

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

**Imunoterapie melanomu a pankreatického  
adenokarcinomu na myším modelu**

Bakalářská práce

**Linda Jandová**

Vedoucí práce: RNDr. Jan Ženka, CSc.

České Budějovice 2017

Jandová L., 2017: Imunoterapie melanomu a pankreatického adenokarcinomu na myším modelu. [Immunotherapy of melanoma and pancreatic adenocarcinoma in a mouse model. Bc. Thesis, in Czech.] – 51 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

### **Annotation:**

The aim of this thesis is focused on possibilities of cancer immunotherapy which was studied in mouse B16-F10 melanoma model and in mouse Panc02 pancreatic adenocarcinoma model. We compared the effect of various compounds stimulating both innate and adaptive immunity using *in vivo* and *in vitro* experiments. The study also monitors incidence of metastasis.

### **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, 19. 4. 2017

.....  
Linda Jandová

## **Poděkování:**

Tímto způsobem bych ráda poděkovala svému školiteli, RNDr. Janu Ženkovi, CSc., za veškeré odborné vedení, příjemné pracovní prostředí, rady, ochotu kdykoli pomoci a trpělivost s jakou vedl mou bakalářskou práci. Děkuji rovněž kolegyni Bc. Pavle Nedbalové, že mi byla kdykoli ochotná podat pomocnou ruku. V neposlední řadě patří mé poděkování i mé rodině za jejich neutuchající podporu.

## **OBSAH:**

|           |   |    |
|-----------|---|----|
| <b>1</b>  | <b>Úvod</b> .....   | 1  |
| <b>2</b>  | <b>Teoretická část</b> .....                                      | 2  |
| 2.1       | Nádorové bujení.....  | 2  |
| 2.1.1     | Příčiny vzniku nádorů.....  | 2  |
| 2.1.2     | Vznik nádorů .....  | 3  |
| 2.1.2.1   | Tumor supresorové geny.....                                       | 4  |
| 2.1.3     | Vlastnosti a dělení nádorů .....                                  | 5  |
| 2.1.4     | Tvorba sekundárních nádorů – metastáz .....                       | 7  |
| 2.1.5     | Melanom.....  | 9  |
| 2.1.5.1   | Myší melanom B16 – F10.....                                       | 10 |
| 2.1.6     | Pankreatický adenokarcinom.....                                   | 10 |
| 2.1.6.1   | Myší Panc02.....  | 13 |
| 2.2       | Imunitní systém.....  | 13 |
| 2.2.1     | Nespecifická imunita .....  | 13 |
| 2.2.1.1   | Toll-like receptory (TLRs).....                                   | 14 |
| 2.2.2     | Specifická imunita .....  | 16 |
| 2.2.3     | Imunitní systém a nádorové bujení.....                            | 17 |
| 2.2.3.1   | Tumorové antigeny .....   | 17 |
| 2.2.3.2   | Cytokiny a nádory.....  | 18 |
| 2.2.3.3   | Imunitní odpověď na nádorové bujení.....                          | 18 |
| 2.2.3.4   | Mechanismy úniku.....   | 20 |
| 2.3       | Diagnostika a léčba rakoviny.....                                 | 21 |
| 2.3.1     | Stanovení diagnózy.....   | 21 |
| 2.3.2     | Možnosti léčby .....  | 22 |
| 2.3.2.1   | Imunoterapie .....  | 24 |
| 2.3.2.1.1 | Nádorová imunoterapie pomocí vybraných imunomodulačních látek ... | 25 |
| <b>3</b>  | <b>Cíle práce</b> .....   | 28 |
| <b>4</b>  | <b>Materiál</b> .....   | 29 |
| 4.1       | Chemikálie .....  | 29 |
| 4.2       | Laboratorní zvířata.....  | 29 |
| 4.3       | Nádorové buněčné linie .....                                      | 29 |
| 4.4       | Linie makrofágů.....  | 30 |

|          |  |    |
|----------|--|----|
| <b>5</b> | <b>Metody</b> .....  | 31 |
| 5.1      | Příprava melanomových buněk B16-F10 .....  | 31 |
| 5.2      | Příprava nádorových buněk Panc02.....  | 31 |
| 5.3      | Příprava PMJ2R.....  | 31 |
| 5.4      | Příprava manan-BAM.....  | 32 |
| 5.5      | Příprava Resiquimodu.HCl.....  | 32 |
| 5.6      | Transplantace melanomových buněk B16-F10 .....   | 32 |
| 5.7      | Transplantace pankreatických buněk Panc02 .....  | 32 |
| 5.8      | Měření velikosti nádoru .....  | 33 |
| 5.9      | Výpočet výskytu metastáz .....   | 33 |
| 5.10     | Statistické vyhodnocení .....  | 33 |
| 5.11     | Pokus č. 1: Srovnání nádorové imunoterapie založená na synergii TLR agonistů se stimulací fagocytózy s terapií kombinující TLR agonisty s kationickým antimikrobiálním peptidem..... | 33 |
| 5.12     | Pokus č. 2: Terapie pankreatického adenokarcinomu založená na synergii TLR agonistů se stimulací fagocytózy. Analýza doby přežití a výskytu metastáz. ....                           | 34 |
| 5.13     | Pokus č. 3: Cytotoxický účinek makrofágů (PMJ2R) na buňky pankreatického adenokarcinomu (Panc02). Studium různých způsobů aktivace makrofágů. ....                                   | 35 |
| <b>6</b> | <b>Experimentální výsledky</b> .....   | 37 |
| 6.1      | Pokus č. 1: Srovnání nádorové imunoterapie založená na synergii TLR agonistů se stimulací fagocytózy s terapií kombinující TLR agonisty s kationickým antimikrobiálním peptidem..... | 37 |
| 6.2      | Pokus č. 2: Terapie pankreatického adenokarcinomu založená na synergii TLR agonistů se stimulací fagocytózy. Analýza doby přežití a výskytu metastáz. ....                           | 39 |
| 6.3      | Pokus č. 3: Cytotoxický účinek makrofágů (PMJ2R) na buňky pankreatického adenokarcinomu (Panc02). Studium různých způsobů aktivace makrofágů. ....                                   | 41 |
| <b>7</b> | <b>Diskuze</b> .....   | 43 |
| <b>8</b> | <b>Závěr</b> .....   | 47 |
| <b>9</b> | <b>Seznam použité literatury</b> .....   | 48 |

# 1 Úvod

Česká republika patří k zemím s největší zátěží nádorového onemocnění. K celkové úmrtnosti populace přispívá úmrtnost na rakovinu 26,5%. Největší podíl úmrtí na rakovinu ve srovnání s jinými příčinami smrti je registrovaný ve věkové skupině 50 – 64 let. Mužská populace se s výskytem rakoviny celosvětově umístila na 7. místě a na 18. místě v úmrtnosti, ženská populace zaujímá celosvětově 15. místo ve výskytu rakoviny a 36. místo v úmrtnosti. V roce 2007 bylo 71 757 nových případů výskytu všech typů rakovin, ve stejném roce bylo zaznamenáno 27 359 úmrtí. Níže uvedené typy rakoviny jsou ty nejčastější v České republice, číselné údaje případů výskytu onemocnění jsou zaznamenány z roku 2007. U mužů: rakovina prostaty (5 094), rakovina tlustého střeva (4 638), téměř stejně častá je i rakovina plic (4 630). U žen: rakovina prsu (6 500), rakovina tlustého střeva (3 188), rakovina dělohy (1 771) a rakovina plic (1 762). Rostoucí trend výskytu rakoviny lze obecně přičíst široce známým rizikovým faktorům, jako je demografické stárnutí v České republice a životní styl. Další nárůst výskytu rakoviny lze očekávat i do budoucna vzhledem k demografické struktuře a stárnutí české populace (Dušek a kol., 2010).

Ačkoli uvádím informace z naší země, nádorové onemocnění je velice závažný problém na globální úrovni.

## 2 Teoretická část

### 2.1 Nádorové bujení

Přeměně normální buňky v buňku nádorovou se říká nádorová transformace. Podstatou transformace je přeměna neboli mutace určitých genů (protoonkogenů) v onkogeny (Fakan, 2005).

Přeměněné buňky se začínají překotně dělit a vymknou se kontrole růstu, vzniká skupina nádorových buněk, kterou organismus často nedovede eliminovat, a která přenáší získané změny do dalších buněčných generací. V nádorových buňkách tedy dojde ke změnám v genomu, a tím i k odlišné produkci proteinů (Bártová, 2007).

Autonomní povaha nádorových onemocnění zajišťuje, že nádor roste bez ohledu na svého nositele, neboť se vymyká z kontrolních mechanismů, které řídí růst normálních tkání. Nádor je prakticky ireverzibilní změna tkáně, vzniklý nádor se už nemůže přeměnit na zdravou tkáň (Mačák a Mačáková, 2004).

#### 2.1.1 Příčiny vzniku nádorů

Na vznik nádorů má vliv mnoho faktorů a řada z nich ještě ani není známá. Faktory, které se podílejí na vzniku nádorů, jsou následující. **Chemické látky** (karcinogeny) vyvolávající nádorové bujení jsou hlavně látky odvozené z dehtu, aromatické uhlovodíky, vinylchlorid (používá se k výrobě plastů), aflatoxin (mykotoxin produkovaný řadou plísní) a cigaretový kouř. Rovněž se sem řadí chronické požívání alkoholu, které zvyšuje pravděpodobnost vzniku karcinomu hltnu a jícnu, způsobuje cirhózu jater, na jejímž podkladě může vzniknout karcinom jater. Tomu se říká nepřímá indukce nádoru. **Fyzikální vlivy**, především rentgenové záření a obecně záření s krátkou vlnovou délkou, prokazatelně způsobují vznik nádorového onemocnění. Známý případ je leukémie obyvatel v Hirošimě a Nagasaki, tedy oblasti, kde po výbuchu atomových bomb působilo silné ionizující záření. Rovněž sluneční ultrafialové záření vede k zvýšenému výskytu kožních nádorů. **Viry** byly prokázány jako příčiny zhoubného bujení u zvířat, u lidí mohou vyvolat nádory v interakci s jinými faktory. Nejznámější je Epstein – Baar virus (původce infekční mononukleózy). V centrální Africe se podílí na vzniku lymfoblastického lymfomu obličejových kostí, byl rovněž prokázán u některých T – lymfomů. Papilomaviry, spolu s herpes viry, jsou příčinou karcinomu děložního čípku. Pacienti s onemocněním AIDS trpí ve zvýšené míře lymfomy, jedná se

pravděpodobně o nepřímý vliv viru HIV. **Hormony** mohou také přispět ke vzniku nádorů, například poruchy hormonální rovnováhy estrogenu u žen se dávají do souvislosti s karcinomy prsu, dělohy a vaječníků. **Dědičnost** se v dnešní době jeví jako méně významný faktor. V některých rodinách je určitá dědičná náchylnost k vzniku rakoviny. Do této kategorie se řadí i některé dědičné choroby, ze kterých se nádor může vyvinout. Příkladem toho je polypóza, tedy četné polypy tlustého střeva, které mnohdy vedou ke karcinomu. **Dietetické faktory** vykazují, že jsou rozdíly v kvalitě potravy, způsobu jejího zpracování a současně ve výskytu maligních nádorů v různých oblastech světa. V Japonsku kupříkladu převažují karcinomy žaludku a jater, v USA jsou to karcinomy tlustého střeva a prostaty. Mimo jiné to ukazuje, že dietetické faktory hrají větší roli než faktory genetické či rasové (Mačák a Mačáková, 2004).

**Věk** je další faktor. Jedním z mála jednoznačných faktů ohledně rakoviny je, že s věkem souvisí orgánově specifický výskyt nádorů. Většina výskytu nádorů v závislosti na věku může být rozdělena do tří hlavních tříd – zárodečné (neuroblastom), nádory převážně mladistvých (některé leukémie) a nádory související s vyšším věkem (karcinom prostaty, kůže a jiné) (Franks a Teich, 1997).

### **2.1.2 Vznik nádorů**

Vznik nádorů neboli kancerogeneze je více fázový proces. Působení mutačních faktorů nevede bezprostředně ke vzniku nádoru, ale vyvolává sérii změn v buňkách. Nejčastěji probíhají tyto změny na úrovni DNA. Prvotní změny v buňkách mohou přetrvávat poměrně značnou dobu skryté, mnoho pozměněných buněk dál neporoste či poroste jen velmi pomalu. Následné procesy mohou být způsobeny buď přímo karcinogeny anebo jinými faktory, které samy o sobě nevyvolávají tvorbu nádoru v tkáni, ale po působení karcinogenu pravděpodobnost vzniku nádoru zvyšují, jako jsou například růstové faktory. Tyto stimuly působí na buňky, které ale mohou být stále citlivé i na růst inhibující faktory, takže výsledek závisí na poměru těchto faktorů a na rozsahu změn v transformovaných buňkách. Celý sled událostí v nádorotvorném procesu je téměř jistě důsledkem změn genů (Franks a Teich, 1997).

Protoonkogeny jsou normální geny, které ovlivňují růst a diferenciaci buněk. Narůstající odchylky v DNA je mohou přeměnit v onkogeny, a to následně vede k nádorové transformaci buňky. To můžeme být způsobeno nejen karcinogeny, ale i virovou transdukcí, bodovou mutací, translokací či genovou amplifikací (Mačák a Mačáková, 2004).



Vzhledem k vývojové povaze rakoviny je možná překvapivé, že na vznik nádorové buňky jsou třeba tři životní etapy buňky. Míra mutací je odhadnuta na jednu za  $2 \cdot 10^7$  buněčného dělení. Vzhledem k tomu, že existuje asi  $10^{14}$  cílových buněk u průměrného dospělého člověka s nesčítelným množstvím potenciálních cílových genů zapojených do regulace expanze buněk, a že šance dalších mutací jsou značně zvýšené klonálním růstem těchto buněk nesoucích počáteční poškození, musí existovat vysoce účinné vrozené bariéry rakoviny (Khan a Pelengaris, 2006).

### **2.1.2.1 Tumor supresorové geny**

Porucha protoonkogenů je pouze první nutnou podmínkou onkogeneze, druhou je porucha v systému genů, které se označují jako tumor supresorové geny (antionkogeny). Jejich produkty jsou proteiny podílející se na kontrole buněčného růstu a diferenciaci. Ztráta jejich funkce přímo zodpovídá za změněný fenotyp nádorové buňky. Za nejvýznamnější antionkogen je považován p53. Hlavní funkcí proteinu p53 je kontrola průběhu buněčného cyklu regulací replikace a transkripce DNA. P53 se váže na specifické sekvence DNA a působí jako transaktivátor všech genů nesoucích specifické vazebné sekvence. Poškození DNA vede k akumulaci proteinu p53. Po vazbě na regulační sekvence stimuluje expresi genů, které zastavují buněčný cyklus v pozdní G<sub>1</sub> fázi nebo vyvolávají apoptózu. Defekty genu pro p53 vytvářejí nefunkční protein neschopný blokovat buněčný cyklus. Abnormální gen pro p53 byl prokázán u více než poloviny případů většiny typů rakovinného bujení (Krejsek a Kopecký, 2004).

Z Obr. 1 lze vyčíst, jakými způsoby dochází k špatné funkci p53 a k vzniku rakoviny.

| Mechanism of inactivating p53                                | Typical tumours  | Effect of inactivation  |
|--|--|---|
| Amino-acid-changing mutation in the DNA-binding domain       | Colon, breast, lung, bladder, brain, pancreas, stomach, oesophagus and many others | Prevents p53 from binding to specific DNA sequences and activating the adjacent genes                         |
| Deletion of the carboxy-terminal domain                      | Occasional tumours at many different sites   | Prevents the formation of tetramers of p53  |
| Multiplication of the MDM2 gene in the genome                | Sarcomas, brain  | Extra MDM2 stimulates the degradation of p53  |
| Viral infection  | Cervix, liver, lymphomas   | Products of viral oncogenes bind to and inactivate p53 in the cell, in some cases stimulating p53 degradation |
| Deletion of the p14 <sup>ARF</sup> gene                      | Breast, brain, lung and others, especially when p53 itself is not mutated          | Failure to inhibit MDM2 and keep p53 degradation under control  |
| Mislocalization of p53 to the cytoplasm, outside the nucleus | Breast, neuroblastomas   | Lack of p53 function (p53 functions only in the nucleus)  |

**Obr. 1:** Porucha p53 a vznik rakoviny (Vogelstein a kol., 2000)

### 2.1.3 Vlastnosti a dělení nádorů

I přes svou rozdílnost sdílejí nádory několik základních vlastností. Různé typy rakoviny projevují tyto vlastnosti v různé míře. Mimo to mohou být tyto vlastnosti získány postupně a projevují se v různých fázích během postupu rakoviny. Kombinace nekontrolovatelné proliferace buněk, změn diferenciací, metabolismu a invazivity je jedinečná a definuje zhoubné bujení (Schulz, 2005).

