po dobu 2-24 hodin.

Následuje fixace, kdy se k buňkám přidá fixační roztok, který zajistí, aby se buněčná DNA rozvolnila na jednořetězcovou a v této podobě se zafixovala na povrch jamek v panelu. Pokud inkubace efektorů s cíli probíhala v panelu s U-jamkami, tak se v tento okamžik obsah jamek převádí do bílého panelu s plochým dnem (Corning, USA).

Po fixování se vzorky propláchnou a připraví na další krok, jímž je navazování protilátky. Protilátkou je konjugát anti-BrdU-antibody a alkalické fosfatázy. V dalších krocích jsou vzorky důkladně promyty, aby byla odstraněna nenavázaná protilátka.

Do jamek mikropanelu se dále přidává chemiluminiscenční substrát, jehož signál je po dané inkubační době změřen na luminometru.

Kvůli výpočtu výsledných procent specifické cytotoxicity bylo třeba do testu zahrnout následující kontroly:

RLU spont. = směs cílových buněk s 0,1% roztokem azidu sodného a BrdU bez efektorů (100% inhibice syntézy DNA)

RLU max. = pouze cílové buňky s BrdU bez efektorů (maximální syntéza DNA)

RLU exp. = směs cílových buněk s efektorů a BrdU

RLU eff. = pouze efektorové buňky s BrdU bez cílových buněk

### 3.7 Analýza dat

Výsledné hodnoty změřené na luminometru Synergy H1 (BioTek Instruments, USA) byly přepočítány dle následujícího vzorce na výpočet procenta specifické cytotoxicity.

$$\% \text{ Specifické Cytotoxicity} = 1 - \frac{RLU \text{ exp} - RLU \text{ spont} - RLU \text{ eff}}{RLU \text{ max} - RLU \text{ spont} - RLU \text{ eff}} \times 100\%$$

Hodnoty změřené na scintilačním počítači byly na cytotoxickou aktivitu přepočítány podle tohoto vzorce:

$$\text{Cytotoxická aktivita} = \frac{\text{aktivita vzorku} - \text{spontánní uvolnění}}{\text{maximální uvolnění} - \text{spontánní uvolnění}} \times 100\%$$

Tato procenta pak byla vyhodnocena v programu STATISTICA pomocí dvouvýběrového Studentova t-testu.

### 3.8 Pokus č. 1: Porovnání cytotoxického efektu neutrofilů na melanomové buňky s navázaným ligandem laminarinem DOPE a bez ligandu

Buňky melanomu B16-F10 a neutrofilily byly připraveny způsobem, který byl popsán v kapitole 3.4. Do 96-jamkového panelu s kulatým dnem pak byly přidány buňky v různých směsích, jejichž rozložení na destičce ukazuje Obr. 2. Do všech jamek bylo přidáno 20 $\mu$ l *BrdU labeling solution* z cytotoxického testu Ziva-Tox, poté probíhala čtyřhodinová inkubace v termostatu (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) a dále se postupovalo podle návodu pro vyhodnocení cytotoxického testu, který je ve stručnosti popsán výše. Pokus ve stejném schématu byl opakován pětkrát, ve výsledcích je zahrnut pouze reprezentativní výsledek.

	1	2	3	4	5	6	7	8
A								
B		B16-F10 + 0,1% roztok azidu sodného	B16-F10	B16-F10 + Laminarin DOPE	Neutrofilily	B16-F10 + neutrofilily	B16-F10 + Laminarin DOPE + neutrofilily	
C								
D								
E								
F								
G								

**Obr. 2:** Schéma 96-jamkového panelu s rozložením buněk. Melanomové buňky (B16-F10), efektorové buňky (neutrofilily) a ligand (laminarin DOPE).

### 3.9 Pokus č. 2: Porovnání cytotoxického efektu neutrofilů na buňky melanomu s navázaným laminarinem a za přítomnosti volného laminarinu

Pro vyloučení cytotoxického efektu samotného ligandu byla do pokusu zařazena směs buněk obsahující neutrofilily, melanomové buňky a ligand bez kotvící části DOPE; stejně jako další směs obsahující melanomové buňky a ligand bez kotvící části. Volný laminarin byl přidáván v objemu 20 $\mu$ l/jamku o výsledné koncentraci 0,02mM a byl přítomen po celou dobu inkubace. Další schéma pokusu zůstalo stejné, jako v pokusu předchozím.

### **3.10 Pokus č. 3: Zjišťování cytotoxického efektu metodou počítání buněk v Bürkerově komůrce**

Jako alternativu k cytotoxickému testu jsme zkoušeli buňky počítat mechanicky v Bürkerově komůrce za pomoci barvení trypanovou modří. Neutrofilů a buněk B16-F10 byly připraveny stejně jako na cytotoxický test. Poměr efektorových buněk k cílovým byl 20:1, přičemž buňky melanomu byly v koncentraci  $10^5$  buněk/ml a neutrofilů  $2 \times 10^6$  buněk/ml, do panelu byly buňky rozplněny v objemu 100 $\mu$ l/jamku. Inkubace probíhala přes noc v termostatu (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Po skončení inkubace byly jamky 2x propláchnuty PBS a trypsinovány v 50 $\mu$ l roztoku versenu a trypsinu po dobu 5 minut. Působení versenu a trypsinu bylo zastaveno přidáním 150 $\mu$ l media. Každá jamka pak byla důkladně promíchána pipetou a bylo odebráno 50 $\mu$ l, které se smíchaly v poměru 1:1 s trypanovou modří a melanomové buňky byly počítány v Bürkerově komůrce. Každá jamka byla počítána třikrát. Mrtvé buňky se do výsledků nezapočítávaly a díky odlišné velikosti bylo snadno poznatelné, zda se v komůrce jedná o neutrofil či melanomovou buňku. Zaznamenaný počet buněk byl následně přepočítán na počet buněk v jednom mililitru a tyto výsledky byly statisticky vyhodnoceny.

