

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**

**Přírodovědecká fakulta**

**Studium propojení nádorové imunoterapie založené  
na ataku nádorových buněk buňkami vrozené  
imunity se zapojením získané imunity**

Bakalářská práce

Lea Tichá

Školitel: RNDr. Jan Ženka, CSc.

České Budějovice 2016

Tichá L., 2016: Studium propojení nádorové imunoterapie založené na ataku nádorových buněk buňkami vrozené imunity se zapojením získané imunity. [The study of linking of cancer immunotherapy based on attack of tumor cells by cells of innate immunity with acquired immunity. Bc. Thesis, in Czech.] – 65 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

**Annotation:**

The aim of this thesis was to study murine melanoma B16-F10 therapy based on activation of both innate immune system and acquired immunity. The practical part was designed as an optimization of the therapy based on combination of TLR signalling and activation of phagocytosis of cancer cells. Mechanisms of therapeutic cancer vaccines and the influence of the therapy on parallel untreated tumor were studied as well.

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

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

V Českých Budějovicích dne 14. prosince 2016

.....  
Lea Tichá

## **Poděkování**

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli, RNDr. Janu Ženkovi, CSc., za vedení této bakalářské práce, ochotu pomoci, cenné rady, velkou trpělivost a pozitivní a entusiastický přístup. Speciální poděkování mu patří za možnost podílet se na dlouhodobém, velmi zajímavém a smysluplném projektu, jemuž se věnuje.

Mé díky patří také rodině, především za morální podporu a přáteli a přátelům, kteří mě velmi podporovali v průběhu celého studia.

## Obsah

1. Úvod.....	1
1.1 Obecné vlastnosti nádorů.....	1
1.1.1 Nádorové bujení .....	1
1.1.1.1 Příčiny vzniku nádorového bujení .....	1
1.1.2 Biologie nádorových buněk.....	2
1.1.3 Třídění nádorů .....	2
1.1.4 Šíření nádoru v organismu.....	3
1.2 Maligní melanom (melanoblastom).....	4
1.2.1 Patogeneze melanomu .....	4
1.2.2 Klinické varianty maligního melanomu .....	4
1.2.3 Klinický obraz a diagnostika melanomu .....	5
1.2.4 Myší melanom B16-F10 studovaný v této práci .....	5
1.3 Onkologická léčba .....	6
1.3.1 Chemoterapie.....	6
1.3.2 Radioterapie (ozařování) .....	7
1.3.3 Chirurgická léčba.....	7
1.3.4 Hormonální terapie .....	8
1.3.5 Nádorová imunoterapie .....	8
1.3.5.1 Experimentální nádorové vakcíny a adjuvans nádorových vakcín.....	9
1.3.5.1.1 Bakteriální adjuvans.....	9
1.3.5.2 Adoptivní imunoterapie .....	10
1.4 Imunitní systém a principy jeho fungování .....	10
1.4.1 Specifická (získaná, adaptivní) imunita.....	10
1.4.1.1 T-lymfocyty .....	10
1.4.1.2 B-lymfocyty .....	11
1.4.2 Nespecifická (vrozená, přirozená) imunita.....	12
1.4.2.1 Polymorfonukleární leukocyty .....	12
1.4.2.2 Makrofágy.....	13
1.4.2.3 Dendritické buňky.....	13
1.4.2.4 NK buňky (Natural Killers) .....	14
1.4.2.5 Komplementový systém .....	14
1.4.2.6 Cytokiny.....	15
1.4.2.6.1 Klasifikace cytokinů dle funkce .....	15

1.5	Nádorová imunologie (Imunitní systém a nádorová onemocnění).....	17
1.5.1	Nádorové antigeny.....	17
1.5.2	Protinádorová imunitní odpověď.....	18
1.5.3	Způsoby úniku nádorů před imunitním systémem .....	19
1.6	Nádorová imunoterapie založená na stimulaci specifické imunity.....	21
1.7	Nádorová imunoterapie založená na stimulaci nespecifické imunity.....	21
1.7.1	Pathogen associated molecular patterns (PAMPs) .....	22
1.7.2	Pattern recognition receptors (PRRs) .....	22
1.7.2.1	Cytoplazmatické PRRs .....	23
1.7.2.2	Sekretované PRRs.....	24
1.7.2.3	Membránové PRRs .....	24
1.7.2.4	Toll-like receptory .....	25
1.8	Terapeutická protinádorová vakcinace .....	25
1.8.1	Profylaktické vakcíny .....	26
1.8.2	Terapeutické vakcíny.....	26
1.8.2.1	Vakcíny na bázi dendritických buněk.....	27
1.8.2.2	DNA vakcíny .....	27
1.8.2.3	Užití ligandů PRRs pro nádorovou imunoterapii .....	28
1.8.2.4	Intratumorální imunizace (in situ vakcinace) .....	28
1.9	Nádorová imunoterapie založená na kombinaci TLR ligandů a ligandů fagocytárních receptorů – studovaná v této práci .....	29
1.9.1	TLR agonisté využití v této práci .....	29
1.9.1.1	Resiquimod (R-848) .....	29
1.9.1.2	POLY I:C (polyinosinická-polycitidylická kyselina) .....	29
1.9.1.3	Listeria monocytogenes .....	30
1.9.2	Manan – ligand podporující fagocytózu.....	30
1.9.2.1	Látky užívané ke kotvení terapeutik na nádorové buňky.....	31
2.	Cíle práce.....	33
3.	Materiály a metody.....	34
3.1	Chemikálie .....	34
3.2	Laboratorní zvířata.....	34
3.3	Buněčná linie melanomu B16-F10 .....	35
3.4	Příprava buněk melanomu B16-F10 pro transplantaci .....	35
3.5	Transplantace buněk melanomu B16-F10 .....	35