S biologickými vlastnostmi souvisí základní rozdělení nádorů – nezahubné (benigní) a zahubné (maligní) (Mačák a Mačáková, 2004)

**Benigní nádory** se obvykle podobají tkáni, ze které vznikají, ale nemusí v tom být zapojené všechny části tkáně a buňky mohou nebo nemusí být v normálním stavu. Benigní nádory vznikají ve většině tkání, zvětšují jejich velikost, ale nejsou invazivní. Obvykle jsou odděleny od zdravých buněk obalem pojivové tkáně. Nezahubné nádory sice neinvadují do okolní tkáně, ale pokračováním růstu mohou poškodit zdravé buňky a způsobit ztrátu jejich normální funkce nebo tlačít na nervovou tkáň. Ačkoli jsou tedy tyto nádory samy o sobě nezahubné, mohou způsobit značné poruchy (Franks a Teich, 1997). Jelikož jsou benigní

nádory dobře ohraničené, dají se obvykle poměrně snadno odstranit. Důležité je, že neovlivňují celkový stav pacienta (Bártová, 2007).

**Maligní nádory** vykazují dva charakteristické znaky - buněčnou abnormalitu (dyskarióza) a metastázování do okolní tkáně. Standartní buněčná kritéria zahrnují lokální zvýšení počtu buněk (s tím souvisí zvýšení mitotické aktivity), ztrátu normálního regulačního uspořádání buněk. Jednoznačný důkaz zhoubného bujení je invaze do okolních tkání. Ve většině případů je to snadno rozpoznatelné poté, co nádorové buňky zničí a nahradí normální tkáň. Nádorové buňky mohou vtrhnout do krevního řečiště nebo lymfatických cév, krví či lymfou jsou nesený do vzdálených částí těla, kde zakládají sekundární nádory (metastázy). Tento typ šíření je typický pro maligní nádory. Jedná se o největší problém během léčby, i když primární nádor, který zůstává v původním místě vzniku, může být obvykle chirurgicky odstraněn nebo zničen radiační terapií. Zhoubné nádory nemají jasně definovaný obal a nádorové buňky rostou v mnohem více neorganizované formě, než bývá u nezhooubných nádorů. Uvedená kritéria platí stejně pro všechny maligní nádory bez ohledu na jejich tkáňový původ (Franks a Teich, 1997).

K hodnocení nádorů je důležitá jejich typizace, to znamená podle histologické struktury, stupeň jejich diferenciacce a stupeň pokročilosti. K určení stupně pokročilosti se používá číselné vyjádření TNM systému, kde T znamená tumor, N znamená nodus lymphaticus, tedy postižení regionálních uzlin metastázemi, M znamená metastázy. Čím víc je nádor dediferencovanější a nezralejší, tím je i malignější (Bártová, 2007).

Z histologického hlediska se nádory rozdělují podle původu vzniku. Mnohdy je však obtížné stanovit tkáň nebo buňky, z kterých nádory vycházejí (Mačák a Mačáková, 2004).

Podle původu vzniku se základní skupiny nádorů rozdělují na mezenchymové, epitelové, z nervové tkáně a ostatní. Mezenchymové nádory vycházejí z pojivové tkáně, tukové tkáně, svaloviny, cév, krevetvorných tkání. Patří sem benigní fibrom, lipom, chondrom, osteom, leiomyom, rhabdomyom a angiom, maligní forma se nazývá sarkom. Epitelové nádory mají dva benigní typy, a to papilom (z povrchového epitelu) a adenom (ze žlázoového epitelu). Karcinomy jsou maligní epitelové nádory, metastazují hlavně lymfatickou cestou a sekundární ložiska nejdříve zakládají v regionálních mízních uzlinách. Rovněž zde jsou rozpoznávány dva typy, z povrchového epitelu dlaždicový karcinom a ze žlázoového epitelu adenokarcinom. Nádory z nervové tkáně vycházejí jednak z gangliových buněk (maligní neuroblastom a neurilemom) a jednak z podpůrných buněk (benigní gliomy, maligní glioblastomy). Do nádorů z nervové tkáně se rovněž řadí benigní pigmentové névy a maligní melanom. Ostatní nádory zahrnují teratomy, což jsou nádory vycházející ze všech tří

zárodečných listů, a proto obsahují tkáň jak mezenchymové, tak epitelové a nervové. Choriokarcinom je maligní nádor vyskytující se u těhotných žen a charakteristický tím, že vychází z tkáňe plodu, konkrétně placenty (Bártová, 2007).

#### **2.1.4 Tvorba sekundárních nádorů – metastáz**

Primární nádory jsou zodpovědné pouze za asi 10% úmrtí. Zbývajících přibližně 90% úmrtí připadá na nádorová ložiska vzniklá daleko od místa původního nádoru, tedy metastázy (Weinberg, 2014).

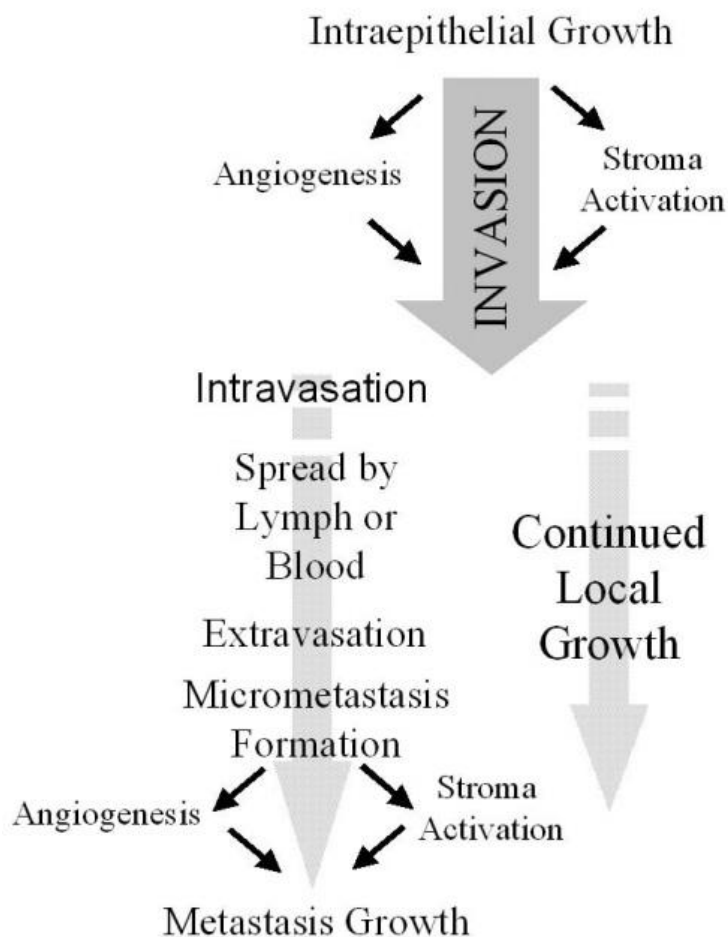
Tvorba metastáz je aktivní vícestupňový proces. Záleží na interakci hostitele s nádorem, založené na rovnováze exprese genů, které aktivují a inhibují invazivnost nádorových buněk. Aby se nádorová buňka stala buňkou schopnou tvořit metastázy, musí se odpojit od původního místa vzniku, získat schopnost penetrovat do krevního či lymfatického řečiště, migrovat do vzdálených míst a založit další kolonii nádorových buněk, mít schopnost na novém místě vyvolat angiogenezi, což je tvorba krevních kapilár, která zaručí výživu těchto buněk. Pro každý z uvedených kroků je nutná změna ve funkci kontrolních genů, které v normálních buňkách zaručují, že zůstávají na patřičném místě. Pouze jedna nádorová buňka má malou šanci obsadit vzdálené orgány, ale shluky nádorových buněk a interakce s krevními buňkami, které obalí ty nádorové, vytváří větší útvar, a ten se spíše dostane do vzdálených míst a vytváří druhotná ložiska. Metastázy mohou pocházet z jedné buňky, mohou být také zdrojem dalších metastáz a mohou i vzniknout několik let po odstranění primárního nádoru. Ovšem ne všechny buňky v nádoru jsou schopné získat vlastnosti nezbytné pro metastázy, jejichž vlastní buňky jsou opět heterogenní a pouze část z nich má invazivní schopnost (Altaner, 2008).

Zatímco nádor roste a prorůstá epitelem, nádorové buňky jsou postupně k sobě a k sousedním zdravým epitelovým buňkám méně přilnavé. Podkladové stroma se aktivuje a může dojít k zánětu. Bazální membrána, která odděluje epitel od mezenchymální pojivové tkáňe, je částečně nebo úplně zničena. Nádor pokračuje v růstu do pojivové tkáňe. Jednotlivé buňky nebo malé skupiny se oddělí a migrují do tkáňe. Invaze nádorovými buňkami do stromatu je doprovázena změněnou genovou aktivitou v buňkách stromatu, přičemž některé změny podporují a jiné inhibují invazi. Typ stromální reakce může být jeden z nejdůležitějších faktorů, které určují schopnost nádoru metastazovat. Kritický krok v invazi nastává, když rostoucí nebo migrující nádorová buňka pronikne do krevního nebo lymfatického řečiště. Jako v předchozích případech k tomu může dojít prorůstáním nádoru

skrz cévu nebo vtlačení jednotlivé nádorové buňky do cévy. Nádorové buňky, které pronikly do cév, se mohou teoreticky rozšířit do jakékoli části těla. Když nádorové buňky vstoupí do lymfatických cév, jsou přepravovány do lymfatických uzlin, kde nakonec proniknou hlavní lymfatickou cévou a nakonec vstoupí do krve touto cestou. Nicméně jsou větší než normální krevní buňky a nejsou dobře upravené pro přežití v krvi. Přežití v krvi až dosáhnutí vzdálené tkáně může být limitující faktor pro metastázy. Pro vytvoření metastáz musí nádorové buňky vystoupit z cévního oběhu. Nejčastěji se to uskuteční v orgánech s mikrokapilárním systémem, jako jsou játra, plíce, ledviny a kosti. Vzhledem ke své velikosti uvíznou nádorové buňky v kapilárách. To není dostačující, ale stačí to na vznik mikrometastáz. V novém prostředí se nádorové buňky musí znovu připojit k tkáni, přežít a následně se rozrůstat v mikrometastázi, což může být po mnoho let nečinná fáze. Toto je považováno jako nejméně efektivní krok během celého procesu. Posledním krokem vzniku metastáz je nárůst mikrometastáz v aktivně rostoucí nádory. To vyžaduje vytvoření dostatečného přísunu živin, což zajišťuje proces angiogeneze (Schulz, 2005).

Různé druhy nádorů zakládají metastázy v různých orgánech. Místo vzniku metastáz je určeno kombinací dvou faktorů, a to lokalizací nádoru a vlastností jeho buněk. Umístění primárního nádoru a nejbližší orgán, do kterého krevní cestou migrují nádorové buňky, je obvykle nejpravděpodobnějším místem vzniku sekundárních nádorů. Příkladem může být uvedeno, že nádory hlavy a krku metastazují preferenčně do plic, nejbližší mízní uzliny jsou zase nejčastějším místem metastáz nádorů prsu, odtud se zároveň mohou šířit do dalších orgánů. Jako druhý faktor uváděná specifická buněk určuje selektivní růst na vybraném místě. Receptory nádorových buněk určují místo zakládání druhotných ložisek. O místě spolurozhodují vhodné vlastnosti daného prostředí, dostupnost specifických růstových faktorů pro danou buňku a vhodnost extracelulární matrix (Altaner, 2008).

Nádorová invaze a vznik metastáz je znázorněn na **Obr. 2**.



**Obr. 2:** Invaze a růst metastáz (Schulz, 2005)

### 2.1.5 Melanom

Melanom je maligní nádor melanoblastů, což jsou nezralé melanocyty. Patří mezi neuroektodermové nádory (Mačák a Mačáková, 2004).

Během vývoje prekursorů melanocytů migrují z neurální lišty do bazální vrstvy pokožky. Melanocyty syntetizují z tyrosinu pigment melanin. Enzymy biosyntézy melaninu, jako jsou tyrozinázy, jsou exprimovány pouze v těchto buňkách. Nerozpustný pigment je přenášen do obklopujících epidermálních keratinocytů, kde je uložen. Diferenciace keratinocytů transportuje melanin do horních vrstev kůže, kde absorbuje viditelné a UV záření a chrání kožní buňky (Schulz, 2005).

Velká většina melanomů vzniká právě v souvislosti se slunečním zářením. Nádory se tak často nacházejí na hlavě, krku a končetinách, jsou známy rovněž lokalizace pod nehty.

Některé névy bývají rizikovým faktorem pro zvrát v maligní bujení, melanomy ale mohou vznikat i „de novo“, to znamená na kůži bez névu. Kvůli pigmentu melaninu bývají nádory i metastázy černé barvy, vyskytují se ovšem i amelanotické melanomy, ty tvoří je málo pigmentu nebo vůbec žádný (Mačák a Mačáková, 2004).

Většinou se tedy u melanomů jedná o kožní léze, ale v menší míře se melanom může vyskytnout také v oku, krční sliznici, oblasti konečníku a ženských genitálií. Melanom může metastazovat do jakéhokoli orgánu, lymfatických uzlin i kostí (Khan a Pelengaris, 2006).

### **2.1.5.1 Myší melanom B16 – F10**

Myší modely melanomu mají počátky v 90. letech, kdy melanomové nádory spontánně vznikaly v inbredních myších kmenech. Tyto spontánní melanomy, z nichž nejznámější je patrně B16, byly transplantovány do kongenních myší, rovněž mohly být kultivovány a zkoumány in vitro. Právě tento užitek udělal z těchto modelů hlavní prostředek zkoumání biologie melanomu (Damsky a Bosenberg, 2010).

Jak již bylo zmíněno, nejznámější a také široce používaný je spontánní melanom B16 odvozený od C57BL/6 myší. Tento model je charakteristický podkožním růstem a metastazováním do plic. Aplikace nádorových buněk se provádí subkutánně či intravenózně (do ocasní žíly). Varianta B16-F10 je velmi agresivní a metastazuje z primárního podkožního ložiska do plic stejně dobře, jako po intravenózní aplikaci. Vyznačuje se rovněž nízkou expresí MHC I molekul, jeví se to jako znak normálních C57BL/6 melanocytů, který je zachován i po transformaci na melanom. Jedná se o nízko imunogenní nádor, je také relativně odolný vůči léčbě s vysokými dávkami IL – 2. Důvod této nízké imunogenicity je stále neznámý, ačkoli nízká exprese MHC I nabízí jeden typ vysvětlení (Overwijk a Restifo, 2001).