### **3.11 Pokus č. 4: Zjišťování cytotoxického efektu pomocí izotopu <sup>51</sup>Cr**

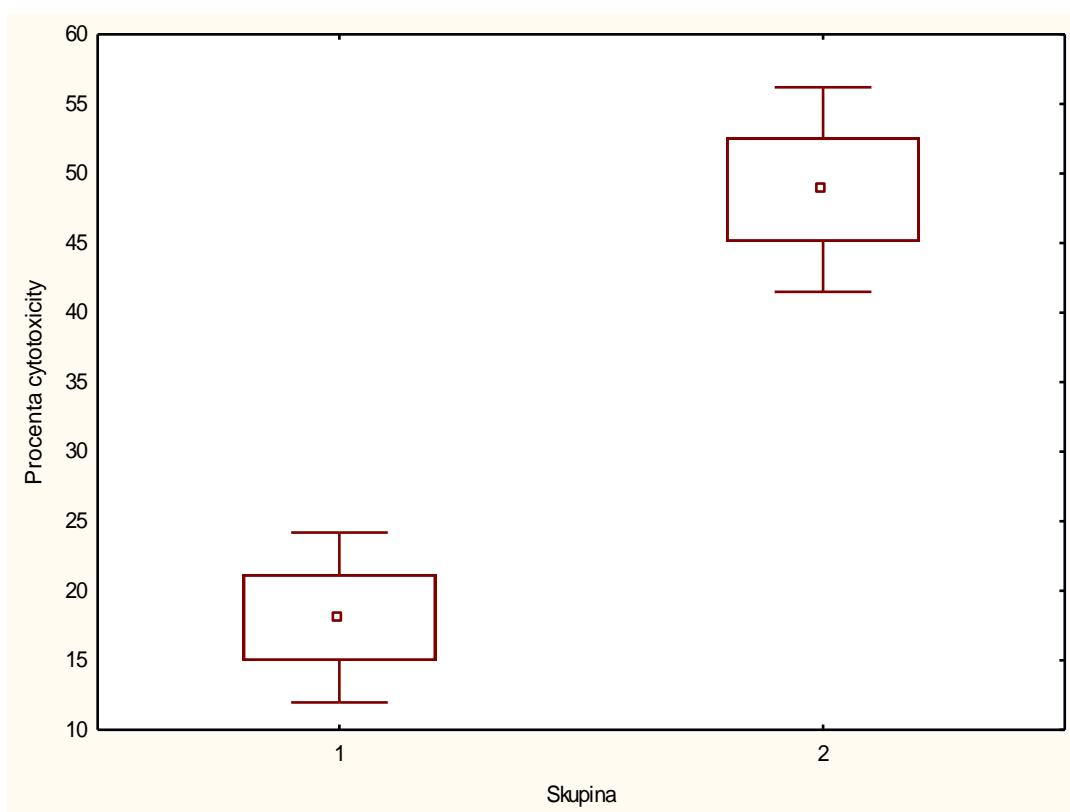
Melanomové buňky byly pomocí versenu s trypsinem sklizeny, naředěny na potřebnou koncentraci a převedeny do objemu 50 $\mu$ l media RPMI s 10% FCS. K této suspenzi pak byl přidán chroman sodný (Na<sub>2</sub><sup>51</sup>CrO<sub>4</sub>) o aktivitě 50 $\mu$ Ci a směs byla inkubována půl hodiny v termostatu (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Po 30 minutách byl přidán 1ml media, směs byla rozdělena na dvě části a jedna doplněna ještě o 50 $\mu$ l 2mM roztoku laminarinu DOPE, následovala inkubace dalších 30min za stejných podmínek. Po celkově hodinové inkubaci byly obě směsi buněk 2x promyty médiem RPMI s 10% FCS kvůli odstranění případného nenavázaného ligandu a neabsorbovaného chromu. Neutrofilů byly připraveny stejným způsobem, jako již bylo uvedeno výše. Efektory s cíli byly smíchány v poměru 10:1 ( $5 \times 10^5$  neutrofilů/jamku;  $5 \times 10^4$  nádorových buněk/jamku) ve výsledném objemu 200 $\mu$ l/jamku. Inkubace probíhala 4 hodiny v termostatu (37°C, 5% CO<sub>2</sub>), poté byla destička centrifugována (5min, 4°C, 1000rpm), z každé jamky bylo odebráno 30 $\mu$ l supernatantu do zkumavky, smícháno s 250 $\mu$ l scintilačního roztoku a takto připravené vzorky byly měřeny na scintilačním počítači.



## 4 Výsledky

### 4.1 Pokus č. 1: Porovnání cytotoxického efektu neutrofilů na melanomové buňky s laminarinem DOPE a bez ligandu

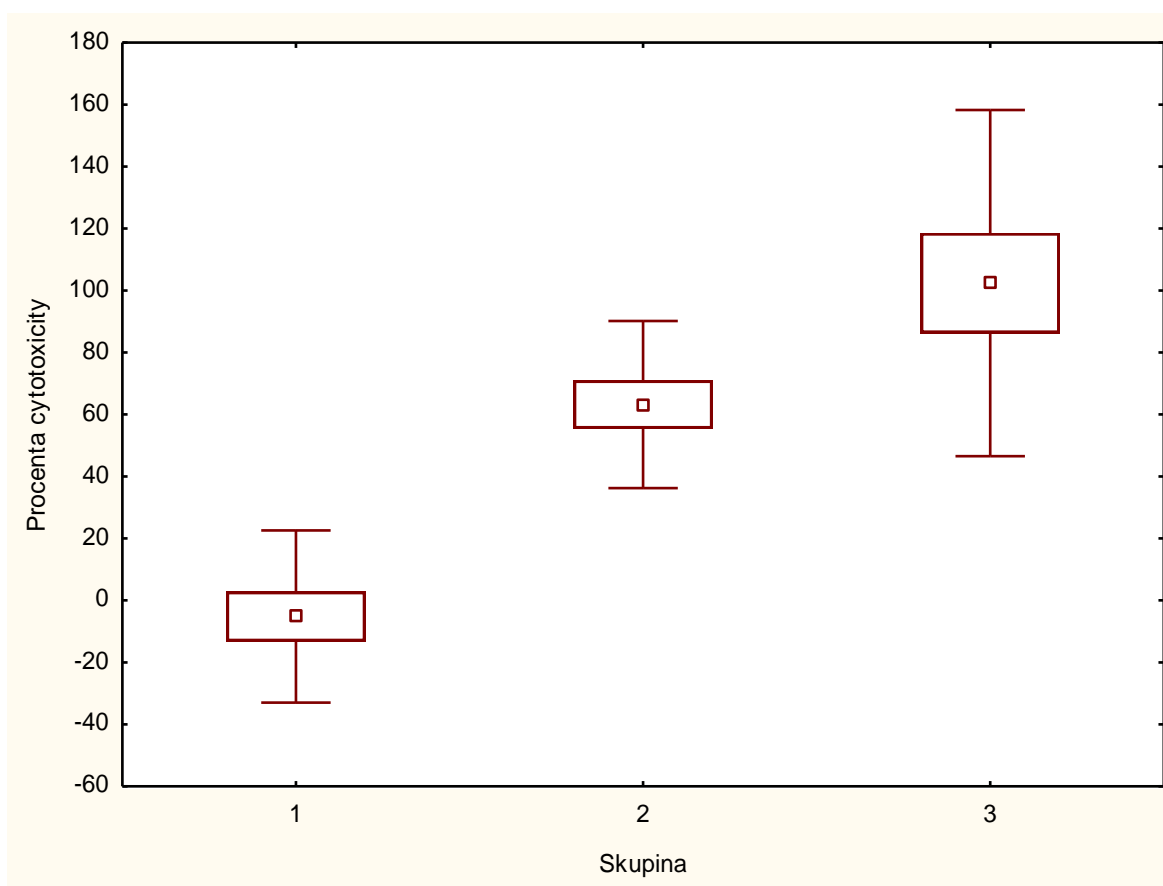
V tomto pokuse byl sledován vliv navázaného ligandu (laminarin DOPE) na cytotoxický efekt neutrofilů na melanomové buňky ve čtyřhodinovém testu. Výsledky jsou uvedeny na Obr. 3. Z grafu je patrné, že ve skupině 2, kde byly obsaženy efektorové buňky a melanomové buňky s navázaným ligandem, mají neutrofilové vyšší cytotoxický efekt než ve skupině 1, kde byly použity nádorové buňky bez ligandu. Rozdíl mezi oběma skupinami je statisticky významný ( $P < 0,05$ ).