3.6	Měření velikosti nádorů .....	35
3.7	Průměrná redukce nádorového růstu .....	36
3.8	Počítání plicních metastáz.....	36
3.9	Příprava terapeutik.....	36
3.9.1	Syntéza manan-SMCC .....	36
3.9.2	Příprava roztoků Resiquimodu (Resiquimod.HCl) .....	36
3.9.3	Příprava <i>Listeria monocytogenes</i> -SMCC (v 0,2 mM manan-SMCC).....	37
3.10	Statistické vyhodnocení dat .....	37
4.	Experimenty .....	38
4.1	Studium vlivu kotveného mananu ve spojení s R-848 a <i>Listeria monocytogenes</i> na růst terapeuticky ovlivňovaného i souběžného neléčeného melanomu .....	38
4.2	Vakcinace buňkami B16-F10 s navázaným mananem ve směsi s TLR agonisty....	39
5.	Výsledky.....	40
5.1	Studium vlivu kotveného mananu ve spojení s R-848 a <i>Listeria monocytogenes</i> na růst terapeuticky ovlivňovaného i souběžného neléčeného melanomu .....	40
5.2	Vakcinace buňkami B16-F10 s navázaným mananem ve směsi s TLR agonisty....	43
6.	Diskuze.....	46
7.	Závěrečný souhrn .....	49
8.	Seznam užitých zkratk.....	50
9.	Citovaná literatura .....	52

# 1. Úvod

Nádorové onemocnění neboli rakovina je různorodou skupinou chorobných stavů, které se vyznačují nekontrolovatelnou a relativně autonomní proliferací (dělením) buněk tkání a orgánů organismu. Tato onemocnění představují jednu z nejčastějších a nejzákeřnějších příčin úmrtí. I přes stále probíhající snahy o nalezení nových léčebných postupů, které by vedly ke snížení výskytu těchto onemocnění, doposud zůstává zásadním celosvětovým zdravotním problémem. Dosavadní terapeutické přístupy jsou pro svou nespecifičnost schopny nenávratně ničit a usmrtit i zdravé buňky organismu. Imunitní systém je vzhledem k přirozeným imunitním mechanismům, které aktivují protinádorovou imunitu a také schopnosti nasměrovat terapeutický zásah do místa nádoru, klíčový při léčbě nádorů. Právě proto je imunoterapie vhodnou volbou a možností pro nalezení vyhovující léčby.

## 1.1 Obecné vlastnosti nádorů

Nádorová onemocnění se u člověka mohou objevovat v každém věku, a to i u dětí. Vyšší riziko je však v dospělosti a ve stáří. Velmi časté jsou nádory tlustého střeva a konečníku, karcinomy plic. U žen převažují dále nádory prsu, vaječníků a děložního čípku a u mužů karcinomy žaludku a prostaty. V současnosti vlivem různých léčebných přístupů klesá úmrtnost a dochází k potlačení a vyléčení nádorů (Mačák a Mačáková, 2004).

### 1.1.1 Nádorové bujení

Nádorové bujení je velmi častou příčinou úmrtí člověka (Krejsek a Kopecký, 2004). Nádory lze definovat jako skupinu nemocí, jejichž společným znakem je neomezený a nekontrolovatelný růst buněk tkání (Vorlíček a kol., 2012). Proces nádorového bujení se tedy neřídí dle kontrolních mechanismů, které jinak řídí normální růst tkání (Mačák a Mačáková, 2004). V současnosti je proces nádorového bujení označován jako proces, který vede ke hromadění genetických poruch (Krejsek a Kopecký, 2004).

#### 1.1.1.1 Příčiny vzniku nádorového bujení

Příčiny vzniku nádorových onemocnění nejsou dosud známé, ale nejspíše mají komplexní povahu. Podstatou je buněčná proliferace, jež má své zákonitosti platící pro zdravé tkáně. Pro nádorové buňky ale tyto zákonitosti neplatí a zcela se jim vymykají, tímto unikají veškerým kontrolním mechanismům (Kubecová a kol., 2011).

Buněčná proliferace je zcela zásadní pro embryogenezi, růst organismu a správnou funkci buněk organismu. Pokud je proliferace nekontrolovaná, dochází ke vzniku a šíření nádorových buněk. Sled mutací vede k modifikaci genomu, a tím dochází ke vzniku neoplastických buněk. Proliferace těchto buněk vede k přeměně buněk a vzniku nádoru (Weinberg, 1989).