### **2.1.6 Pankreatický adenokarcinom**

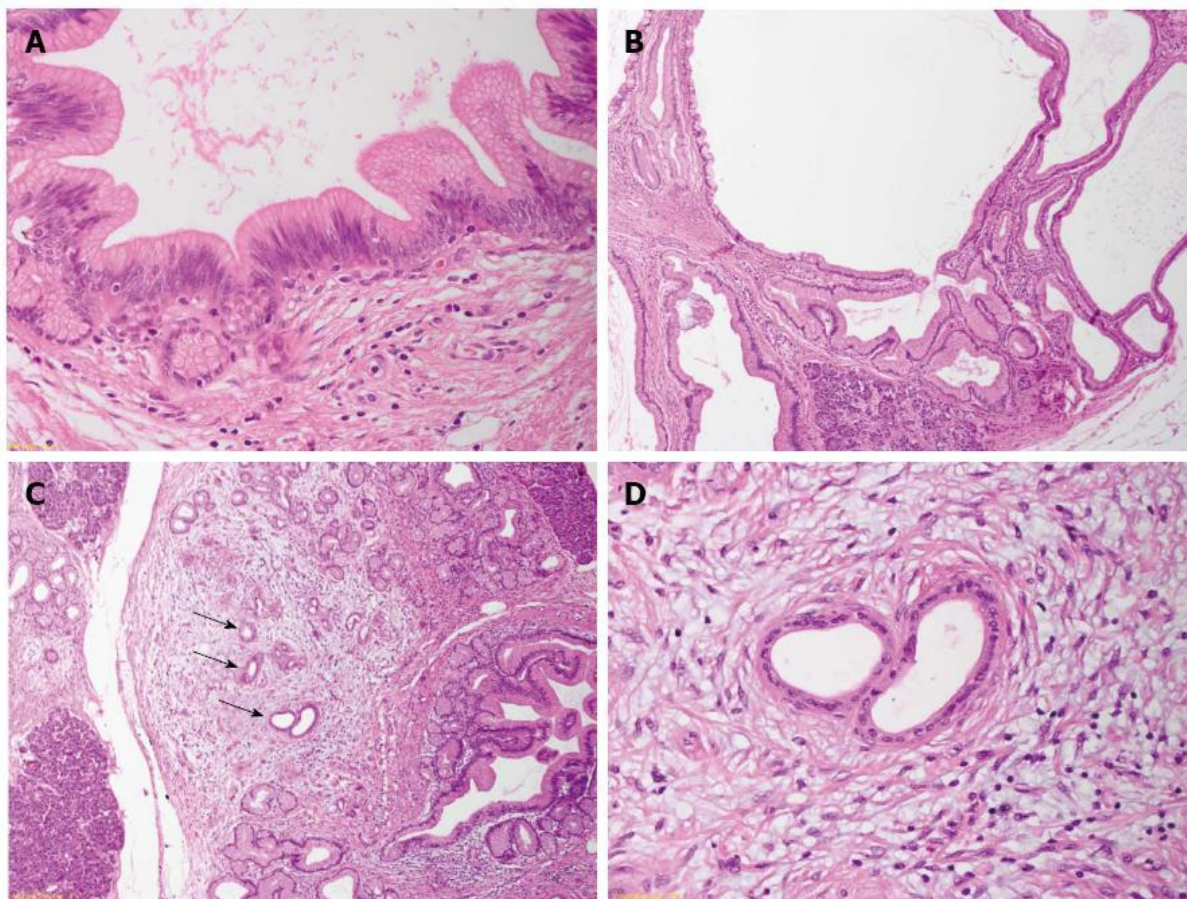
Jedná se o velmi agresivní formu rakoviny s velmi špatnou prognózou. Celkové pětileté přežití je 6%. Medián přežití se pohybuje v rozmezí téměř dvou let u pacientů s lokálním a odstranitelným nádorem, u pacientů s pokročilejší metastazující chorobou je to už pouze několik měsíců. Naneštěstí je drtivá většina pacientů v pokročilejším stádiu neoperovatelná, pouze zhruba 20% z nich má onemocnění lokalizované tak, že je přístupné chirurgickému zásahu (Brosens a kol., 2015).

Většina nádorů vzniká v hlavě slinivky. Charakteristickým znakem karcinomu je tvorba hustého stromatu označovaného jako desmoplastická reakce. Pankreatické hvězdicovité buňky (myofibroblasty) hrají v tomto procesu rozhodující roli. Při aktivaci růstovými faktory, jako je TGF- $\beta$ 1 a od destiček odvozený růstový faktor PDGF a fibroblastový růstový faktor, mohou způsobit léze čili prekuzory rakoviny (Hidalgo, 2010).

Invazivní forma rakoviny se vyvíjí z dobře ohraničených neinvazivních prekuzorových lézí. Nejčastějším prekuzorem rakoviny je mikroskopická pankreatická intraepiteliální neoplazie (PANIN). Kromě toho existují jako prekuzory ještě dvě makroskopicky rozeznatelné cystické léze – intraduktální papilární mucinózní nádor (IPMN) a mucinózní cystické novotvary (MCN). Uvedené prekuzorové léze poskytují příležitost pro včasnou detekci a léčbu (Brosens a kol., 2015).



Na **Obr. 3** jsou histologické řezy lézí pankreatického adenokarcinomu.



**Obr. 3:** Prekurzorové léze pankreatického adenokarcinomu (*A – nízký stupeň pankreatické intraepiteliální neoplazie, B – intraduktuální papilární mucinózní nádor, C – duktální metaplázie v oblasti lalůčkové atrofie, šipky označují atypické léze, D – léze s atypickými buňkami a typickou reakcí stromatu*) (Esposito a kol., 2014)

Rakovina slinivky břišní je výsledkem úspěšného nahromadění mutací několika genů a je složena z několika různých elementů, včetně pankreatických rakovinných buněk, kmenových buněk a nádorového stroma. Nedávné analýzy naznačují, že zralá rakovinná buňka slinivky nese v průměru 64 genetických změn na rakovinu, tyto změny mohou být seskupeny do 12 základních signálních drah. To naznačuje genetickou složitost a různorodost této rakoviny, takže účinná léčba se bude muset zaměřit na několik cílů (s kombinovanými režimy) a může vyžadovat individuální terapii (Hidalgo, 2010). Karcinom slinivky se vyznačuje mnoha chromozomovými abnormalitami, řadou ztrát a zvýšeným počtem segmentů DNA a mnoha mutacemi genů. Geny, které nejčastěji a opakovaně mutují

(KRAS, GNAS, p53, CDKN2A/P16, SMAD4, ATM, BRCA2 a RNF43), jsou zároveň nejčastějším terapeutickým cílem (Brosens a kol., 2015).

### **2.1.6.1 Myší Panc02**

Jako model pro pankreatický adenokarcinom je dostupných jen málo buněčných linií. Buňky Panc02, odvozené od C57BL/6 myši, na které se použil 3-metyl-cholantren, byly popsány už před třiceti lety. Navzdory svému širokému využití při vyhodnocování různých strategických terapií, Panc02 buňky nemají silný klinický význam pro karcinom slinivky kvůli absenci mutačních změn ve srovnání s lidskou formou choroby. V důsledku toho je úspěch při léčbě na tomto modelu omezený (Torres a kol., 2013).

V poslední době se na potřebu dalších linií nádorových buněk reagovalo tím, že se vytvořily nádorové buňky izolované z geneticky modifikovaných myši C57BL/6 nebo smíšených B6/129. Nicméně buňky odvozené ze smíšeného genetického pozadí vyžadují vyhodnocení histokompatibility přijímajících myši. Buněčná linie 6606PDA je syngenní k myšim kmeni C57BL/6J, byla prvně popsána v roce 2011. Tato linie vytváří více diferencovaný žlázo- adenokarcinom než buňky Panc02, po vnesení do hlavy slinivky (Zechner a kol., 2015).

## **2.2 Imunitní systém**

Imunitní systém je součástí soustavy regulačních mechanismů mnohobuněčných živočichů. K těmto mechanismům patří i nervový a endokrinní systém. Regulační mechanismy jsou spolu úzce funkčně spjaty, vzájemně spolu komunikují a spolupracují. Úlohou imunitního systému je rozpoznání a eliminace všeho cizorodého, výsledkem je udržení integrity a identity organismu. Imunitu můžeme rozdělit na nespecifickou a specifickou. (Litzman a kol., 2001).

### **2.2.1 Nespecifická imunita**

Nespecifická imunita je vývojově starší typ imunity. Předpokladem pro vývoj vrozené imunity byla schopnost rozlišit mezi vlastními strukturami a mezi strukturami mikroorganismů. Buňky nespecifické imunity jsou pro to vybaveny skupinou specifických

receptorů, které jsou na rozdíl od receptorů specifické imunity zakódovány v zárodečné DNA. Základní strategií vrozené imunity není identifikovat každou cizí strukturu, její buněčné receptory se soustředí na několik vysoce konzervovaných struktur, které jsou přítomny na rozsáhlých skupinách mikroorganismů. Tyto struktury se označují jako s patogenem asociované molekulové vzory (PAMPs). Identifikace PAMPs zajistí prakticky okamžitou imunitní reakci, oproti specifické imunitě nemusí efektorovým funkcím předcházet buněčná proliferace. Receptory nespecifické imunity jsou exprimovány na řadě efektorových buněk, především na makrofázích a dendritických buňkách, mohou se však vyskytovat i na B lymfocytech. Buňky přirozené imunity jsou schopny rozpoznávat i molekulové vzory endogenního původu vznikající v těle (Krejsek a Kopecký, 2004).

Buněčné elementy vrozené imunity schopné fagocytózy, tedy pohlcení cizorodých částic, můžeme rozdělit na dvě skupiny. Do první skupiny patří buňky, jejichž hlavním úkolem je pohltit cizorodé struktury, zpracovat je a prezentovat T lymfocytům specifické imunity. Tyto buňky se nazývají antigen prezentující buňky a řadí se sem především dendritické buňky a makrofágy. Druhá skupina zahrnuje hlavně efektorové buňky, nejdůležitější jsou neutrofilní granulocyty, v obraně proti parazitům zase eosinofilní granulocyty. Zatímco antigen prezentující buňky jsou dlouho žijící, efektorové buňky mají krátkou dobu života a musí tak být neustále doplňovány diferenciací prekurzorů v krvetvorných orgánech. K dalším buněčným elementům nespecifické imunity patří žírné buňky, nacházejí se především v kompartmentech, kde je velká pravděpodobnost průniku patogenů, jako v kůži, sliznicích a podél cévního řečiště. Žírné buňky jsou typické svými granulemi, ve kterých se nachází biologicky aktivní látky. V případě průniku patogenu do těla dochází k degranulaci těchto buněk a vytváří se podmínky nutné pro rozvoj obranné zánětové reakce. Další buněčnou populací jsou přirození zabíječi neboli NK buňky, jejichž hlavní fyziologickou úlohou je cytotoxická aktivita vůči virem infikovaným buňkám a nádorovým buňkám. Do vrozené imunity jsou také zařazeny humorální složky, jmenovitě komplementový systém a interferonový systém (Krejsek a Kopecký, 2004).

### **2.2.1.1 Toll-like receptory (TLRs)**

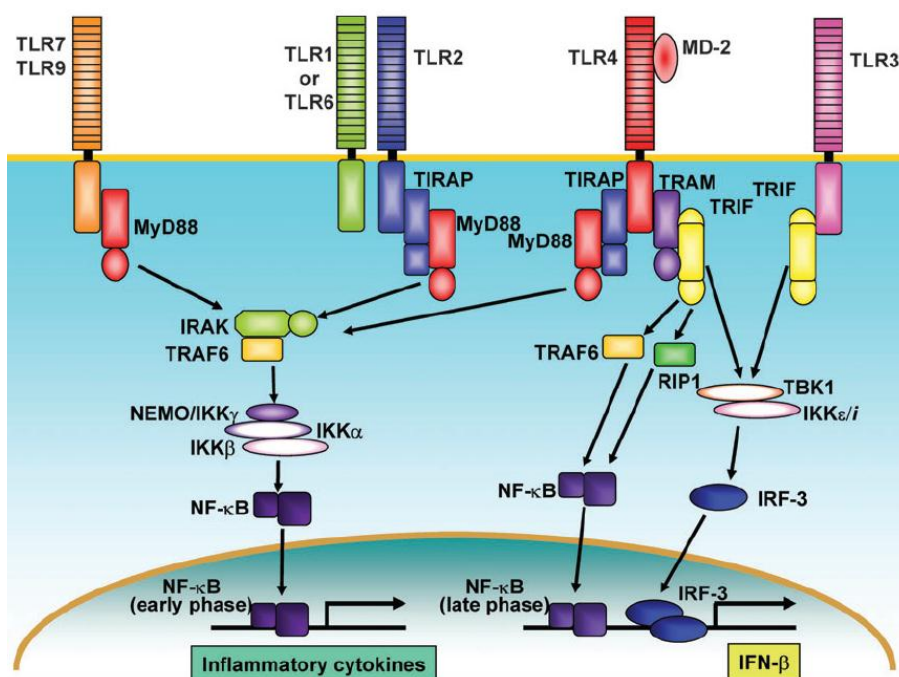
Toll-like receptory patří mezi takzvané pattern recognition receptors (PRRs), tedy receptory rozeznávající s patogenem asociované molekulové vzory, čili výše zmíněné PAMPs, ke kterým se řadí lipopolysacharidy, peptidoglukany, manan, ale i nukleové kyseliny a další. Je

klasifikováno 10 typů lidských TLRs a 13 typů myších TLRs, přičemž TLRs 1 – 9 jsou společné jak pro myši, tak pro lidi (Thompson a kol., 2011).

Toll-like receptory jsou lokalizovány na povrchu buněk vrozeného imunitního systému nebo v intracelulárních kompartmentech, jako jsou endozomy. Ty receptory, které se nacházejí na plasmatické membráně, jsou obvykle specifické pro rozpoznávání hydrofobních lipidů a proteinů, zatímco receptory v endozomech detekují nukleové kyseliny (Thompson a kol., 2011; Takeda a Akira, 2005).

TLRs rozpoznávání vede k expresi genů, jako jsou prozánětlivé cytokiny a kostimulační faktory. Toho je dosaženo aktivováním cytoplazmatické signální dráhy prostřednictvím struktury Toll-like receptorů. Všechny Toll-like receptory sdílejí společnou strukturu skládající se z extracelulárních repetitivních bohatých na leucin a cytoplazmatický Toll/IL-1 receptor (TIR). Jsou dvě základní dráhy aktivace TLRs. Toll-like receptory mohou využívat aktivaci prostřednictvím adaptorového myeloidního diferenciačního 88 (MyD 88) genu primární odpovědi nebo aktivaci přes TRIF (TIR doména obsahující adaptér vyvolávající tvorbu IFN $\beta$ ). Jak již bylo zmíněno, aktivace signálních drah vede k tvorbě prozánětlivých cytokinů. Podstatným krokem je fagocytóza, která spouští degradaci patogenů a následnou prezentaci antigenního peptidu (Thompson a kol., 2011; Takeda a Akira, 2005).

Na **Obr. 4** jsou zobrazeny TLRs signální dráhy.



**Obr. 4:** TLRs signální dráhy (Takeda a Akira, 2005)

## 2.2.2 Specifická imunita

Specifická nebo také získaná imunita vyžaduje nezbytnou kooperaci s vrozenou imunitou. Získaná imunita se vyskytuje pouze u obratlovců, poprvé se objevila v nejjednodušší podobě u chrupavčitých ryb (Krejsek a Kopecký, 2004).

Specifická imunita je charakterizována přesným určením obrovské diverzity cizorodých antigenů (látky schopné vyvolat vznik a rozvoj specifické imunity) a imunologickou pamětí, což je schopnost mnohem rychlejší a účinnější imunitní reakce po opakovaném setkání s antigenem. Nevýhodou specifické imunity je její pomalost, primární odpověď se rozvíjí během několika dnů. Buňkami specifické imunity jsou T a B lymfocyty. Pro oba typy buněk je charakteristické, že mají na svém povrchu receptor rozpoznávající určitý antigen. Přitom platí, že jedna konkrétní buňka je naprogramována pouze na reakci s jedním antigenem. Fakt, že imunitní systém je schopen reagovat na celé spektrum antigenů (více než desítek milionů), je dána tím, že se jednotlivé lymfocyty liší povrchovým receptorem pro antigeny. Při setkání lymfocytu s antigenem, k němuž má receptor, dochází

k aktivaci buňky. Nestačí však pouhá vazba s antigenem, je nutný další stimulační signál, který například zajišťují antigen prezentující buňky. Aktivace se projeví buněčnou proliferací, vznikají klony buněk zaměřených proti antigenu, který se setkal s původním lymfocytem. Část pomnožených buněk se mění ve svá konečná vývojová stádia s omezenou životností, v případě B lymfocytů se vyvíjejí plazmatické buňky produkující protilátky a T lymfocyty se diferencují na pomocné T lymfocyty (Th) nebo cytotoxické T lymfocyty (Tc), druhá část buněk přežívá v organismu jako paměťové buňky, které při opakovaném setkání se svým antigenem zodpovídají za rychlou sekundární imunitní reakci (Litzman a kol., 2001).

### **2.2.3 Imunitní systém a nádorové bujení**

Imunitní reakce na nádorové buňky je poslední obrana organismu proti nádorovému bujení. Epidemiologické údaje vykazují, že značná část úmrtí lidské populace připadá na zhoubné novotvary, není to ale způsobeno nedostatečností protinádorové imunity. Akumulace genetických poruch v genomu buňky, což je podkladem pro rakovinné bujení, je největší u stárnoucího organismu, kterému se zároveň snižuje funkce imunitního systému (Krejsek a Kopecký 2004).