**Obr. 3:** Porovnání cytotoxického efektu neutrofilů na melanomové buňky samotné (skupina 1) a na melanomové buňky s navázaným laminarinem DOPE (skupina 2) ( $P < 0,05$ ).

## 4.2 Pokus č. 2: Porovnání cytotoxického efektu neutrofilů na buňky melanomu s navázaným laminarinem a za přítomnosti volného laminarinu

Cílem pokusu bylo ověřit, zda volný laminarin ovlivňuje protinádorový účinek neutrofilů (Obr. 4). Efekt volného laminarinu na cytotoxicitu neutrofilů nebyl statisticky průkazný v porovnání s kontrolními neutrofilů bez ligandu (zřejmě kvůli velkému rozptylu hodnot), ale z grafu je patrné, že přítomnost volného laminarinu má na neutrofilů vliv. Kontrolní skupina 1 obsahovala směs melanomových buněk s volným ligandem, z jehož výsledného cytotoxického efektu je patrné, že samotný volný ligand nádorové buňky nijak neovlivňuje.

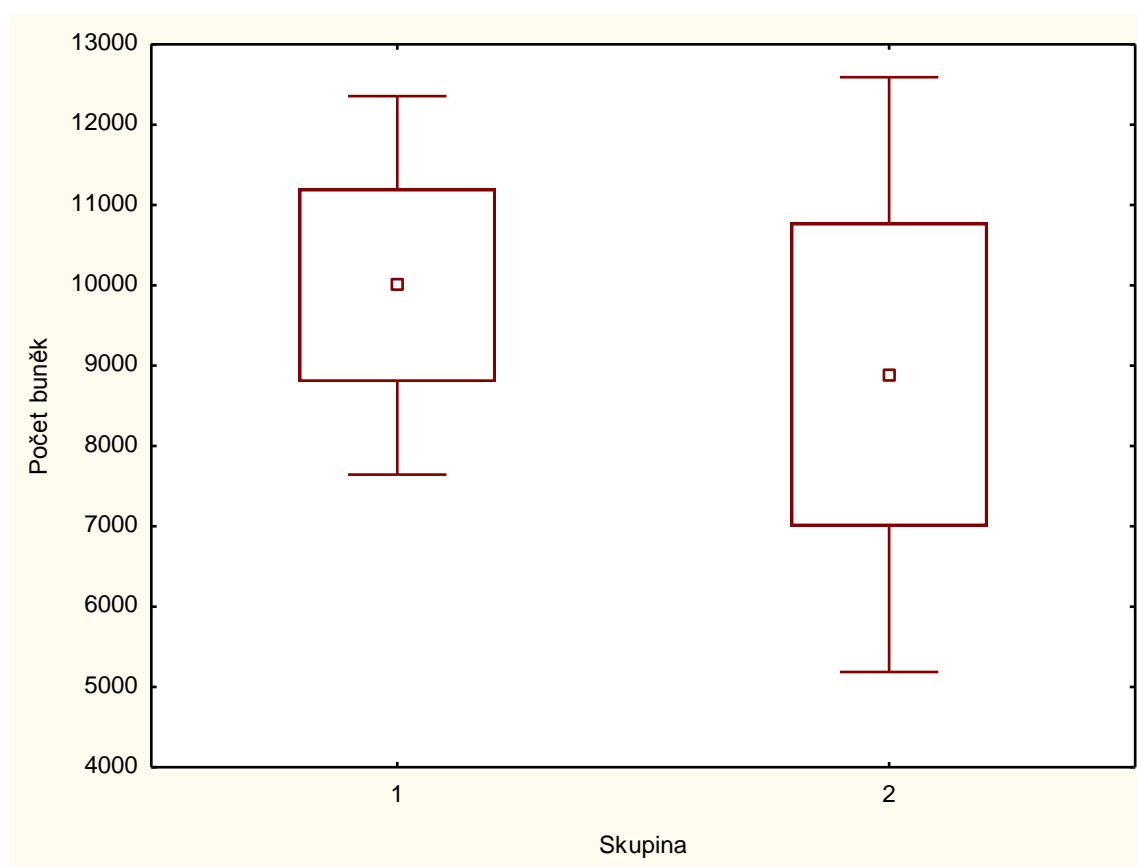


**Obr. 4:** Cytotoxický efekt neutrofilů na buňky B16-F10 (skupina 2) v porovnání s cytotoxickým efektem neutrofilů na stejné buňky za přítomnosti volného ligandu (skupina 3) a kontrola v podobě cytotoxického efektu samotného volného laminarinu na melanomové buňky bez efektorů (skupina 1).

Studentův t-test byl prováděn pro porovnání skupiny 2 a skupiny 3, skupina 1 je v grafu zahrnuta pouze jako kontrolní. Záporné hodnoty cytotoxické aktivity u této skupiny jsou způsobeny tím, že inkorporace BrdU změřená na luminometru byla u kontrolní směsi melanomových buněk s volným ligandem vyšší než u skupiny obsahující samotné melanomové buňky bez dalších přidaných látek. Tím je potvrzeno, že samotný volný ligand nemá na cílové buňky žádný vliv, ale zdá se, že nějakým způsobem ovlivňuje neutrofilů. Naopak procenta cytotoxické aktivity vyšší než 100% u skupiny 3 jsou způsobena tak výraznou inhibicí inkorporace BrdU do DNA, že po odečtení *RLU spont.* a *RLU eff.* vycházel číselný zlomek (kapitola 3.7) záporný, což po jeho odečtení od jedné způsobilo hodnotu vyšší než 100%. Ze třech opakování se hodnota vyšší než 100% vyskytla pouze jednou, je tedy možné, že byla způsobena chybou při provádění testu.