#### **2.2.3.1 Tumorové antigeny**

Nádorové antigeny jsou peptidové molekuly prezentované T lymfocytům MHC molekulami. Tyto peptidy se mohou stát cíli tumor specifických T buněk, protože nejsou exprimované na povrchu normálních buněk. Celkem se rozlišuje šest tříd nádorových antigenů. Do první skupiny patří výhradně nádorově specifické antigeny. Tyto antigeny jsou výsledkem bodových mutací nebo přeskupení genů. Může to vyvolat T buněčnou odpověď buď vznikem nové vazby peptidu s MHC I molekulami nebo vytvořením nového epitopu pro T buňky modifikací peptidu, který už váže MHC I molekuly. Druhá třída se sestává z proteinů kódovaných geny, které jsou normálně pouze v mužských zárodečných buňkách, které neexprimují MHC molekuly, a tudíž nemohou prezentovat peptidy těchto molekul T lymfocytům. Nádorové buňky ale vykazují rozšířené abnormality genové exprese zahrnující aktivaci těchto genů, a tím pádem prezentaci jejich proteinů T buňkám, tudíž jsou tyto proteiny vysoce nádorově specifické. Třetí kategorie tumorových antigenů zahrnuje diferenciované antigeny kódované geny exprimovanými pouze v určitých typech tkání.

Nejlepším příkladem jsou buňky melanomu, jejichž antigeny jsou proteiny zahrnuté v tvorbě černého pigmentu melaninu. Do čtvrté skupiny se řadí antigeny, které jsou exprimovány daleko víc v nádorových buňkách než v jejich zdravých protějšcích. Příkladem může být HER – 2/neu, což je receptor tyrosine kinázy homologní receptoru pro epidermální růstový faktor. Nádory s těmito antigeny jsou silně napadány cytotoxickými T lymfocyty, ale nejsou schopny tyto tumory zničit. Pátá kategorie nádorových antigenů exprimují molekuly, které vykazují abnormální posttranslační modifikace. Šestá třída jsou proteiny kódované virovými onkogeny. Tyto proteiny mohou mít kritickou roli v onkogenezi (Janeway a kol., 2005).

### **2.2.3.2 Cytokiny a nádory**

Cytokiny jsou produkovány buňkami imunitního systému a představují důležitou složkou buněčné komunikace mnohobuněčných organismů. Společně s hormony a neurotransmitery koordinují interakce mezi buňkami, zejména v krátkém rozsahu. Cytokiny mají hlavní roli v přípravě imunitní odpovědi, kde fungují jako složitá, překrývající se, ale přísně regulovaná síť. Termín cytokiny zahrnuje víc než sto krátkodobě působících, přechodně produkováných polypeptidů, jako jsou interleukiny (ILs), interferony (IFNs), tumor necrosis faktory (TNFs), kolonie stimulující faktory (CSFs), růstové faktory, chemokiny a další (Franks a Teich, 1997).

Cytokiny v mnoha ohledech ovlivňují nádorové buňky, včetně jejich proliferace, životnosti, exprese povrchových antigenů a mezibuněčné interakce. Navíc v souvislosti s nádory ovlivňují lokální rovnováhu živin, systémový metabolismus a imunitní stav organismu. K porušení rovnováhy cytokinů dochází zejména u nádorů, které mají poškozené ligandy nebo receptory cytokinů. Kromě toho bylo mnoho složek cytokinových drah identifikováno jako protoonkogeny nebo tumor supresorové geny (Franks a Teich, 1997).

### **2.2.3.3 Imunitní odpověď na nádorové bujení**

Účinnou složkou v protinádorové imunitě není pouze specifická imunita, neboť rozhodující pro její rozvoj je vrozená imunita. Nádorové buňky vytvářejí v těle oblasti s nefyziologickým mikroprostředím, které je například charakterizováno hypoxií, což spolu s dalšími faktory vede k nekrotickým procesům. Dochází tak k zánětlivé reakci a k aktivaci buněk nespecifické imunity, hlavně dendritických buněk a makrofágů, které zpracovávají nádorové antigeny a prezentují je v kontextu I. nebo II. třídy MHC molekul T lymfocytům.

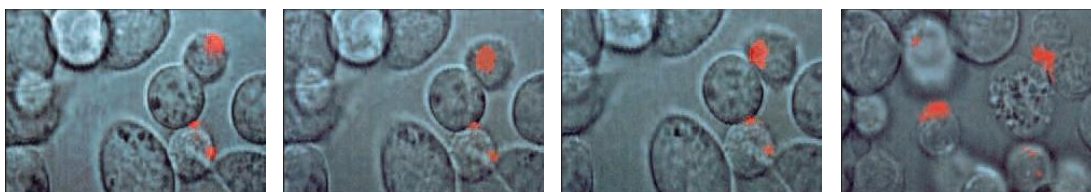


Antigenní fragmenty vázané na molekuly MHC poskytují T lymfocytům první aktivační signál, který musí být nezbytně doplněn o druhý kostimulační signál, ten je zajištěn interakcí mezi antigen prezentující buňkou a T lymfocytem (interakce kostimulačních molekul s CD28 receptorem). Na vývoj imunitní odpovědi pak má vliv i optimální interakcí mezi antigenem a T lymfocytem v optimálním cytokinovém prostředí. Pouze pak se mohou T lymfocyty aktivovat a klonálně expandovat (Krejsek a Kopecký, 2004).

Rozhodující součástí protinádorové imunity jsou NK buňky. Jsou schopné identifikovat nádorové buňky pomocí molekulově velmi rozmanitých membránových receptorů, které poskytují cytotoxické buňce aktivační nebo naopak inhibiční signály. Podle příslušného vyhodnocení buď dojde k spuštění lytických mechanismů vedoucích k usmrcení nádorové buňky, nebo nádorová buňka unikne. Nejvýznamnějším kritériem při vyhodnocování je absence molekul MHC I. třídy, která je běžná pro nádorové buňky a vede k spuštění cytotoxické aktivity NK buněk (Krejsek a Kopecký, 2004).

Významnou součástí imunitní reakce na nádor je také interferonový systém. Interferony jsou důležitou součástí především nespecifické imunity. Nádorové buňky a jejich produkty stimulují buňky imunitního systému, ale i další jaderné buňky k produkci interferonů. Většina jaderných buněk tvoří interferony  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\omega$ ,  $\text{IFN}\gamma$  je produkován pouze Th lymfocyty po jejich antigenní stimulaci. Prostřednictvím  $\text{IFN}\gamma$  dochází k zesílené expresi molekul MHC I. třídy na povrchu nádorových buněk, které se tak stávají citlivějším k nádorově specifickým cytotoxickým T lymfocytům. Dochází rovněž k účinnějšímu zpracování a následné prezentaci nádorových antigenů, zvyšování celkové zánětové aktivity a zvyšování aktivity makrofágů vedoucí k tvorbě prozánětlivých cytokinů. Účinkem  $\text{IFN}\gamma$  rovněž ve zvýšené míře dozrávají dendritické buňky a stávají se nejúčinnějšími antigen prezentujícími buňkami (Krejsek a Kopecký, 2004).

Na **Obr. 5** je znázorněno působení Tc lymfocytů na nádorové buňky. Tc buňky se pomocí T buněčného receptoru (označený červeně) vážou na cílové buňky. Během 40 minut se působením cytotoxických granul začínají nádorové buňky rozpadat.



**Obr. 5:** Účinek cytotoxických T lymfocytů (Weinberg, 2014)



#### 2.2.3.4 Mechanismy úniku

Ačkoli imunitní systém dokáže příslušně reagovat na nádorové buňky, četnost úmrtí v důsledku rakoviny naznačuje, že imunitní odpověď na nádor často není efektivní. Působení protinádorové imunity vyvolává selekci nádorových buněk, takže výslední mutanti jsou schopni uniknout imunitnímu systému. Jedna z těchto únikových strategií zahrnuje ztrátu nebo naopak získání proteinů nádorových buněk, které zabraňují rozpoznání a aktivaci imunitních buněk (Owen a kol., 2013).

Poruchy ve zpracování a prezentaci antigenů jsou běžné únikové mechanismy nádorů. Může to zahrnovat mutace vedoucí k sekreci TSA, poruchy přenašečů spojených se zpracováním antigenů (TAP) nebo  $\beta$  – mikroglobulinem a necitlivost k  $\text{IFN}\gamma$ . Všechny tyto typy mutací vedou k poklesu exprese molekul MHC I. třídy nádorových antigenů a k blokování rozpoznání Tc lymfocyty. NK buňky by měly rozpoznávat buňky s nedostatkem molekul MHC I, nicméně snížená exprese ligandů, které váží aktivační receptor NK buněk, také běžná mezi nádory, tak umožňuje nádorovým buňkám se vyhnout zprostředkovanému zabití NK buňkami (Owen a kol., 2013).

Expese zmutovaných nebo chybějících receptorů pro signál apoptózy vytváří u nádorů odolnost k těmto signálům programované smrti. Společně se sníženou expresí MHC I molekul to představuje lepší mutace potřebné k přežití transformovaných buněk (Owen a kol., 2013).

Nádory mají nízkou imunogenicitu a nedostatek kostimulačních molekul. Bez dostatečného počtu antigen prezentujících buněk v bezprostředním okolí nádorů a málo stimulatorů pro aktivaci těchto buněk, příslušné T buňky mohou přijmout pouze částečný aktivační signál, což vede k anergii a imunitní toleranci (Owen a kol., 2013).

## 2.3 Diagnostika a léčba rakoviny

### 2.3.1 Stanovení diagnózy

Stanovit správnou diagnostiku znamená provést řadu vyšetření.

- Včasné odhalení: Ačkoli metody zobrazování a histopatologie jsou stále sofistikovanější, jsou omezeny velikostí nádoru. Hlavním příslibem pro detekci nádorů v časných stádiích je molekulární diagnostika, která je používána i v oblasti prevence a screeningu (Schulz, 2005).
- Detekce predispozice: Molekulární diagnostika se používá rovněž k identifikaci populací s rizikem výskytu rakoviny. Definice rizika vyplývající ze zděděné mutace je pro molekulární diagnostiku unikátní (Schulz, 2005).
- Nádorové stádium, klasifikace a diferenciální diagnóza: Jedná se o testy proteinů a nukleových kyselin v tělních tekutinách a tkáňových vzorcích. Spoléhá se na zobrazovací techniky a histopatologii. Histopatologie stále více využívá molekulární markery na RNA a DNA úrovni, RNA-in-situ hybridizaci pro detekci specifických mRNA nebo fluorescence-in-situ hybridizaci pro detekci chromozomálních aberací. Jak bude probíhat další vývoj nádoru, pomáhá zjistit imunohistochemie, kdy se pomocí barvení histologických preparátů detekuje specifická látka, v praxi to znamená hlavně prokazování cytokeratinů a CD antigenů. Metoda imunohistochemie zdatelně vylepšuje diferenciální diagnózu. Pro klasifikaci nádoru se v mnoha případech používají protilátky. Mohou pomoci například při měření proliferativní frakce nádoru nebo k zjištění neporušenosti bazální membrány oddělující nádor in situ od podkladové pojivové tkáně. Tyto metody pomáhají určit, jak se zhruba nádory budou dále chovat, a tedy jaká bude prognóza pacienta, na základě čehož se pak vybírá nejvhodnější léčba (Schulz, 2005).
- Subklasifikace nádorů: V některých případech, zejména u hematologických nádorů, molekulární analýza prokázala, že choroba, která se podle morfologických kritérií

zdála být uniformní, může být ve skutečnosti ještě dále dělena. Jiné případy, jako rakovina ledvin a prsu, ukazují, že existují různé podtřídy onemocnění, které vyžadují různé léčebné postupy. Další situace jsou, že některé typy rakoviny jsou morfologicky a molekulárně podobné, ale jejich další vývoj závisí na specifických molekulárních změnách. Například mutace proteinu Tp53 může znamenat horší prognózu několika typů rakoviny, včetně nefroblastomu a rakoviny močového měchýře (Schulz, 2005).

- Predikce reakce na konkrétní terapii: Terapie se stále více zaměřuje na specifické molekulární změny, které jsou přítomné v podtřídě rakovin jednoho histologického typu, takže molekulární diagnostika musí nutně určit, která rakovina vyjadřuje ty které cíle pro specifickou terapii. To posiluje trend individuální léčby rakoviny (Schulz, 2005).

### **2.3.2 Možnosti léčby**

Tradiční metody v léčbě rakoviny zahrnují chirurgický zákrok, chemoterapii, radioterapii a jejich kombinace. Významný pokrok při léčbě nádorů uvedenými metodami je však malý, například ve Spojených státech amerických bylo v roce 1970 7% pacientů, kterým byla diagnostikována rakovina plic, naživu i po pěti letech, o třicet let později se toto číslo zvýšilo pouze na 14% pacientů. Za zvýšeným počtem vyléčených pacientů stojí především včasná diagnóza (Weinberg, 2014).

Diagnostikované nádory spadají do tří tříd:

- Indolentní nádory s nízkým invazivním a metastatickým potenciálem, které se během života pacienta nemění (Weinberg, 2014).
- Nádory s invazivním potenciálem, ale s možností včasné léčby, než dojde k zakládání sekundárních ložisek (Weinberg, 2014).
- Vysoce agresivní nádory s vysokou pravděpodobností vniku metastáz, šířící se od doby, kdy byl diagnostikován primární nádor (Weinberg, 2014).

Podle povahy nádoru se zvolí nejvhodnější způsob léčby:

- Chirurgická léčba – operativní zákrok zpravidla odstraní nádorové ložisko a přilehlou tkáň, která často zahrnuje i okolní lymfatické uzliny. Vyjmutá zhoubná tkáň je patologicky vyšetřena, což poskytne informace o povaze nádoru a v závislosti na tom zvolení dalšího příslušného léčebného kroku (Franks a Teich, 1997).
- Radioterapie – se pomalu začala vyvíjet v počátcích 20. století. Užívá se v kombinaci s chirurgickou léčbou, záření se aplikuje na těsnou blízkost operovaného okolí. Vypálení tkáně zabraňuje recidivě rakoviny. Základem systémové radioterapie je využití radioaktivních izotopů podávaných intravenózně jako složky farmaceutického léku nebo spojených s monoklonálními protilátkami. Často se používá, když nádor nebo jeho část nelze snadno operativně odstranit nebo když se rakovinné buňky šíří organismem (Weinberg, 2014).
- Chemoterapie – se jako léčebná metoda zavedla po 2. světové válce. Výzkum v roce 1942 na univerzitě Yale odhalil, že intravenózní dávky yperitu vedly k regresi lymfomu. Chemoterapie se používá jako doplňková léčba k chirurgickému zákroku. Cytostatika ničí stejně proliferující nádorové buňky jako ty zdravé, proto se léčba chemoterapií provádí v pulsech po určitých časových úsecích, aby se zdravá tkáň stihla zregenerovat. Aby se snížila možnost vzniku rezistence nádorových buněk na cytostatika, používá se kombinace léků s odlišnými a vzájemně se doplňujícími způsoby usmrcení buňky, jako jsou antimetabolity, alkylační činidla a antagonisté mikrotubulů. Kromě jejich účinků na snížení či odstranění nádorů mají některé cytotoxické látky mutagenní účinky, následkem čehož může v dalších letech propuknout zhoubné bujení znovu (Weinberg, 2014).

### 2.3.2.1 Imunoterapie

Nádorová imunoterapie je v současné době na vzestupu. Biologická terapie, která se u nás chápe jako targetovaná terapie, to sice všechno zahrnuje, ale např. hormonální terapie není imunoterapie.

Léčebné manipulace s imunitním systémem se rozdělují na pasivní a aktivní a na specifické a nespecifické. Prozatím je nejčastěji využívána aktivní nespecifická modulace, kdy se aplikují biotechnologicky připravené cytokiny. Nejběžněji se používá rekombinantní IFN  $\alpha$ , podstatně méně se využívá IFN  $\gamma$ . Interferony se většinou aplikují subkutánně, kromě nich se používají i interleukiny, zejména IL-2. Výsledky této léčby jsou však rozporuplné vzhledem ke komplexnímu působení cytokinů. Lepší výsledky vykazuje takzvaná chemoimunoterapie, při které se střídá aplikace cytostatik s modulací imunitního systému pomocí rekombinantních cytokinů. Přestože cytostatika negativně ovlivňují buňky imunitního systému, významně redukuje nádory a aplikování rekombinantních cytokinů ve vhodném odstupu aktivuje imunitní systém, který následně může eliminovat reziduální nádorové buňky (Krejsek a Kopecký, 2004).