### 4.3 Pokus č. 3: Zjišťování cytotoxického efektu metodou počítání buněk v Bürkerově komůrce

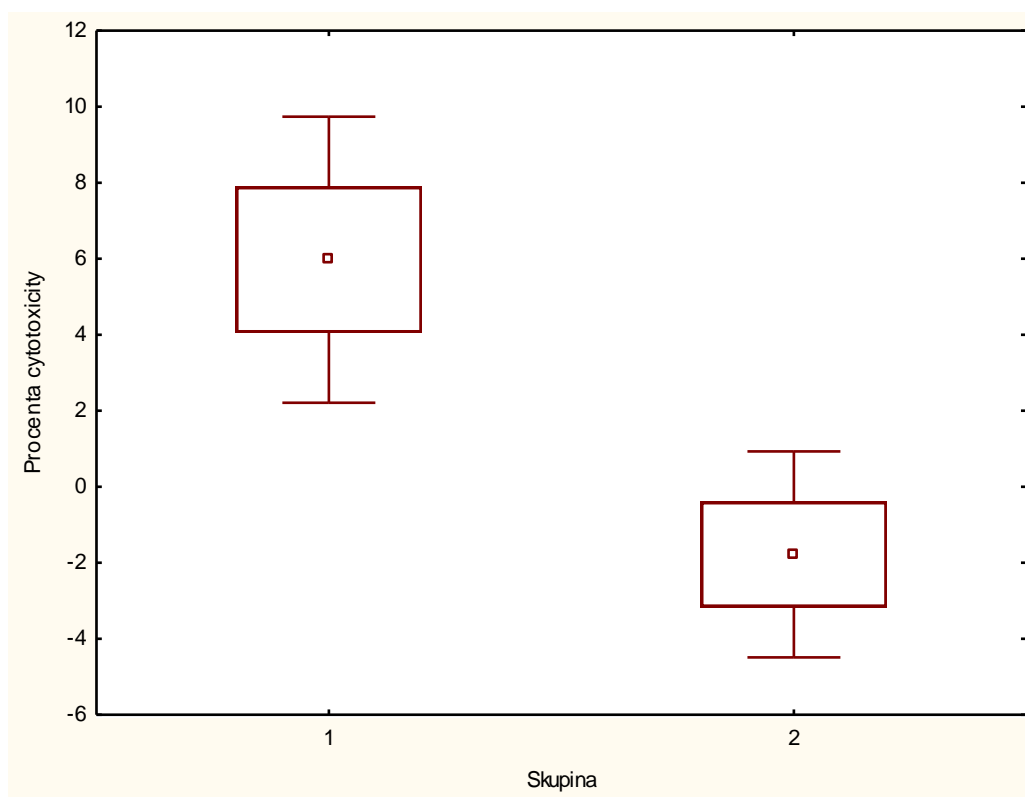
Cílem pokusu bylo ověřit výsledky získané v cytotoxickém testu Ziva-Tox alternativním testem založeným na počítání živých melanomových buněk. (Obr. 5). Je patrné, že mezi skupinou, obsahující směs neutrofilů a nádorových buněk a mezi skupinou, kde byly netrofilily spolu s nádorovými buňkami označenými ligandem, není statisticky významný rozdíl.



**Obr. 5:** Porovnání cytotoxického efektu neutrofilů na buňky B16-F10 (skupina 1) a na buňky B16-F10 značené laminarinem DOPE (skupina 2).

#### 4.4 Pokus č. 4: Zjišťování cytotoxického efektu pomocí izotopu $^{51}\text{Cr}$

Tento pokus byl zaměřen na vyzkoušení alternativního cytotoxického testu k Ziva Tox testu. Byl použit radioaktivní chrom a procenta cytotoxicity byla vypočítána podle množství uvolněného chromu z lyzovaných cílových buněk. Výsledná cytotoxická procenta vypočítaná z údajů naměřených na scintilačním počítači jsou znázorněna na Obr. 6. Mezi neutrofilů působícími na melanomové buňky samotné a na melanomové buňky s navázaným laminarinem DOPE je statisticky významný rozdíl ( $P < 0,05$ ).



**Obr. 6:** Cytotoxický efekt neutrofilů na buňky melanomu bez ligandu (skupina 1) a na buňky melanomu s navázaným laminarinem DOPE (skupina 2), rozdíl je statisticky významný ( $P < 0,05$ ).

Tento test ukazuje, že působení neutrofilů na melanomové buňky bez ligandu je statisticky průkazně vyšší než jejich působení na buňky s ligandem. Je třeba ale poznamenat, že výsledná cytotoxická procenta jsou velmi nízká (průměr 6% u skupiny, kde byly buňky bez ligandu) a u skupiny, kde byl na melanomové buňky navázán ligand, vycházely dokonce záporně (průměr -2%). Lze to vysvětlit relativně vysokými hodnotami spontánního uvolnění

radioaktivního izotopu u buněk kultivovaných bez efektorů. Problém vysokého pozadí u tohoto typu testu zmiňují i Bartůňková a Paulík (2005) a poukazují na jeho častý výskyt při použití cílů ve formě nádorových buněk.

## 5 Diskuze

Cílem bakalářské práce bylo podrobněji se seznámit s imunitními mechanismy, které se účastní obrany proti nádorům. Z dostupné literatury je zřejmé, že se protinádorové imunity neúčastní pouze adaptivní imunita reprezentovaná cytotoxickými T lymfocyty, ale významnou roli zřejmě hrají i mechanismy přirozené nespecifické imunity jako jsou NK buňky, NKT buňky, makrofágy a různé typy granulocytů. Oba typy imunity v protinádorové obraně nepochybně spolupracují. Na druhé straně se zejména buňky přirozené imunity účastní mechanismů, pomocí kterých nádory unikají imunitní kontrole

CD4<sup>+</sup> T-lymfocyty můžeme dělit na podtypy T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2, T<sub>H</sub>17 a Treg buňky. Každý z těchto podtypů má v protinádorové imunitě svou roli a často jsou tyto role antagonistické. T<sub>H</sub>1 buňky se vyznačují expresí IFN- $\gamma$  a TNF- $\alpha$ , čímž napomáhají protinádorové imunitě, T<sub>H</sub>2 buňky exprimují IL-4, -5, -6, -10 a -13, což způsobuje blokaci buněčné protinádorové odpovědi, ale také může mít vliv na aktivaci B-buněk (Parker et al. 1993).

CD4<sup>+</sup> T<sub>H</sub>17 buňky jsou charakteristické expresí IL-17, -17F, -21, -22 a IL-23 receptoru (IL-23R) a jsou známé pro svojí dvojí roli v protinádorové imunitě. Mohou podporovat jak imunitní reakci proti nádoru díky schopnosti navádění DC, NK buněk a CD8<sup>+</sup> buněk k nádoru, tak nádorový růst prostřednictvím pozitivního vlivu na angiogenezi (Martin et al. 2012). Zajímavá je také jejich schopnost transdiferenciace na regulační T-lymfocyty (Treg), které působí na imunitní systém supresivně (Feng and Wang 2010), či na T<sub>H</sub>1-like buňky, které produkují IFN- $\gamma$  a tím redukuje nádor.

Treg buňky mají řadu schopností, jimiž podporují růst nádoru jako např.: sekrece inhibičních cytokínů (Collison et al. 2007); cytolýza NK buněk, T-buněk a DC pomocí perforinu a granzymu-B (Cao et al. 2007) nebo inhibice funkce DC expresí molekul jako je CTLA-4 či LAG-3, které potlačují zránění DC (Liu and Wang 2009). Není tedy překvapující, že akumulace Treg buněk při nádorovém onemocnění znamená negativní prognózu. Jsou ale známy i případy, kdy nahromadění Treg buněk působilo jako příznivý faktor (Ladoire et al. 2011).

Podobně jako CD4<sup>+</sup> T-lymfocyty, i makrofágy mají více subtypů. Protinádorové účinky M1 fenotypu *Tumor associated macrophages* (TAM) byly prokázány díky produkci chemokinů a cytokinů jako je např. IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-23 a IL-12, které aktivují NK buňky a T<sub>H</sub>1 buňky. Na druhou stranu M2 fenotyp TAM produkcí TGF- $\beta$  a IL-10 inhibuje protinádorovou imunitní odpověď (Biswas and Mantovani 2010). Foster et al. (2007) poukazuje na schopnost makrofágů, která se podobá imunitní paměti buněk adaptivní imunity. Toto chování spočívá v modifikaci histonů po setkání s patogenem tak, aby byla buňka adaptovaná na opětovné setkání.

Analogicky k makrofágům mají i neutrofilů dva fenotypy, které již byly krátce zmíněny v kapitole 1.2.2. Tyto TAN mají oproti „klasickým“ neutrofilům významnou up-regulaci různých cytokinů a chemokinů, což naznačuje, že hrají důležitou roli v navádění ostatních buněk imunitního systému směrem k nádoru (Fridlender and Albelda 2012). Dále mezi protinádorové účinky patří jejich cytotoxicita díky ROS (*reactive oxygen species*). Na druhou stranu Queen et al. (2005) popisuje, že nádorové buňky jsou schopny stimulovat neutrofilů k produkci oncostatinu-M, který podporuje tvorbu metastáz a angiogenezi. TAN mohou inhibovat funkce T-buněk (Fridlender and Albelda 2012) a dokonce hrají roli při iniciaci vzniku nádoru (Piccard et al. 2012). Mezi protinádorové účinky „běžných“ neutrofilů pak patří schopnost sloužit jako antigen prezentující buňky (APC), což je činí zodpovědné za imunitní odpověď T<sub>H</sub>1 a T<sub>H</sub>17 buněk (Abdallah et al. 2011).

V závislosti na výše uvedených poznatcích o fungování imunitního systému se objevují stále nové imunoterapeutické přístupy založené buď na podporování jedné, nádor potlačující větve imunity, či na inhibici druhé, imunosupresivní větve. Z těchto terapií nepochybně stojí za zmínku blokáce antigenu CTLA-4 (cytotoxin T-lymphocyte antigen-4) pomocí monoklonální protilátky. CTLA-4 je inhibiční receptor exprimovaný na povrchu efektorových T-buněk a snižuje jejich aktivaci. Blokáci tohoto receptoru za pomoci monoklonální protilátky bylo v klinickém testování dosaženo zvýšení průměrné doby přežití až o 3,5 měsíce a pracuje se na optimalizaci dávkování a kombinaci monoklonální protilátky s dalšími látkami (Shanker and Marincola 2011). S dalším zajímavým přístupem přišel Ries et al. (2014), jehož terapie je založena na podání protilátky proti receptoru pro *colony-stimulating-factor 1* (CSF-1), který je zásadní pro přežívání tumor-infiltrujících makrofágů. Po podání protilátky dochází k výrazné redukci TAM a k zvýšení poměru CD8<sup>+</sup> buněk ku CD4<sup>+</sup> buňkám. Tel et al. (2012) uvádí překvapivou schopnost dendritických plazmatických



buněk produkujících interferony typu I zabíjet nádorové buňky. Počáteční nadšení pro využití těchto buněk jako vakcín proti nádorovým onemocněním se neseťkalo s odpovědí u pacientů v klinickém testování (Palucka et al. 2010), ale přesto má využití zabíječských dendritických buněk v protinádorové terapii budoucnost minimálně co se rekombinantních chemoterapeutických či radioterapeutických vakcín týče (Hanke et al. 2013). Pokud budou blíže prozkoumány mechanismy působení těchto buněk a bude možné využít jejich kombinovaný potenciál jakožto buněk zároveň efektorových a antigen prezentujících, výsledná imunoterapie by mohla být velmi efektivní.

Dalším z přístupů v imunoterapii nádorů je použití agonistů Toll-like receptorů pro léčbu nádorových onemocnění a alergií (Kanzler et al. 2007). Problém v podobě rozpoznání cíle takto aktivovanými buňkami přirozené imunity vyřešila Janotová et al. (2014) pomocí zkombinování agonisty Toll-like receptoru lipopolysacharidu s agonistou fagocytárního receptoru navázaným na cílovou, nádorovou buňku. Výsledky jejich výzkumu korespondují s již známými fakty o vzájemném působení Toll-like receptorů a fagocytárních receptorů (Underhill and Gantner 2004) a díky ukotvení nízkomolekulárního  $\beta$ -glukanu laminarinu přímo na povrch cílových buněk nalézají využití tohoto ligandu v protinádorové imunitě, přestože nekotvený laminarin je znám jako inhibitor dectinu-1 (Frasnelli et al. 2005).

Z výsledků našich pokusů je patrné, že cytotoxické testy vyžadující lýzu cílových buněk (počítání buněk v Bürkerově komůrce, cytotoxický test používající radioaktivní chrom) nemají při stejném uspořádání pokusu shodný výsledek jako při použití testu Ziva Tox. Vzhledem k tomu, že efekt ligandů fagocytárních receptorů jsme prokázali opakovaně *in vitro* a Janotová et al. (2014) také *in vivo*, zdá se, že pro testování cytotoxického efektu neutrofilů na melanomové buňky jsou vhodné cytotoxické testy, které nevyžadují lýzu cílových buněk. V případě Ziva Tox testu se jedná o měření míry inhibice syntézy DNA, což by naznačovalo, že neutrofilů mají zřejmě dosud ne zcela objasněné mechanismy, jakými mohou ovlivňovat životaschopnost nádorových buněk, aniž by je přímo lýzovaly.