Adoptivní imunoterapie je další aktivní nespecifická metoda. Princip spočívá v mimotělní aktivaci mononukleárních leukocytů z periferní krve. Aktivace vede ke vzniku LAK buněk (lymfokiny aktivovaní zabíječi). Jsou-li aktivovány buňky imunitního systému, které infiltrují tumory nebo buňky z ascitické tekutiny nemocných s metastatickým postižením, jedná se o TIL buňky (tumor infiltrující lymfocyty). Po aplikaci těchto suspenzí je indukována aktivní protinádorová imunitní odpověď prostřednictvím dendritických buněk. Buňky LAK a TIL se podávají lokálně i intravenózně s dodatečným použitím rekombinantních cytokinů (Krejsek a Kopecký, 2004).

Z pasivních specifických metod je nejvýznamnější použití monoklonálních protilátek. Výrazně zvyšují specifičnost terapie, neboť jsou mířené na antigeny, které jsou exprimované pouze na nádorových buňkách. Vazba monoklonálních protilátek na nádorové buňky vyvolává apoptózu, zároveň aktivuje komplement a ADCC (na protilátkách závislou buněčnou cytotoxicitu) (Krejsek a Kopecký, 2004).

Vakcinace nádorovými antigeny představuje současný vrchol aktivní specifické terapie. V počátcích byly používány nádorové buňky usmrcené ionizujícím zářením, dnes jsou používány plně definované antigenní peptidy odpovídající imunodominantním částem konkrétních nádorových antigenů. Musí být však zachován princip MHC restrikce, tedy fakt, že odpověď na konkrétní antigenní fragmenty je možné očekávat pouze u osob nesoucích odpovídající molekuly MHC I. třídy. Přidání adjuvans k nádorovým antigenům výsledky

ještě vylepšilo. Adjuvans působí na složky přirozené imunity, které prezentují specifické imunitě nádorové antigeny navázané na MHC molekuly. Za adjuvans se obvykle používají látky mikrobiálního původu, jako inkompletní Freundovo adjuvans nebo CpG oligonukleotidy mikrobiálního původu (Krejsek a Kopecký, 2004).

Jeden z novějších imunomodulačních zásahů je aplikace manipulovaných dendritických buněk. Prekurzory dendritických buněk jsou v in vitro podmínkách vystaveny působení IL-4, GM-CSF, případně dalších cytokinů, a stávají se tak plně imunokompetentními dendritickými buňkami. Následně jsou tyto nezralé dendritické buňky inkubovány s nádorovými antigeny a pak pomocí LPS a POLY (I:C) je vyvolána jejich maturace. Dendritické buňky jsou následně aplikovány pacientům s nádorovým onemocněním (Krejsek a Kopecký, 2004).

Imunoterapie vede k pozitivní klinické odezvě, a to především díky možnosti co nejvíce individualizovaného přístupu k jednotlivým pacientům. Stinnou stránkou je, že se jedná o technicky mimořádně náročné postupy, a tím pádem o drahé léčebné metody (Krejsek a Kopecký, 2004).

Pozornost našeho týmu, vedeného RNDr. Janem Ženkou, CSc., je soustředěna na vrozenou imunitu. Vrozená imunita má veliký potenciál, pouze neutrofilů se v lidském těle vytváří denně  $10^{11}$ . Jelikož jsou nádorové buňky zmutované buňky vlastního organismu, imunitní systém a zejména mechanismy vrozené imunity na ně těžko cílí. Z tohoto důvodu na nádorové buňky vážeme různé molekuly, které jsou běžně součástí hub a bakterií, jako je například polysacharid manan. Jakmile jsou nádorové buňky takto označené, je pro imunitní systém výrazně snazší jejich následná likvidace. Naše terapie je založena na synergii TLR agonistů, kteří vyvolají v nádoru zánětlivou infiltraci, a na nádor navázaných ligandů, stimulačních fagocytární likvidaci nádorových buněk (kotvený manan).

### **2.3.2.1.1 Nádorová imunoterapie pomocí vybraných imunomodulačních látek**

#### **TLR agonisté**

Po navázání TLR agonistů na příslušný TLR receptor dochází k aktivaci určitých signálních drah. V této práci byly použity následující TLR agonisté:

- Resiquimod (R-848) – Jedná se o molekulu se silnými protivirovými a protinádorovými účinky. U lidí je to agonista TLR7/8, u myši jde o agonistu TLR7. Aktivací dochází k produkci cytokinů a regulaci IFN $\gamma$  (Meyer a kol., 2013).
- Polyinosinická-polycitidylická kyselina (POLY I:C) – Je synteticky vyrobená sloučenina a agonista TLR3, signální dráha mimo jiné aktivuje prozánětlivé cytokiny (Liu a kol., 2012).
- Lipoteichová kyselina (LTA) – Součást buněčné stěny většiny gram-pozitivních bakterií. LTA se řadí k agonistům TLR2. Zahájením imunitní reakce dochází k produkci prozánětlivých mediátorů a aktivaci systému komplementu (Ginsburg, 2002).

## **Manan**

Manan je polysacharid tvořený jednotkami manózy. Manan je rozpoznáván imunitním systémem pomocí dvou receptorů, těmi jsou manózový receptor (MR) a lektin vázající manózu (MBL). MBL, lektin, rozpoznává jednotlivé PAMPs, váže se na ně, čímž napomáhá aktivaci kaskády komplementu a funguje jako opsonin pro fagocytózu (Takahashi a Ezekowitz, 2005).

MR, vyskytující se na makrofázích či dendritických buňkách, na sebe váže patogeny díky tomu, že rozpoznává manózové zbytky na povrchu bakterií či virů. Napomáhá tyto mikroorganismy fagocytovat, podílí se rovněž na prezentaci antigenu a intracelulární signalizaci (Crespo a kol., 2011).

## **LL-8**

Při likvidaci nádorových buněk jsme rovněž testovali LL-8, jakožto jeden z mnoha kationických antimikrobiálních peptidů (CAPs). Důležitá vlastnost CAPs vychází z převážně pozitivního náboje daných peptidů, který reaguje s výrazně záporným nábojem membrán

bakterií. CAPs vytvořením otvorů v bakteriích navozuje jejich buněčnou smrt (Doležilková a kol., 2011).



### 3 Cíle práce

- Studium významu stimulace fagocytózy pro účinek nádorové imunoterapie založené na mechanismech vrozené imunity na modelu B16-F10.
- Studium antimetastatického účinku nádorové imunoterapie založené na synergii TLR agonistů se stimulací fagocytózy (model pankreatický adenokarcinom Panc02).
- *In vitro* studium účinku makrofágů na buňky pankreatického adenokarcinomu linie Panc02.

## 4 Materiál

### 4.1 Chemikálie

- RPMI 1640 (*Sigma-Aldrich, USA*)
- D-MEM (*Sigma-Aldrich, USA*)
- Fetal Calf Serum (FCS) (*Sigma-Aldrich, USA*)
- Biocompatible Anchor for cell Membrane (BAM) (*NOF Corporation, USA*)
- Manan (*Sigma-Aldrich, USA*)
- Lipopolysacharid (LPS) (*Sigma-Aldrich, USA*)
- R-848 (*Tocris Bioscience, UK*)
- POLY I:C (*Sigma-Aldrich, USA*)
- LTA (*Sigma-Aldrich, USA*)
- LL-8 (*Schafer-N, Dánsko*)
- Trypanová modř (*Sigma-Aldrich, USA*)
- Trypsin (*Sigma-Aldrich, USA*)

### 4.2 Laboratorní zvířata

Pokusy *in vivo* byly prováděny na samicích myši linie C57BL/6N z chovu Charles River Laboratories, starých 8 týdnů a s váhou v rozmezí 18 – 20 g. Myši byly chovány při fotoperiodě 12/12 hodin s neomezeným přístupem ke sterilní vodě a krmivu.

### 4.3 Nádorové buněčné linie

V pokusech byly použity nádorové buňky myšního pankreatického adenokarcinomu Panc02 (dar prof. Partecke, University of Greifswald) kultivované v D-MEM s 10% FCS a 1 % antibiotik a 1 % glutaminu, a nádorové buňky myšního melanomu B16-F10 (dar prof. Říhové, MBÚ Praha) kultivované v RPMI 1640 s 10% FCS, společně s 1 % antibiotik, 1 % glutaminu a 0,1 % merkaptotetanu při teplotě 37°C v atmosféře nasycené vodními parami s koncentrací 5% CO<sub>2</sub>.

## **4.4 Linie makrofágů**

Během experimentů byly použity buňky PMJ2R, což je linie peritoneálních makrofágů, tedy makrofágů pobřišnice. Makrofágy byly dodány od American Type Culture Collection, (ATCC, Manassas, VA). Kultivace probíhala v RPMI s 10% FCS a antibiotiky při teplotě 37°C v atmosféře nasycené vodními parami s koncentrací 5% CO<sub>2</sub>.

## **5 Metody**

### **5.1 Příprava melanomových buněk B16-F10**

Pro odstranění kultivačního média byly buňky třikrát propláchnuty sterilním PBS. Následně byla provedena trypsinizace (0,02% trypsin a 0,02 EDTA v PBS), která probíhala po dobu 5 minut v termostatu při teplotě 37°C. K ukončení trypsinizace se použilo malé množství média RPMI 1640 s 10% FCS, buňky byly následně rozvolněny. Buňky byly dále centrifugovány po dobu 10 minut při teplotě 4°C a přetížení 150G. Po centrifugaci bylo médium vylito a k buňkám v peletu bylo přidáno médium RPMI 1640 bez séra na objem 3 ml. Buňky se rozvolnily a do zkumavky bylo napipetováno 30 µl této suspenze a 30 µl trypanové modři. Obarvené mrtvé buňky byly následně spočítány v Bürkerově komůrce a případně rozředěny na požadovanou koncentraci.

### **5.2 Příprava nádorových buněk Panc02**

Pro odstranění kultivačního média byly buňky třikrát propláchnuty sterilním PBS. Následně byla provedena trypsinizace (0,02% trypsin a 0,02 EDTA v PBS), která probíhala po dobu 5 minut v termostatu při teplotě 37°C. K ukončení trypsinizace se použilo malé množství média D-MEM s 10% FCS, buňky byly následně rozvolněny. Buňky byly dále centrifugovány po dobu 10 minut při teplotě 4°C a přetížení 150G. Po centrifugaci bylo médium vylito a k buňkám v peletu bylo přidáno médium D-MEM bez séra na objem 3 ml. Buňky se rozvolnily a do zkumavky bylo napipetováno 30 µl této suspenze a 30 µl trypanové modři. Obarvené mrtvé buňky byly následně spočítány v Bürkerově komůrce a případně rozředěny na požadovanou koncentraci.

### **5.3 Příprava PMJ2R**

Po opatrném odstranění kultivačního média bylo k makrofágům přilito malé množství média, v kterém byly buňky rozvolněny, a poté se médium doplnilo na původní objem.

## **5.4 Příprava manan-BAM**

Roztok mananu byl redukován kyanoborohydridem sodným při pH 7,5 a 50° C, a to po pět dnů v prostředí obsahující octan amonný. Vzniklý roztok byl dialyzován při 4°C proti PBS přes noc (dialyzační membrány MWCO 3500, Serva, Německo).

Následovalo navázání kotvy BAM na aminoskupinu mananu. Jeden konec molekuly BAM je tvořen hydrofobním řetězcem kyseliny olejové. Tak je umožněno kotvení do cytoplasmatické membrány nádorové buňky. Opačný konec je hydrofilní s obsahem polyethylenglykolu a navazují se na něj terapeutické látky. Na tomto konci je umístěna i amino skupina, pomocí které je zajištěno připojení ligandů. (Kato a kol., 2004).

## **5.5 Příprava Resiquimodu.HCl**

Příprava Resiquimodu proběhla smícháním R-848 s ekvivalentem 3,5% HCl. Kyselina chlorovodíková se na Resiquimod váže z toho důvodu, že zvyšuje rozpustnost R-848 ve vodě.

## **5.6 Transplantace melanomových buněk B16-F10**

Před transplantací byly myši oholeny na pravém boku, aby byl nádor patrnější. Subkutánně se transplantovalo 400 000 buněk B16-F10 v 0,1 ml RPMI 1640 bez séra.

## **5.7 Transplantace pankreatických buněk Panc02**

Pro snadnější detekci nádoru byly před transplantací myši rovněž oholeny na pravém boku. Z důvodu náročnosti provedení myším nebyly buňky Panc02 transplantovány do slinivky břišní, ale jako v případě buněk B16-F10 byly transplantovány subkutánně, a to 500 000 buněk Panc02 v 0,1 ml D-MEM bez séra.

## 5.8 Měření velikosti nádoru

Velikost nádoru se měřila během terapie jednou za dva dny. K měření nádorů sloužil kaliper. Naměřené rozměry posloužily ke stanovení objemu nádorů pomocí vzorce  $V = \pi/6 AB^2$ , v němž A odpovídá délce nádoru a B jeho výšce.

## 5.9 Výpočet výskytu metastáz

U *in vivo* pokusu s nádorovými buňkami Panc02 byl sledován výskyt metastáz. Prevalence metastáz se poté spočítala následujícím způsobem: *počet myší stejné skupiny s metastázami/počet myší ve skupině*.

## 5.10 Statistické vyhodnocení

Statistické vyhodnocení výsledků bylo provedeno pomocí programů *MO Excel* a *Statistica 12*. V grafu byla použita střední chyba průměru (SEM).

## **5.11 Pokus č. 1: Srovnání nádorové imunoterapie založená na synergii TLR agonistů se stimulací fagocytózy s terapií kombinující TLR agonisty s kationickým antimikrobiálním peptidem**

Experiment byl prováděn na 36 samicích C57BL/6N. Myším bylo subkutánně transplantováno 400 000 buněk B16-F10. 12. den po transplantaci byly myši rozděleny do 6 skupin (A, B, C, D, E, F) po 6 myších chovaných jednotlivě. Ve stejný den (den 0) se změřily nádory a zahájila se terapie ve dnech 0, 1, 2, 8, 9, 10. U všech skupin se obden měřila velikost nádorů. V případě, že se v tentýž den měřila velikost nádorů a zároveň se aplikovala terapeutika, byla nejdříve změřena velikost nádorů.

Schéma dávkování:

- Skupina A – 6x intratumorální aplikace 50 µl směsi o složení 0,5 mg R-848.HCl + 0,5 mg POLY I:C + 0,5 mg LTA + 14,1 mg LL-8/ml PBS
- Skupina B – 6x intratumorální aplikace 50 µl roztoku 14,1 mg LL-8/ml PBS
- Skupina C – 6x intratumorální aplikace 50 µl 0,2 mM manan-BAM v PBS
- Skupina D – 6x intratumorální aplikace 50 µl směsi o složení 0,5 mg R-848.HCl + 0,5 mg POLY I:C + 0,5 mg LTA/ml PBS
- Skupina E – 6x intratumorální aplikace 50 µl směsi o složení 0,5 mg R-848.HCl + 0,5 mg POLY I:C + 0,5 mg LTA/ml 0,2 mM manan-BAM v PBS
- Skupina F – 6x intratumorální aplikace 50 µl PBS (kontrolní skupina)

Kationický antimikrobiální peptid LL-8 byl použit u dvou skupin (samostatně i ve směsi) pro porovnání protinádorového efektu oproti fagocytózu stimulujícímu ligandu (manan-BAM).

## **5.12 Pokus č. 2: Terapie pankreatického adenokarcinomu založená na synergii TLR agonistů se stimulací fagocytózy. Analýza doby přežití a výskytu metastáz.**

Experiment byl prováděn na 24 samicích C57BL/6N, kterým bylo subkutánně transplantováno 500 000 buněk Panc02, 12. den po transplantaci byly rozděleny do 4 skupin (A, B, C, D) po 6 myších chovaných jednotlivě. Ve stejný den (den 0) se poprvé změřily nádory a zahájila se terapie ve dnech 0, 1, 2, 8, 9, 10, 16, 17, 18, 24, 25, 26 a obden se měřila velikost nádorů. V případě, že se v tentýž den měřila velikost nádorů a zároveň se aplikovala terapeutika, byla nejdříve změřena velikost nádorů.