Frasnelli et al. (2005) ve své práci uvádí, že volný laminarin působí jako inhibitor dectinu-1, což by nasvědčovalo tomu, že za jeho přítomnosti budou obsazeny fagocytární receptory na neutrofilech a jejich imunitní odpověď proti nádorovým buňkám bude snížena. Naše pokusy ale ukázaly opačnou tendenci. Janotová et al. (2014) ve své práci, kde testuje vliv fagocytárních receptorů (mimo jiné i laminarinu) *in vivo*, uvádí, že po vpravení volného laminarinu do myšního peritonea nebyl prokázán žádný vliv na redukci nádoru. Tento rozpor

v *in vivo* a *in vitro* testech si vysvětlujeme tím, že celý mechanismus působení neutrofilů na nádorové buňky je prozkoumán zatím jen minimálně a v těle myši, kde jsou neutrofilové součástí komplexního působení imunitního systému, může docházet k interakcím, které nejsou v *in vitro* pokusech možné, a tak mohou být odlišné i výsledky. Bylo by do budoucna vhodné tímto směrem orientovat další výzkum.

## 6 Závěr

- Protinádorová imunita je složitý systém, jehož složky mohou působit různě podle prostředí, ve kterém se vyskytují. Většina buněk má jak pronádorové, tak protinádorové působení.
- Role přirozené imunity v obraně proti nádoru je stále ještě velmi málo prozkoumaná, ale porozumění jejím mechanismům slibuje možné využití v terapii proti nádorovým onemocněním.
- Ligand fagocytárního receptoru – laminarin po navázání na nádorové buňky prokazatelně zvyšuje cytotoxický efekt neutrofilů na tyto buňky.
- Pro zkoumání cytotoxického efektu neutrofilů na nádorové buňky se jako nejvhodnější jeví cytotoxické testy, které nejsou založené na lýze cílových buněk.

## 7 Seznam zkratek

ADCC = *Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*, na protilátkách závislá buněčná cytotoxicita

APC = *antigen presenting cells*, antigen prezentující buňky

BrdU = bromodeoxyuridin

CARs = chimérické antigenní receptory

CSF-1 = *colony-stimulating-factor 1*, kolonie stimulující faktor 1

CTLA 4 = *cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4*, antigen asociovaný s cytotoxickými T-lymfocyty

DNA = deoxyribonukleová kyselina

DOPE = -(Succinimidyl-oxo-glutaryl)-L- $\alpha$ -phosphatidylethanolamin, Dioleoyl

EBV = virus Epsteina a Baarové

GM-CSF = *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*

HBV = *hepatitis B virus*, virus hepatitidy B

HIV = virus lidské imunitní nedostatečnosti

HLA = *human leukocyte antigen*, lidský leukocytový antigen

HPV = lidský papilomavirus

IFN $\alpha$  = interferon  $\alpha$

IL- = interleukin-

KIR = *killer immunoglobulin-like receptor*

LDH = laktát dehydrogenáza

LPS = lipopolysacharid

MAbs = monoklonální protilátky

MCA = metylcholantren

MDSC = *myeloid-derived suppressor cell*, supresorové buňky myeloidní řady

NCR = *natural cytotoxicity receptor*,

NK buňky = *natural killers*, přirození zabíječi

NETs = *neutrophil extracellular traps*, neutrofilové extracelulární pasti

PAMPs = *pathogen associated molecular patterns*, s patogenem asociované molekulové vzory

PRRs = *pattern recognition receptors*, receptory rozpoznávající motivy patogenů

RLU = *relative light unit*

RNA = ribonukleová kyselina

ROS = *reactive oxygen species*,

SIRP  $\alpha$  = *signal-regulatory protein alpha*

TAM = *tumor-associated macrophages*, s nádorem asociované makrofágy

TAN = *tumor-associated neutrophils*, s nádorem asociované neutrofilly

TGF- $\beta$  = *transforming growth factor- $\beta$* , transformující růstový faktor  $\beta$

T<sub>H</sub> = pomocné T-lymfocyty

TILs = tumor infiltruující lymfocyty

TLR = ligand Toll-like receptoru

TNF = *tumor necrosis factor*, faktor nádorové nekrózy

## 8 Seznam použité literatury

- ABDALLAH, Delbert S. Abi; EGAN, Charlotte E.; DENKERS, Eric Y. Mouse neutrophils are professional antigen-presenting cells programmed to instruct Th1 and Th17 T-cell differentiation. *International Immunology*, 2011, 23: 317-326.
- ALLAVENA, Paola; SICA, Antonio; GARLANDA, Cecilia; MANTOVANI, Alberto. The Yin-Yang of tumor-associated macrophages in neoplastic progression and immune surveillance. *Immunological Reviews*, 2008, 222: 155-161.
- BARTŮŇKOVÁ, Jiřina; PAULÍK, Milan. *Vyšetřovací metody v imunologii*. Vyd. 1. Praha: Grada, 2005, 176 s., [12] s. obr. příl. ISBN 80-247-0691-1.
- BARTŮŇKOVÁ, Jiřina; ŠPÍŠEK, Radek; PODRAZIL, Michal; KUKLÍK, Rostislav. Imunoterapie karcinomu prostaty. *Onkologie*, 2014, 8: 6-8.
- BELLONE, Matteo, et al. iNKT cells control mouse spontaneous carcinoma independently of tumor-specific cytotoxic T cells. *PloS One*, 2010, 5: e8646.
- BENATAR, Tania, et al. IL-17E, a proinflammatory cytokine, has antitumor efficacy against several tumor types in vivo. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 2010, 59: 805-817.
- BISWAS, Subhra K.; MANTOVANI, Alberto. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nature Immunology*, 2010, 11: 889-896.
- BRAUMÜLLER, Heidi et al., T-helper-1-cell cytokines drive cancer into senescence. *Nature*, 2013, 494: 361-365.
- BRINKMANN, Volker; ZYCHLINSKY, Arturo. Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin?. *The Journal of Cell Biology*, 2012, 198: 773-783.
- BROZ, Miranda L.; KRUMMEL, Matthew F. The Emerging Understanding of Myeloid Cells as Partners and Targets in Tumor Rejection. *Cancer Immunology Research*, 2015, 3: 313-319.
- BURNET, Macfarlane. Cancer - a biological approach: I. The processes of control. II. The significance of somatic mutation. *British Medical Journal*, 1957, 1: 779.
- CARUSO, Rosario Alberto, et al. Ultrastructural descriptions of heterotypic aggregation between eosinophils and tumor cells in human gastric carcinomas. *Ultrastructural Pathology*, 2011, 35: 145-149.
- CAO, Xuefang; CAI, Sheng F.; FEHNIGER, Todd A.; SONG, Jiling; COLLINS, Lynne I.; PIWNICA-WORMS, David R.; LEY, Timothy J. Granzyme B and perforin are

important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity*, 2007, 27: 635-646.