Schéma dávkování:

- Skupina A – 12x intratumorální aplikace 50 µl směsi o složení 0,5 mg R-848.HCl + 0,5 mg POLY I:C + 0,5 mg LTA/ml 0,2 mM manan-BAM v PBS
- Skupina B – 12x intratumorální aplikace 50 µl směsi o složení 0,5 mg R-848.HCl + 0,5 mg POLY I:C + 0,5 mg LTA/ml PBS
- Skupina C – 12x intratumorální aplikace 50 µl 0,2 mM manan-BAM v PBS
- Skupina D – 12x intratumorální aplikace 50 µl PBS (kontrolní skupina)

Během terapie i po jejím ukončení se zaznamenávala doba přežití myši a po úhynu se vždy provedla pitva se zaměřením na hledání metastáz. Metastázy byly zjištěny na játrech a v žaludku a zkoumány nejdříve pouhým okem a následně i pod binolupou. Pokud byly orgány napadené, byla na nich vytvořena kulovitá žlutavá ložiska. Pozornost se rovněž zaměřila na detekci černání tkání, ke které docházelo.

### **5.13 Pokus č. 3: Cytotoxický účinek makrofágů (PMJ2R) na buňky pankreatického adenokarcinomu (Panc02). Studium různých způsobů aktivace makrofágů.**

Experiment byl prováděn *in vitro* použitím makrofágů PMJ2R a pankreatických buněk Panc02 v poměru 5:1.

Médium RPMI 1640 se připravilo s nedeaktivovaným sérem (= MED). V kapitole Metody bylo popsáno sklizení nádorových buněk i makrofágů. Makrofágy i buňky Panc02 byly centrifugovány při 5 min, 160 G, 4°C. Supernatant byl následně slit a pelet rozsuspendován v cca 20 ml MED. Centrifugace a rozsuspendování peletu byly provedeny celkem dvakrát. Následně se buňky počítaly v Bürkerově komůrce a upravila se jejich koncentrace, u makrofágů koncentrace činila 15 mil buněk/2,7 ml média a u nádorových buněk 4 mil buněk/7,2 ml média.

PMJ2R byly rozděleny následujícím způsobem – neaktivované (900 µl PMJ2R + 100 µl PBS), aktivované pomocí LPS (900 µl PMJ2R + 100 µl LPS o koncentraci 10 µg/ml PBS) a aktivované pomocí směsi R-848, POLY I:C, LTA (900 µl PMJ2R + 100 µl směsi 0,5 mg



R-848 + 0,5 mg POLY I:C + 0,5 mg LTA/ml PBS). Poté se inkubovaly v termostatu po dobu 2h při 37°C, v 5% CO<sub>2</sub> atmosféře.

Buňky Panc02 byly přeneseny na destičku po 180 µl na jamku. Buňky byly rozděleny do 8 skupin po 4 jamkách, dohromady tedy bylo 32 jamek. Jamky byly rozděleny na jamky bez ligandu (přidání 20 µl PBS) a jamky s ligandem (přidání 20 µl 0,2 mM manan-BAM). Následovala inkubace 30 min při 37°C, v 5% CO<sub>2</sub> atmosféře.

Vymytí nenavázaného ligandu se provedlo centrifugací při 2 min, 160 G, 4°C, poté se k buňkám přidalo 200 µl média a opět se za stejných podmínek centrifugovaly. Po centrifugaci se k Panc02 přidaly PMJ2R. Pouze ke 2 skupinám nebyly makrofágy přidány, zde se přidalo pouze 200 µl média. Ke zbylým 6 skupinám byly PMJ2R přidány v poměru 100 µl média a 100 µl PMJ2R. Buňky byly vzápětí uloženy do termostatu na 4 h při 37°C, v 5% CO<sub>2</sub> atmosféře. Výsledné rozdělení buněk (uvedené v **Tab. I**) do skupin vypadalo následujícím způsobem.

**Tab. I:** Schéma jamek

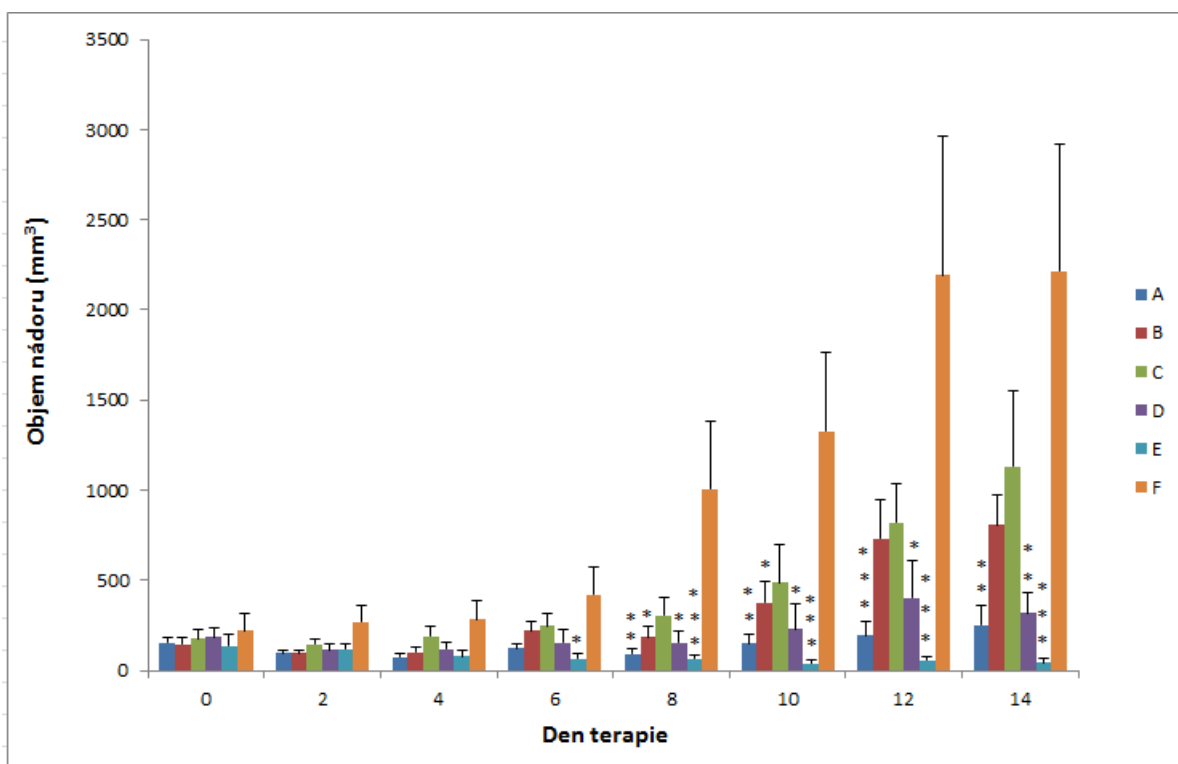
|  |  |
|--|--|
| Panc02                                     | Panc02 + manan-BAM                                     |
| Panc02 + PMJ2R                             | Panc02 + manan-BAM + PMJ2R                             |
| Panc02 + PMJ2R + LPS                       | Panc02 + manan-BAM + PMJ2R + LPS                       |
| Panc02 + PMJ2R + směs R-848, POLY I:C, LTA | Panc02 + manan-BAM + PMJ2R + směs R-848, POLY I:C, LTA |

Po inkubaci se z destičky vyklepnutím odstranilo médium, čím došlo k odstranění média společně s PMJ2R a mrtvými Panc02. K živým Panc02 bylo přidáno 50 µl trypsinu. Pro zastavení trypsinizace se přidalo 150 µl média. Do eppendorf zkumavky byla napipetována v poměru 1:1 suspenze a trypanová modř, obarvené buňky se následně spočítaly v Bürkerově komůrce.

## 6 Experimentální výsledky

### 6.1 Pokus č. 1: Srovnání nádorové imunoterapie založené na synergii TLR agonistů se stimulací fagocytózy s terapií kombinující TLR agonisty s kationickým antimikrobiálním peptidem

Výsledky jsou uvedeny na **Obr. 6**. Je patrné, že nejvýraznější redukci nádorového růstu způsobuje terapie směsí o složení R-848, POLY I:C, LTA + manan-BAM. Účinná byla rovněž terapie pomocí směsi R-848, POLY I:C, LTA + LL-8. Oproti tomu terapie pomocí jednotlivých složek vykazuje slabší účinnost. Účinek LL-8 byl statisticky nevýznamně vyšší, než účinek mannan-BAM

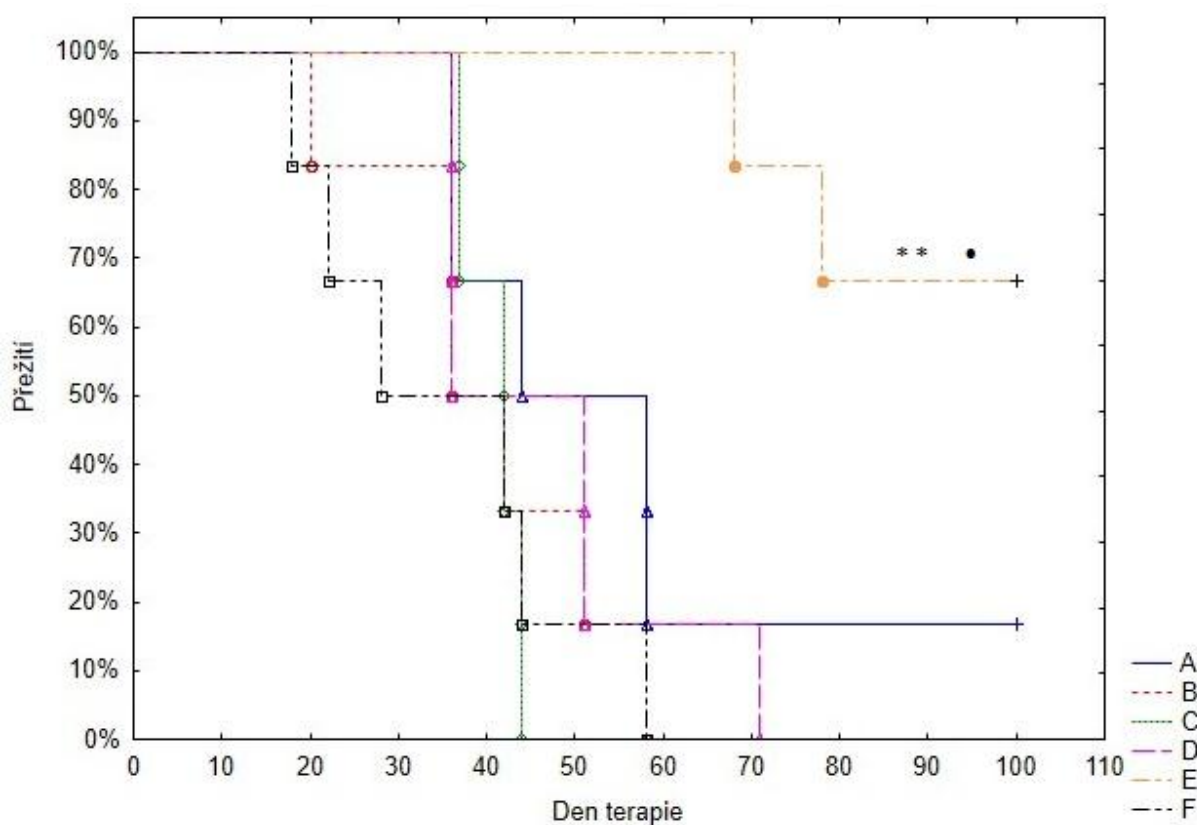


**Obr. 6:** Vliv terapie na růst nádoru (*skupina A* – směs o složení R-848, POLY I:C, LTA + LL-8, *skupina B* - LL-8, *skupina C* – manan-BAM, *skupina D* – směs o složení R-848, POLY I:C, LTA, *skupina E* – směs o složení R-848, POLY I:C, LTA + manan-BAM, *skupina F* – kontrolní – PBS)

Statistická významnost byla zjištěna pouze oproti kontrolní skupině (F), a to u skupin A, B, D, E.

\* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,005$  vztaženo ke skupině F

Po ukončení léčby byla sledována doba přežití. Ze skupiny A jedna myš přežila 100 dní, nejúspěšnější byla terapie u skupiny E, kde přežily čtyři myši 100 dní, přičemž dvě se úplně vyléčily. **Obr. 7** znázorňuje vliv terapie na délku přežití. Bylo dosaženo statisticky významného přežití u skupiny E oproti všem zbývajícím skupinám.



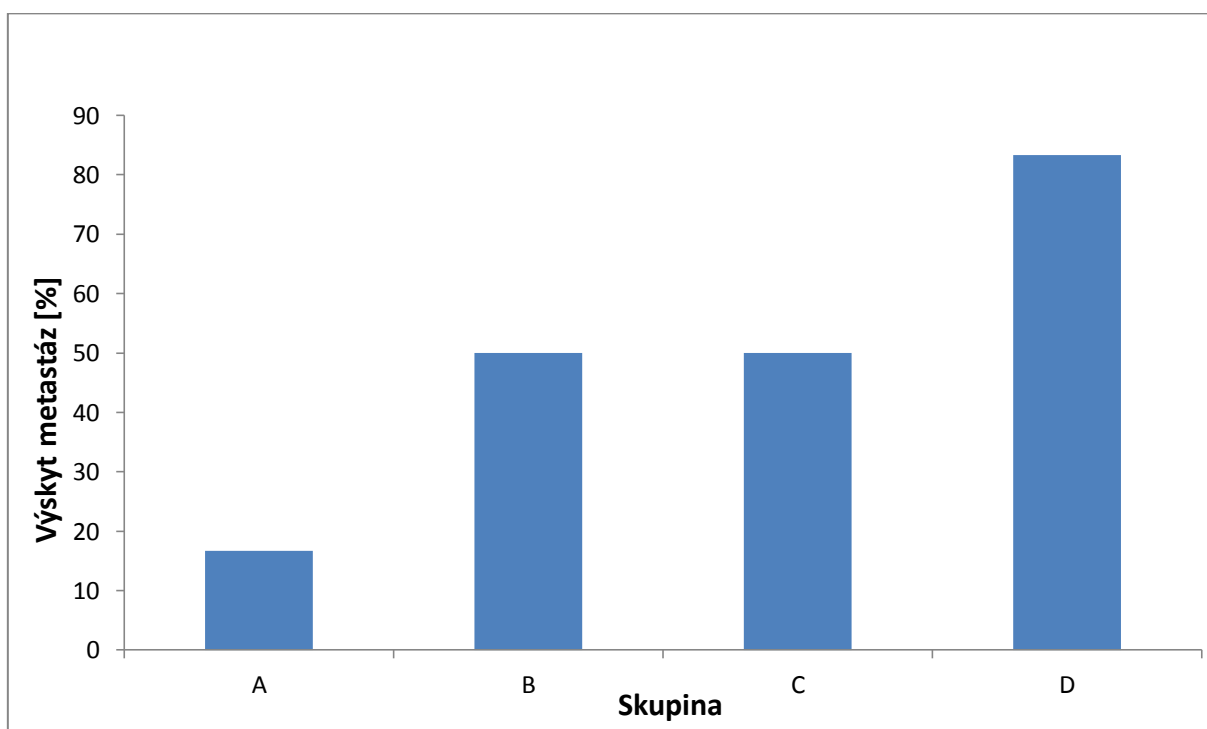
**Obr.7:** Vliv terapie na délku přežití (*skupina A – směs o složení R-848, POLY I:C, LTA + LL-8, skupina B - LL-8, skupina C – manan-BAM, skupina D – směs o složení R-848, POLY I:C, LTA, skupina E – směs o složení R-848, POLY I:C, LTA, manan-BAM, skupina F – kontrolní – PBS*)