- COLLISON, Lauren W., et al. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature*, 2007, 450: 566-569.
- DARCY, Phillip K.; NEESON, Paul; YONG, Carmen SM.; KERSHAW, Michael H. Manipulating immune cells for adoptive immunotherapy of cancer. *Current Opinion in Immunology*, 2014, 27: 46-52.
- DAVIS, Ian D., et al. Clinical and biological efficacy of recombinant human interleukin-21 in patients with stage IV malignant melanoma without prior treatment: a phase IIa trial. *Clinical Cancer Research*, 2009, 15.6: 2123-2129.
- DUNN, Gavin P.; BRUCE, Allen T.; IKEDA, Hiroaki; OLD, Lloyd J.; SCHREIBER, Robert D. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature Immunology*, 2002, 3: 991-998.
- DUNN, Gavin P.; OLD, Lloyd J.; SCHREIBER, Robert D. The three Es of cancer immunoediting. *Annual Review of Immunology*, 2004, 22: 329-360.
- DUNN, Gavin P.; KOEBEL, Catherine M.; SCHREIBER, Robert D. Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nature Reviews Immunology*, 2006, 6: 836-848.
- EHRLICH, Paul. Über den jetzigen Stand der Chemotherapie. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, 1909, 42: 17-47.
- ENDERLING, Heiko; HLATKY, Lynn; HAHNFELDT, Philip. Immunoediting: evidence of the multifaceted role of the immune system in self-metastatic tumor growth. *Theoretical Biology and Medical Modelling*, 2012, 9: 31-31.
- EVEL-KABLER, Kevin; SONG, Xiao-Tong; ALDRICH, Melissa; HUANG, Xue F.; CHEN, Si-Yi. SOCS1 restricts dendritic cells' ability to break self tolerance and induce antitumor immunity by regulating IL-12 production and signaling. *Journal of Clinical Investigation*, 2006, 116: 90.
- FENG, Li-li; WANG, Xin. Targeting Foxp3+ regulatory T cells-related immunosuppression for cancer immunotherapy. *Chinese Medical Journal*, 2010, 123: 3334-3342.
- FOSTER, Simmie L.; HARGREAVES, Diana C.; MEDZHITOV, Ruslan. Gene-specific control of inflammation by TLR-induced chromatin modifications. *Nature*, 2007, 447: 972-978.

- FRASNELLI, Matthias E.; TARUSSIO, David; CHOBASZ-PÉCLAT, Veronique; BUSSO, Nathalie; SO, Alexander. TLR2 modulates inflammation in zymosan-induced arthritis in mice. *Arthritis Research & Therapy*, 2005, 7: R370-9.
- FRIDLENDER, Zvi G., et al. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF- $\beta$ : “N1” versus “N2” TAN. *Cancer Cell*, 2009, 16: 183-194.
- FRIDLENDER, Zvi G.; ALBELDA, Steven M. Tumor-associated neutrophils: friend or foe?. *Carcinogenesis*, 2012, 33: 949-955.
- GABRILOVICH, Dmitry I.; OSTRAND-ROSENBERG, Suzanne; BRONTE, Vincenzo. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nature Reviews Immunology*, 2012, 12: 253-268.
- GORELIK, E.; WILTROUT, R. H.; BRUNDA, M. J.; HOLDEN, H. T.; HERBERMAN, R. B. Augmentation of metastasis formation by thioglycollate-elicited macrophages. *International Journal of Cancer*, 1982, 29: 575-581.
- HALIOTIS, Tina; BALL, Judith K.; DEXTER, David; RODER, John C. Spontaneous and induced primary oncogenesis in natural killer (NK)-cell-deficient beige mutant mice. *International Journal of Cancer*, 1985, 35: 505-513.
- HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 2011, 144: 646-674.
- HANKE, N.; ALIZADEH, D.; KATSANIS, E.; LARMONIER, N. Dendritic cell tumor killing activity and its potential applications in cancer immunotherapy. *Critical Reviews™ in Immunology*, 2013, 33.
- CHICOINE, Michael R.; WON, Eun Kyung; ZAHNER, Michael C. Intratumoral injection of lipopolysaccharide causes regression of subcutaneously implanted mouse glioblastoma multiforme. *Neurosurgery*, 2001, 48: 607-615.
- IANNELLO, Alexandre; THOMPSON, Thornton W.; ARDOLINO, Michele; LOWE, Scott W.; RAULET, David H. p53-dependent chemokine production by senescent tumor cells supports NKG2D-dependent tumor elimination by natural killer cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 2013, 210: 2057-2069.
- JANOTOVÁ, Tereza, et al. The Use of Anchored Agonists of Phagocytic Receptors for Cancer Immunotherapy: B16-F10 Murine Melanoma Model. *PloS One*, 2014, 9: e85222.
- KALOS, Michael; LEVINE, Bruce L.; PORTER, David L.; KATZ, Sharyn; GRUPP, Stephan A.; BAGG, Adam; JUNE, Carl H. T cells with chimeric antigen receptors have



potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia. *Science Translational Medicine*, 2011, 3: 95ra73-95ra73.

- KANTOFF, Philip W., et al. Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *New England Journal of Medicine*, 2010, 363: 411-422.
- KANZLER, H.; BARRAT, F. J.; HESSEL, E. M.; COFFMAN, R. L. Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists. *Nature Medicine*, 2007, 13: 552-559.
- KLAPPER, Jacob A., et al. High-dose interleukin-2 for the treatment of metastatic renal cell carcinoma. *Cancer*, 2008, 113: 293-301.
- KOBAYASHI, Yoshiro. Neutrophil infiltration and chemokines. *Critical Reviews™ in Immunology*, 2006, 26.
- LADOIRE, Sylvain; MARTIN, François; GHIRINGHELLI, François. Prognostic role of FOXP3+ regulatory T cells infiltrating human carcinomas: the paradox of colorectal cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 2011, 60: 909-918.
- LEGRAND, Fanny, et al. Human eosinophils exert TNF- $\alpha$  and granzyme A-mediated tumoricidal activity toward colon carcinoma cells. *The Journal of Immunology*, 2010, 185: 7443-7451.
- LIU, X. Q.; WANG, Xin. Indoleamine 2, 3-dioxygenase in tumor induced tolerance. *Chinese Medical Journal*, 2009, 122: 3072-3077.
- LOTFI, Ramin; LEE, James J.; LOTZE, Michael T. Eosinophilic granulocytes and damage-associated molecular pattern molecules (DAMPs): role in the inflammatory response within tumors. *Journal of Immunotherapy*, 2007, 30: 16-28.
- MACKIE, Rona M.; REID, Robin; JUNOR, Brian. Fatal melanoma transferred in a donated kidney 16 years after melanoma surgery. *New England Journal of Medicine*, 2003, 348: 567-568.
- MANTOVANI, Alberto; SOZZANI, Silvano; LOCATI, Massimo; ALLAVENA, Paola; SICA, Antonio. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends in immunology*, 2002, 23: 549-555.
- MARIANI, Christopher L.; RAJON, Didier; BOVA, Francis J.; STREIT, Wolfgang J. Nonspecific immunotherapy with intratumoral lipopolysaccharide and zymosan A but not GM-CSF leads to an effective anti-tumor response in subcutaneous RG-2 gliomas. *Journal of Neuro-oncology*, 2007, 85: 231-240.