\*\* =  $p < 0,01$  vztaženo ke skupinám B, C, F

•  $p < 0,05$  vztaženo ke skupinám A, D

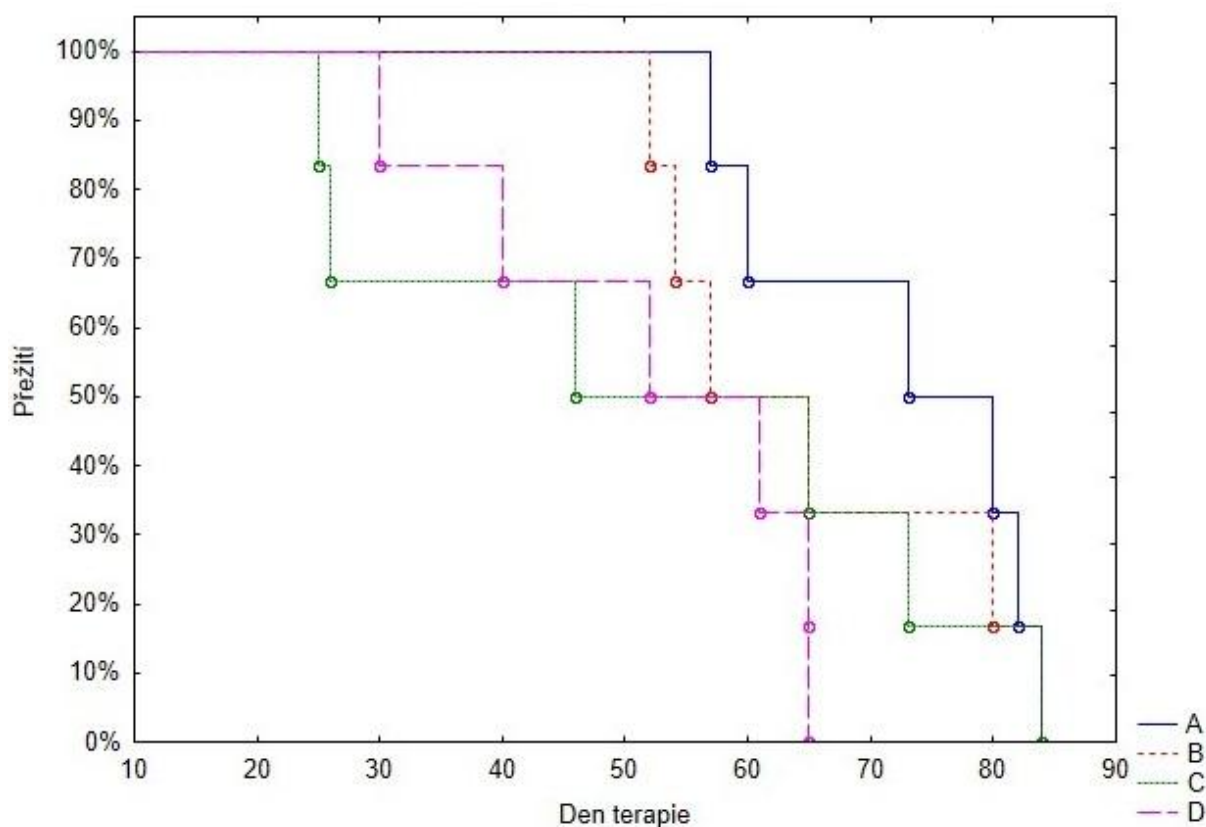
## 6.2 Pokus č. 2: Terapie pankreatického adenokarcinomu založená na synergii TLR agonistů se stimulací fagocytózy. Analýza doby přežití a výskytu metastáz.

Výsledky výskytu metastáz jsou znázorněny na **Obr. 8**. Z grafu lze vyčíst, že aplikace směsi o složení R-848, POLY I:C, LTA + manan-BAM působí proti vzniku metastáz nejefektivněji. Aplikací těchto imunomodulačních látek samostatně se výskyt metastáz podstatně zvýšil. Je tedy patrné, že směs o složení R-848, POLY I:C, LTA + manan-BAM vykazuje větší efektivitu společně, než když jsou imunomodulační látky použity samostatně. Bez žádné léčby je téměř absolutní prevalence metastáz.



**Obr. 8:** Vliv terapie na výskyt metastáz (skupina A – směs o složení R-848, POLY I:C, LTA + manan-BAM, skupina B - směs o složení R-848, POLY I:C, LTA, skupina C – manan-BAM, skupina D – kontrolní – PBS)

Po ukončení léčby byla sledována doba přežití myší. Jak je patrné z grafu **Obr. 9**, statisticky významného přežití oproti kontrolní skupině nebylo dosaženo.

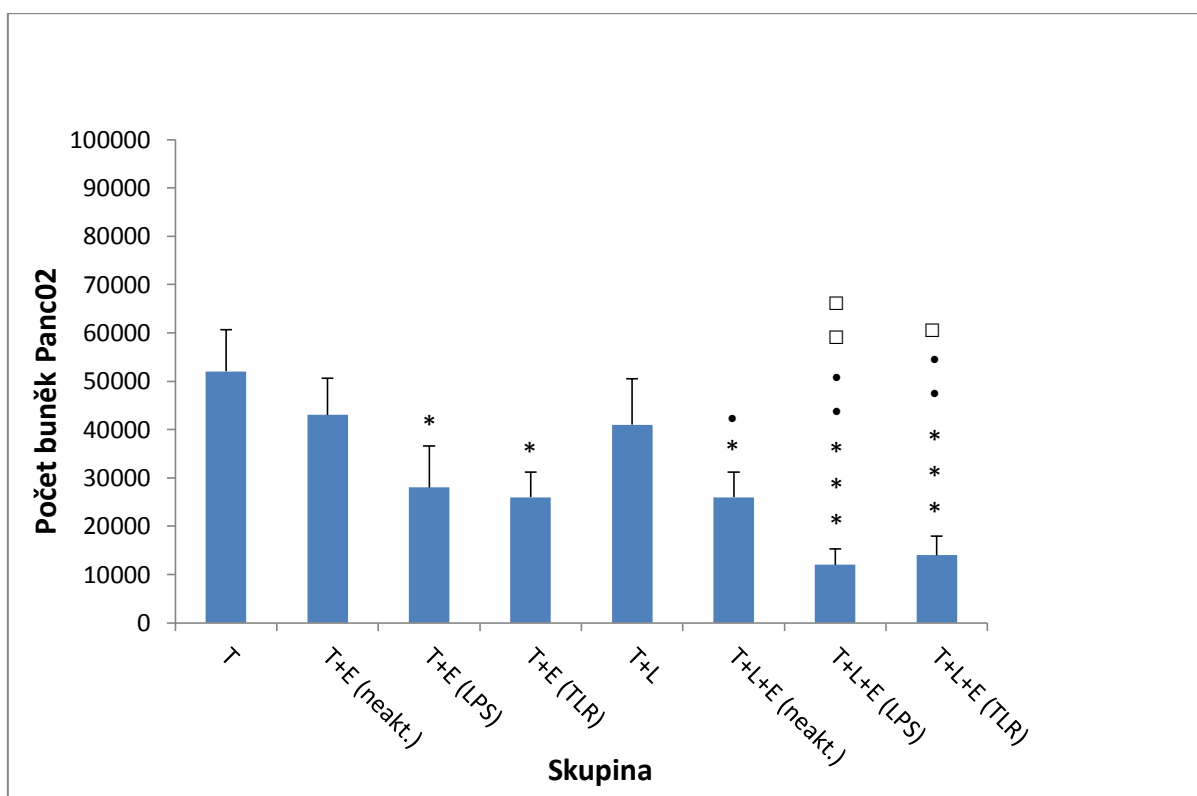


**Obr. 9:** Vliv terapie na délku přežití myší (skupina A – směs o složení R-848, POLY I:C, LTA + manan-BAM, skupina B - směs o složení R-848, POLY I:C, LTA, skupina C – manan-BAM, skupina D – kontrolní – PBS)

Metastázy, kulovitá nažloutlá ložiska, se nejčastěji vytvářely na játrech, ale byly objeveny i v žaludku. U téměř poloviny myší navíc docházelo k černání tkáně na játrech a v žaludku, nezdá se, že byla postižena i střeva. Tímto jevem byla nejméně postihnutá skupina A. Vzhledem k tomu, že myši byly pitvány nejdéle den po úhynu, a že ostatní orgány byly čisté, je pravděpodobné, že se rovněž jednalo o agresivní vliv pankreatického adenokarcinomu. Bližší povahu metastáz a zčernalé tkáně neznáme, neboť nebyla provedena histologie.

### 6.3 Pokus č. 3: Cytotoxický účinek makrofágů (PMJ2R) na buňky pankreatického adenokarcinomu (Panc02). Studium různých způsobů aktivace makrofágů.

Výsledky jsou uvedeny na **Obr. 10**. Z grafu je zřejmé, že největšího cytotoxického efektu je dosaženo za použití ligandu manan-BAM a PMJ2R aktivovaných LPS, téměř stejný účinek vykazuje i manan-BAM s PMJ2R aktivovanými směsí o složení R-848, POLY I:C, LTA. Účinek PMJ2R aktivovaných LPS nebo směsí o složení R-848, POLY I:C, LTA, či neaktivované PMJ2R s ligandem, je téměř o polovinu nižší a pouze neaktivované PMJ2R či samotný manan-BAM mají cytotoxický efekt nejslabší.



**Obr. 10:** Cytotoxický efekt PMJ2R na Panc02 (*T* = *targety* [Panc02], *T+E (neakt.)* = Panc02 a neaktivované efektorové buňky [PMJ2R], *T+E (LPS)* = Panc02 a PMJ2R aktivované LPS, *T+E (TLR)* = Panc02 a PMJ2R aktivované směsí o složení R-848, POLY I:C, LTA, *T+L* = Panc02 s navázaným ligandem [manan-BAM], *T+L+E (neakt.)* = Panc02 s navázaným manan-BAM a neaktivovanými PMJ2R, *T+L+E (LPS)* = Panc02 s navázaným manan-BAM a PMJ2R aktivovanými LPS, *T+L+E (TLR)* = Panc02 s navázaným manan-BAM a PMJ2R aktivované směsí o složení R-848, POLY I:C, LTA)

\* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,0001$ , \*\*\* =  $p < 0,000001$

\* vztaženo ke skupině **T**, • vztaženo ke skupině **T+E** (neakt.), □ vztaženo ke skupině **T+L**

## 7 Diskuze

Nádorová imunoterapie je stále více na vzestupu, jelikož možnost využití obranných schopností lidského organismu v boji proti rakovině je přirozenější a šetrnější, než jsou dosud nejhojněji užívané metody chemoterapie a radioterapie. Jak již bylo uvedeno, tým RNDr. Jana Ženky, CSc., soustředí svoje úsilí na stimulaci nespecifické imunity v nádorové terapii.

Při terapii dochází k nejvýraznější nespecifické imunitní odpovědi synergií TLR agonistů a ligandu (manan) kotveného na nádorové buňky, která stimuluje aktivitu fagocytárních buněk. Významným TLR agonistou je LPS. LPS působí přes Toll-like receptor 4, a získaná synergie s ligandem působí dočasné nebo trvalé zmizení nádorů (Janotová a kol., 2014). Zatímco však myší organismus snáší LPS dobře, u lidského organismu vyvolává septický šok (Yamamoto a kol., 2011). Tým RNDr. Jana Ženky, CSc. se postupně snažil nahradit LPS za monofosforyl lipid A (MPLA) (Švecová, 2013, Glaserová 2015),  $\beta$ -glukan (Husníková, 2014) a imiquimod (Jačková, 2015). Žádná ze zkušebních látek však nevytvářela významný efekt. Jako alternativu pro efektní působení TLR agonisty s fagocytózu stimulujícím ligandem vázaným na nádorové buňky, který by byl pro lidský organismus bezpečný, se nedávno ukázala být kombinace resiquimodu (R-848) a kotveného mananu (Caisová a kol., 2016). Tato práce rovněž ukázala na vhodnost použití komplexnější směsi TLR agonistů.

V prvním pokusu jsme poměřovali terapeutický efekt směsi tří TLR agonistů (konkrétně R-848, POLY I:C, LTA) a mananu s efektem směsi stejných TLR agonistů a kationického antimikrobiálního peptidu LL-8. Pro srovnání jsme při léčbě použili uvedené látky i samostatně, jak je výše uvedeno.

Kationické antimikrobiální peptidy (CAPs) jsou důležité z hlediska regulace nespecifické imunity. Pro CAPs je charakteristický kladný náboj a amfipatické vlastnosti (obsahují hydrofilní i hydrofobní část). Bakterie i nádorové buňky mají záporný náboj, což umožňuje kladně nabitým molekulám CAPs se na ně vázat a pomocí hydrofobní části narušit jejich membránu, což vede k buněčné smrti. Ačkoli mnoho CAPs vykazuje efektivní protinádorovou aktivitu, objevují se rovněž komplikace, jako je vysoká citlivost těchto molekul k soli ve fyziologickém prostředí, náchylnost k proteolytickému štěpení, které omezuje jejich životnost, některé CAPs molekuly jsou rovněž toxické pro normální buňky. (Hung-Lun a kol., 2015).



Naše léčba pomocí směsi TLR agonistů a LL-8 vykazovala dobré výsledky, ale podstatně efektivnější byla terapie za použití směsi TLR agonistů a mananu. Aktivaci TLRs signálních drah je spuštěna produkce cytokinů, vyvolávající zánětlivou infiltraci buňkami s převážně fagocytární aktivitou. Zatímco však molekula CAP buňky pouze usmrtí, navázáním ligandu na nádorové buňky je značně stimulována fagocytární aktivita. Z výsledků je patrné, že protinádorová aktivita je mnohem efektivnější, jsou-li nádorové buňky tzv. „ochucené“ navázaným ligandem. Při použití LL-8 a mananu samostatně byla protinádorová aktivita výrazně nižší než ve směsi s TLR agonisty, ačkoli terapie samotným LL-8 byla účinnější než použití samotného mananu. Význam opsonizace (ochucení) pro účinnost nádorové terapie si vysvětlujeme nejen podporou fagocytárního ataku na úrovni vrozené imunity, ale i tím, že fagocyty mohou následně pohlcené antigeny prezentovat lépe T lymfocytům, a tím zapojit i získanou imunitu. Pozorované jevy, jako je získání odolnosti vůči retransplantacím, tuto domněnku potvrzují (Caisová a kol., 2016).

Druhý experiment se zaměřil na terapii pankreatického adenokarcinomu Panc02, který byl týmem RNDr. Jana Ženky, CSc. použit vůbec poprvé. Zatímco kolegyně Masáková se ve své práci zaměřila na vliv terapie na redukci nádorového růstu (Masáková, 2016), já jsem zkoumala výskyt metastáz a dobu přežití. Zatímco při terapii melanomu se tým RNDr. Jana Ženky, CSc. může pochlubit 83% úspěšností vyléčení, léčba Panc02 podobnou úspěšnost nesdílí, všechny myši uhynuly do 84. dne. Na druhou stranu kolegyně Masáková ovšem zjistila významnou redukci nádorové hmoty, které bylo dosaženo terapií v kombinaci R-848, POLY I:C, LTA a manan-BAM (Masáková, 2016). Pozitivním bylo moje zjištění, že tato terapie vede rovněž i k nižšímu výskytu metastáz a prodloužení přežití, byť statisticky nevýznamnému ( $p = 0,063$ ).

Drobné kulovité žlutobílé útvary, které jsme vyhodnotili jako metastázy, byly nacházeny na játrech, občas se vyskytly dokonce i v žaludku. Metastázy jsme vyhodnocovali pouze okem a binolupou, histologie nebyla provedena. Žaludek často postihovalo černání, při pitvě jsme zjistili, že jednak byl žaludek naplněn zčernalou tráveninou, a je tedy možné, že tlak nádoru zpomaloval správnou mechanickou funkci žaludku a střev, rovněž však i tkáň žaludku byla černá. Mohlo to být vyvoláno nahromaděním potravy v žaludku a její těžké zpracovatelnosti, stejně tak jako se může jednat o vliv pankreatického adenokarcinomu. To je velmi pravděpodobné, protože i játra měla nezřídka postižena laloky černou tkání.

Pankreatický adenokarcinom je vysoce agresivní forma nádorového bujení s častou pozdní diagnózou a rezistencí k léčbě. Mikroprostředí nádoru se skládá z husté fibrotické tkáně. Nacházejí se zde infiltrující imunopresivní buňky, jako jsou regulační T-buňky

(Tregs), od myeloidu odvozené supresivní buňky (MDSCs), tumorem asociované makrofágy (TAM), které vysílají signály bránící imunologické aktivitě cytotoxických T lymfocytů a NK buněk. Pankreatický adenokarcinom se vyhne imunitnímu dohledu imunosupresivní sekrecí IL-10, vaskulárním endoteliálním růstovým faktorem, snížením exprese MHC I. Současně se imunoterapie zaměřuje na inhibici imunitních kontrolních bodů, jako je CTLA-4, programovaná buněčná smrt (PD-1) a programovaná buněčná smrt ligandem (PD-L1). Spolu s molekulami odvozenými a specifickými pro nádorové buňky vytváří tyto kontrolní body heterogenní protein exprimovaný nádorem schopný potlačovat a vyhýbat se imunitní odpovědi (Johansson a kol, 2016).

CTLA-4 je molekula exprimovaná na aktivovaných Th a Tc lymfocytech a na regulačních T lymfocytech (Tregs), která se stará o regulaci a rozvoj adaptivní imunity. Prostřednictvím Tregs molekula CTLA-4 potlačuje imunitní odpověď a snižuje expresi efektorových T lymfocytů. Tato imunosupresivní funkce je obzvláště zásadní v mikroprostředí nádoru slinivky. Inhibice CTLA-4 má dva protichůdné účinky. Jednak dojde k zvýšení imunitní odpovědi prostřednictvím efektorových T lymfocytů, vyčerpání regulačních T lymfocytů a redukci nádoru, zároveň však hrozí riziko rozvoje autoimunitního onemocnění. PD-1 je molekula exprimovaná na aktivovaných T buňkách, B buňkách, NK buňkách a monocytech. Stejně jako CTLA-4 se podílí na regulaci a vývoji adaptivní imunity. V mikroprostředí nádoru je molekula PD-1 exprimována na tumor infiltrujících lymfocytech (TIL), jako jsou CD4+ T buňky, což umožní nádoru vypěstovat si odolnost vůči imunitě navozením T buněčné apoptózy. Inhibicí PD-1 dochází k nárůstu imunitní odpovědi a zvýšení protinádorové aktivity. PD-L1 je molekula exprimovaná na nádorech a na nádor infiltrujících dendritických buňkách a makrofázích. Jedná se o ko-inhibiční ligand vázající se na PD-1 a CTLA-4 na T lymfocytech. Po navázání vyvolává inhibici a apoptózu efektorových T lymfocytů. Exprese PD-L1 na pankreatickém adenokarcinomu souvisí se zrychlenou karcinogenezí novotvaru a rezistencí vůči lékům, což dohromady dělá nádor slinivky vysoce maligní. Inhibice PD-L1 vede ke zvýšené aktivaci T buněk, sekreci IFN $\gamma$ , cytokinů a proteáz (Johansson a kol, 2016).

Vysoká odolnost pankreatického adenokarcinomu vůči imunoterapii vyvolala nutnost zesílit účinek naší imunoterapie kombinací s inhibicí imunitních kontrolních bodů. Tato kombinace se ukázala jako účinná (Ženka, ústní sdělení).

Imunoterapie se tak specificky více zaměřuje na imunitní systém než na samotné nádorové buňky. Cílem je dosažení interakce s molekulami, které hrají roli v aktivaci buněk imunitního systému, aby se odvrátila rakovinou indukovaná imunotolerance a zahájila se

protinádorová imunitní reakce. Dva typy léků, které cílí na imunitní systém, jsou tzv. „pattern recognition receptor agonists (PRRagos)“ a „immunostimulatory mAbs (ISmAbs)“. Imunitní buňky, které exprimují cíle těchto nových léků, se nacházejí v mikroprostředí nádoru. Na rozdíl od podávání konvenčních léků mohou být tyto nové léky aplikovány přímo do nádoru, a to dokonce jen na jedno místo, odkud pak generují protinádorovou imunitní odpověď (Marabelle a kol., 2014).

Třetí pokus, prováděn *in vitro*, byl zaměřen na cytotoxický účinek makrofágů PMJ2R na nádorové buňky Panc02. Cílem pokusu bylo zjistit, zda jsou buňky Panc02 odolnější vůči fagocytóze než buňky B16-F10, s kterými pracovala kolegyně Janotová (Janotová a kol., 2014) v experimentu podobného charakteru.

Náš experiment prokázal, že největšího cytotoxického efektu je dosaženo synergií kotveného mananu na nádorových buňkách a makrofágů aktivovaných LPS či tří TLR agonistů (R-848, POLY I:C, LTA), přičemž výrazně odlišný účinek mezi aktivací LPS a TLR nebyl zjištěn. Jednalo se o pozitivní zjištění, neboť jak je uvedeno výše, zatímco myši snášejí podávání LPS dobře, u lidí vyvolává septický šok. TLR agonisté tedy mohou být dobrou náhradou. Jakmile na nádorových buňkách nebyl vázán manan-BAM nebo se použily neaktivované makrofágy, cytotoxický účinek PMJ2R prudce klesl, a to až o polovinu. Výsledky jednotlivých skupin jsou srovnatelné s výsledky uvedenými v práci Janotové (Janotová a kol., 2014), lze tedy zamítnout hypotézu, že nádorové buňky Panc02 jsou odolnější vůči fagocytóze.

V terapii mohou být makrofágy využity, aby se obešly problémy s nádorovou různorodostí a vznikem rezistence. Vhodně aktivované makrofágy mohou detekovat a zničit nádorové buňky a zdravé buňky nechat nedotčené. Ačkoli přesný mechanismus, jak makrofágy rozlišují nádorové buňky od zdravých, není znám, je nezávislý na typických znacích nádorů, jako je imunogenicita, metastatický potenciál a citlivost k cytotoxickým látkám. Zničení nádoru pomocí makrofágů není spojeno s rozvojem rezistence nádorových buněk. Makrofágy jsou nacházeny ve spojení s maligními nádory v přesně vymezených vzorech naznačujících, že nejvíc přímý způsob, jak dosáhnout makrofágy zprostředkovanou regresi nádoru, je aktivace makrofágů *in situ* (Whitworth a kol., 1990).

Náš terapeutický přístup obchází problémy s tím, že schopnost makrofágů rozpoznat nádorové buňky často kolísá u různých jedinců tím, že na nádorové buňky uměle instalujeme ligandy rozpoznávané vrozenou imunitou a vedoucí k fagocytárnímú ataku.

## 8 Závěr

- Kotvený manan v kombinaci s třemi TLR agonisty (R-848, POLY I:C, LTA) prokázal dobrou účinnost v imunoterapii melanomu i pankreatického adenokarcinomu. V lidské terapii mohou TLR agonisté nahradit LPS.
- Protinádorová imunitní aktivita je efektivnější, jsou-li nádorové buňky opsonizované ligandem (manan). Samotné usmrcení nádorových buněk (pomocí molekul CAPs) není dostatečné.
- Terapie Panc02 pomocí směsi R-848, POLY I:C, LTA a manan-BAM vedla k nižšímu výskytu metastáz a prodloužení přežití.
- Metastázy pankreatického adenokarcinomu vznikají v játrech a žaludku. Pankreatický adenokarcinom má také pravděpodobně vliv na černání tkáně uvedených orgánů.
- Buňky Panc02 nejsou vůči fagocytóze odolnější než buňky B16-F10.

## 9 Seznam použité literatury

Altaner, Č. 2008. Buněčná a molekulární biologie rakoviny. Radix. Praha. s. 127. ISBN: 978-80-86031-85-9.

Bártová, J. 2007. Patologie pro bakaláře. Karolinum. Praha. s. 172. ISBN: 9788024607948.

Brosens, L. A. A., Hackeng, W. M., Offerhaus, G. J., Hruban, R. H., Wood, L. D. 2015. Pancreatic adenocarcinoma pathology: changing „landscape“. *Journal of Gastrointestinal Oncology*. 6(4). 358 – 374.

Caisová, V., Vieru, A., Kumžáková, Z., Glaserová, S., Husníková, H., Vácová, N., Krejčová, G., Paďouková, L., Jochmanová, I., Wolf, K. I., Chmelař, J., Kopecký, J., Ženka, J. 2016. Innate immunity based cancer immunotherapy: B16-F10 murine melanoma model. *BMC Cancer*. 16 (1). 1 – 11.

Crespo, H., Reina, R., Glaria, I., Ramírez, H., de Andrés, X., Jáuregui, P., Luján, L., Martínez-Pomeres, L., Amorena, B., de Andrés, D. F. (2011). Identification of the ovine mannose receptor and its possible role in Visna/Maedi virus infection. *Veterinary Research*. 42(1). 28.

Damsky, W. E., Bosenberg, M. 2010. Mouse melanoma models and cell lines. *Pigment Cell & Melanoma Research*. 23 (6). 853 – 859.

Doležilková, I., Macková, M., Macek, T. 2011. Antimikrobiální Peptidy: vztah mezi jejich strukturou a antibakteriální aktivitou. *Chemické listy*. 105. 346 - 355.

Dušek, L., Mužík, J., Gelnarová, E., Fínek, J., Vyzula, R., Abrahámová, J. 2010. Cancer incidence and mortality in the Czech Republic. *Klinická onkologie*. 23 (5). 311 – 324.

Esposito, I., Konukiewitz, B., Schlitter, A. M., Klöppel, G. 2014. Pathology of pancreatic ductal adenocarcinoma: Facts, challenges and future developments. *World Journal of Gastroenterology*. 20 (38). 13833 – 13841.

Fakan, F. 2008. Přehled patologie pro bakalářské zdravotnické obory. Karolinum. Praha. s. 112. ISBN: 978-80-246-1054-2.

Franks, L. M., Teich, N.M. (eds.). 1997. Introduction to the cellular and molecular biology of cancer. Oxford University press. Oxford. p. 458. ISBN: 0-19-854854-0.

Ginsburg, I. 2002. Role of lipoteichoic acid and infection and inflammation. *The Lancet Infectious Diseases*. 2 (3). 171 – 179.

Glaserová, S. 2015. Studium klinicky aplikovatelné nádorové imunoterapie a jejich mechanismů. Diplomová práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. 66 s.

Hidalgo, M. 2010. Pancreatic cancer. *The New England Journal of Medicine*. 362 (17). 1605 – 1617.

Hung-Lun, Ch., Bak-Sau, Y., Kuan-Hao, Ch., Hui-Yuan, Y., Ya-Han, Ch., Hsi-Tsung, Ch., Yu-Ting, Ch., Jya-Wei, Ch. 2015. Novel antimicrobial peptides with high anticancer activity and selectivity. *PLOS ONE*. 10 (5). e0126390.

Husníková, H. 2014. Nádorová imunoterapie založená na použití ligandů fagocytárních receptorů, kotvených na nádorové buňky. Studium možností zesílení jejího účinku a specifity. Diplomová práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. 83 s.

Janeway, Ch. A., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M. J. 2005. *Immunobiology: the immune system in health and disease*. Garland Science Taylor & Francis Group. New York. p. 823. ISBN: 0-8153-4101-6.

Jačková, A. 2015. Hledání agonistů TLR působících synergicky s ligandy fagocytárních receptorů v nádorové terapii. Diplomová práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. 77 s.

Janotová, T., Auerová, M., Jalovecká, M., Švecová, I., Caisová, V., Bruzlová, P., Maierová, V., Kumžáková, Z., Čunátová, Š., Vlčková, Z., Rozsypalová, P., Lukáčová, K., Vácová, N., Wachtlová, M., Salát, J., Lieskovská, J., Kopecký, J., Ženka, J. 2014. The use of anchored agonists of phagocytic receptors for cancer immunotherapy: B16-F10 Murine melanoma model. *PLOS ONE*. 9 (1). e85222.

Johansson, H., Andersson, R., Bauden, M., Hammes, S., Holdenrieder, S., Ansari, D. 2016. Immune checkpoint therapy for pancreatic cancer. *World Journal of Gastroenterology*. 22 (43). 9457 – 9476.

Kato, K., Itoh, C., Yasukouchi, T., Nagamune, T. (2004). Rapid protein anchoring into the membranes of mammalian cells using oleyl chain and poly (ethylene glycol) derivatives. *Biotechnology Progress*. 20 (3). 897-904.

- Khan, M., Pelengaris, S. (eds.). 2006. The molecular biology of cancer. Willey-Blackwell. p. 544. ISBN: 978-1-4051-1814-9.
- Krejsek, J., Kopecký, O. 2004. Klinická imunologie. Nucleus HK. Pardubice. s. 968. ISBN: 80-86225-50-X.
- Litzman, J., Kuklinek, P., Rybniček O. 2001. Alergologie a klinická imunologie. Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví v Brně. Brno. s. 144. ISBN: 80-7013—345-7.
- Liu, J., Guo Y. M., Hirokawa, M., Iwamoto, K., Ubukawa, K., Michishita, Y., Fujishima, N., Tagawa, H., Takahashi, N., Xiao, W., Yamashita, J., Ohteki, T., Sawada, K. 2012. A synthetic double-stranded RNA, poly I:C, induces a rapid apoptosis of human CD34(+) cells. *Experimental Hematology*. 40 (4). 330 – 341.
- Mačák, J., Mačáková, J. 2004. Patologie. Grada. Praha. s. 372. ISBN: 978-80-247-0785-3.
- Marabelle, A., Kohrt, H., Caux, Ch., Levy, R. 2014. Intratumoral immunization: a new paradigm for cancer therapy. *Clinical Cancer Research*. 20 (7). 1747 – 1756.
- Masáková, K. 2016. Nádorová imunoterapie založená na mechanizmech vrozené imunity a její optimalizace. Bakalářská práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. 48 s.
- Meyer, T., Surber, C., French, L. E., Stockfleth, E. 2013. Resiquimod, a topical drug for viral skin lesions and skin cancer. *Expert Opinion on Investigational Drugs*. 22 (1). 149 – 159.
- Overwijk, W. W., Restifo, N. P. 2001. B16 as a Mouse Model for Human Melanoma. *Current Protocols in Immunology*. 39:20.1.1–20.1.29.
- Owen, J., Punt, J., Stranford, S. 2013. *Kuby Immunology*. W. H. Freeman. p. 574. ISBN: 978-1464137846.
- Schulz, W. A. 2005. *Molecular biology of human cancer*. Springer. Dordrecht. p. 508. ISBN: 1-4020-3186-6.
- Švecová, I. 2013. Optimalizace imunoterapie melanomu založené na kotvení laminarinu na povrch nádorových buněk. Diplomová práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. 71 s.
- Takahashi, K., Ezekowitz, R. A. B. 2005. The role of the mannose-binding lectin in innate immunity. *Clinical Infectious Diseases*. 41 (7). 440 – 444.

- Takeda, K., Akira, S. 2005. Toll-like receptors in innate immunity. *International Immunology*. 17 (1). 1 – 14.
- Thompson, M. R., Kaminski, J. J., Kurt-Jones, E. A., Fitzgerald, K. A. 2011. Pattern recognition receptors and the innate immune response to viral infection. *Viruses Journal*. 3 (6). 920 – 940.
- Torres, M. P., Rachagani, S., Soucek, J. J., Mallya, K., Johansson S. L., Batra, S. K. 2013. Novel pancreatic cancer cell lines derived from genetically engineered mouse models of spontaneous pancreatic adenocarcinoma: applications in diagnosis and therapy. *PLOS ONE*. 8 (11). 1 – 12.
- Vogelstein, B., Lane, D., Levine, A. J. 2000. Surfing the p53 network. *Nature*. 408 (6810). 307 – 310.
- Weinberg, R. A. 2014. *The biology of cancer*. Garland Science Taylor & Francis Group. New York. p. 876. ISBN: 978-0-8153-4220-5.
- Whitworth, P. W., Pak, C. C., Esgro, J., Kleinerman, E. S., Fidler, I. J. 1990. Macrophages and cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*. 8 (4). 319 – 351.
- Yamamoto, Y., Harashima, A., Saito, H., Tsuneyama, K., Munesue, S., Motoyoshi, S., Han, D., Watanabe, T., Asano, M., Takasawa, S., Okamoto, H., Shimura, S., Karasawa, T., Yonekura, H., Yamamoto, H. 2011. Septic shock is associated with receptor for advanced glycation end products ligation of LPS. *The Journal of Immunology*. 186 (5). 3248 – 3257.
- Zechner, D., Bürtin, F., Amme, J., Lidner, T., Radecke, T., Hadlich, S., Kühn J. P., Vollmar, B. 2015. Characterization of novel carcinoma cell lines for the analysis of therapeutical strategies fighting pancreatic cancer. *Cell & Bioscience*. 5 (51). 1 – 10.