- MARRACO, Silvia A. Fuertes, et al. Novel murine dendritic cell lines: a powerful auxiliary tool for dendritic cell research. *Frontiers in Immunology*, 2012, 3.
- MARTIN, François; APETOH, Lionel; GHIRINGHELLI, François. Controversies on the role of Th17 in cancer: a TGF- $\beta$ -dependent immunosuppressive activity?. *Trends in Molecular Medicine*, 2012, 18: 742-749.
- MARTINEZ, Fernando O.; HELMING, Laura; GORDON, Siamon. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annual Review of Immunology*, 2009, 27: 451-483.
- MATTES, Joerg, et al. Immunotherapy of Cytotoxic T Cell-resistant Tumors by T Helper 2 Cells An Eotaxin and STAT6-dependent Process. *The Journal of Experimental Medicine*, 2003, 197: 387-393.
- NARENDRA, Bodduluru Lakshmi; REDDY, Kasala, Eshvendar; SHANTIKUMAR, Saladi; RAMAKRISHNA, Sistla. Immune system: a double-edged sword in cancer. *Inflammation Research*, 2013, 62: 823-834.
- PALUCKA, K; UENO, H.; ZURAWSKI, G.; FAY, J.; BANCHEREAU, J. Building on dendritic cell subsets to improve cancer vaccines. *Current Opinion in Immunology*, 2010, 22: 258-263.
- PARKER, David C. T cell-dependent B cell activation. *Annual Review of Immunology*, 1993, 11: 331-360.
- PICCARD, H.; MUSCHEL, R. J.; OPDENAKKER, Ghislain. On the dual roles and polarized phenotypes of neutrophils in tumor development and progression. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 2012, 82: 296-309.
- QUEEN, Marisa M.; RYAN, Randall E.; HOLZER, Ryan G.; KELLER-PECK, Cynthia R.; JORCYK, Cheryl L. Breast cancer cells stimulate neutrophils to produce oncostatin M: potential implications for tumor progression. *Cancer Research*, 2005, 65: 8896-8904.
- RIES, Carola H., et al. Targeting tumor-associated macrophages with anti-CSF-1R antibody reveals a strategy for cancer therapy. *Cancer Cell*, 2014, 25: 846-859.
- ROSENBERG, Steven A., et al. Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy. *Clinical Cancer Research*, 2011, 17: 4550-4557.

- ROWDO, Florencia Paula Madorsky; BARON, Antonela; URRUTIA, Mariela; MORDOH, José. Immunotherapy in Cancer: A Combat between Tumors and the Immune System; You Win Some, You Lose Some. *Frontiers in Immunology*, 2015, 6.
- SHANKARAN, Vijay, et al. IFN $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature*, 2001, 410: 1107-1111.
- SHANKER, Anil; MARINCOLA, Francesco M. Cooperativity of adaptive and innate immunity: implications for cancer therapy. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 2011, 60: 1061-1074.
- SIEGEL, Rebecca, et al. Cancer statistics, 2014. *CA: Cancer Journal for Clinicians*, 2014, 64: 9-29.
- SMYTH, Mark J.; GODFREY, Dale I.; TRAPANI, Joseph A. A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nature Immunology*, 2001, 2: 293-299.
- STENFELDT, Anna-Lena; WENNERÅS, Christine. Danger signals derived from stressed and necrotic epithelial cells activate human eosinophils. *Immunology*, 2004, 112: 605-614.
- STERN, M.; HERRMANN, R. Overview of monoclonal antibodies in cancer therapy: present and promise. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 2005, 54: 11-29.
- STEWART, Bernard W a Chris WILD. *World Cancer Report 2014*. xiv, 630 pages. ISBN 9283204298.
- TEL, Jurjen; SMITS, Evelien L.; ANGUILLÉ, Sébastien; JOSHI, Rubin N.; FIGOR, Carl G.; DE VRIES, I. Jolanda M. Human plasmacytoid dendritic cells are equipped with antigen-presenting and tumoricidal capacities. *Blood*, 2012, 120: 3936-3944.
- TENG, Michele WL, et al. Opposing roles for IL-23 and IL-12 in maintaining occult cancer in an equilibrium state. *Cancer Research*, 2012, 72: 3987-3996.
- TEPPER, Robert I.; COFFMAN, Robert L.; LEDER, Philip. An eosinophil-dependent mechanism for the antitumor effect of interleukin-4. *Science*, 1992, 257: 548-551.
- UNDERHILL, David M.; GANTNER, Benjamin. Integration of Toll-like receptor and phagocytic signaling for tailored immunity. *Microbes and Infection*, 2004, 6: 1368-1373.
- VIVIER, Eric; TOMASELLO, Elena; BARATIN, Myriam; WALZER, Thierry; UGOLINI, Sophie. Functions of natural killer cells. *Nature Immunology*, 2008, 9: 503-510.

- VON WASIELEWSKI, R., et al. Tissue eosinophilia correlates strongly with poor prognosis in nodular sclerosing Hodgkin's disease, allowing for known prognostic factors. *Blood*, 2000, 95: 1207-1213.
- WEISKOPF, Kipp, et al. Engineered SIRP $\alpha$  variants as immunotherapeutic adjuvants to anticancer antibodies. *Science*, 2013, 341: 88-91.
- WESOLOWSKI, Robert; MARKOWITZ, Joseph; CARSON, William E. Myeloid derived suppressor cells-a new therapeutic target in the treatment of cancer. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 2013, 1.
- WILLINGHAM, Stephen B., et al. The CD47-signal regulatory protein alpha (SIRP $\alpha$ ) interaction is a therapeutic target for human solid tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012, 109: 6662-6667.
- WOLCHOK, Jedd D., et al. Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. *New England Journal of Medicine*, 2013, 369: 122-133.