Mutace vedoucí ke změně normálního fenotypu na nádorový postihují především dva typy genů – protoonkogeny a supresorové geny (antionkogeny). Produkty těchto genů významně ovlivňují regulaci proliferace. Jsou to různé růstové faktory, které proliferaci stimulují, a to jsou produkty onkogenů a na druhé straně produkty supresorových genů (např. *protein p53*), které proliferaci tlumí (Kubecová a kol., 2011).

Oba typy genů také ovlivňují apoptózu (programovaná buněčná smrt). Onkogeny tlumí apoptózu, naproti tomu supresorové geny zvyšují míru apoptózy. Při aktivaci protoonkogeny nebo při inaktivaci supresorových genů dochází k nerovnováze mezi přírůstkem a zánikem buněk, což vyústí v nekontrolovatelnou proliferaci, a tím tedy v nádorový růst (Kubecová a kol., 2011).

Mutace supresorových genů mohou mít pravděpodobně souvislost s resistencí nádorových buněk k podávané léčbě (Wattel a kol., 1994).

### **1.1.2 Biologie nádorových buněk**

Hlavními rysy nádorových buněk jsou: neomezený replikační potenciál, soběstačnosti v podobě růstových signálů, necitlivost vůči růst utlumujícím signálům, neschopnost apoptózy (programovaná buněčná smrt), angiogeneze (proces novotvorby cév – krevního zásobení), invazivita (prorůstání do zdravých tkání) a metastazování (tvorba druhotných ložisek). Dostupné důkazy naznačují, že většina z nich je získaných, ať už přímo či nepřímo, prostřednictvím změn v genomu nádorových buněk (Hanahan a Weinberg, 2000).

### **1.1.3 Třídění nádorů**

Nádory lze roztrždit dle histogeneze (tkáňový původ) a biologických vlastností (Mačák a Mačáková, 2004). Podle histogeneze se nádory dělí na epitelové, mezenchymové, neuroektodermové, hematopoetické (leukemie a lymfomy), nádory smíšené a germinální a vzácné nádory ostatních tkání (choriokarcinom, mezoteliom) (Vorlíček a kol., 2012).



V souvislosti s biologickými vlastnostmi je možné rozlišit benigní, intermediární a maligní nádory (Mačák a Mačáková, 2004).

**Benigní (nezhoubné) nádory** zůstávají na místě svého vzniku. Rostou pomalu a poměrně expanzivně, vytlačují tedy okolní tkáň, ale výrazně ji nenarušují. Jsou to ohraničené útvary často kulovitého tvaru a s vazivovým opouzdřením, díky čemuž jsou snáze operativně odstranitelné (Rejthar a Vojtěšek, 2002). Vyvíjejí ale díky expanzi tlak na okolní struktury, proto mohou způsobovat bolest a krvácivé stavy, což je velmi rizikové především u nádorů centrální nervové soustavy (Rejthar a Vojtěšek, 2002).

**Intermediární nádory** jsou na rozhraní mezi benigními a maligními nádory. Mohou metastazovat, ale mají lepší prognózu než nádory maligní (Mačák a Mačáková, 2004).

**Maligní (zhoubné) nádory** jsou rychle, agresivně a invazivně (pronikají okolními strukturami) nebo infiltrativně (vrůstají mezi okolní buňky) rostoucí nádory (Rejthar a Vojtěšek, 2002). Tyto nádory velmi snadno vytvářejí metastázy (druhotná ložiska nádorových buněk) a je třeba začít s léčbou včas, jinak vedou ke smrti organismu (Vorlíček a kol., 2012).

#### 1.1.4 Šíření nádoru v organismu

Nádor se může šířit přímou cestou nebo metastazováním, tedy šířením do ostatních částí organismu. Děje se tak u maligních nádorů, z nichž každý nádor vykazuje různou schopnost metastazování (Petruželka a Konopásek, 2003).

Nádor se může šířit třemi základními způsoby:

- **Porogenní metastazování** – maligní buňky se pohybují volně v tělních dutinách, šíří se takto například karcinom vaječnicku v břišní dutině.
- **Hematogenní metastazování** – šíření krevním řečištěm, nádorové buňky jsou krví přeneseny na vzdálené místo, kde dochází k vytvoření druhotného ložiska, typickým příkladem je šíření karcinomu tlustého střeva do jater.
- **Metastazování lymfatickými cestami** – dochází k zakládání druhotných ložisek v lymfatických cestách nebo uzlinách, díky ústění lymfatických cest do krevního řečiště toto řečiště přechází v hematogenní šíření (Vorlíček a kol., 2012).

## 1.2 Maligní melanom (melanoblastom)

Melanom je maligní (zhoubný) nádor melanocytů, což jsou pigment produkující buňky neuroektodermového původu, které lze nalézt v celém těle (duhovka, sliznice gastrointestinálního traktu, konečník), ale především v kožní oblasti (Schadendorf a Hauschild, 2014).

### 1.2.1 Patogeneze melanomu

Maligní melanom je jedním z nejzhoubnějších nádorů s vysokým potenciálem metastazovat a stále se zvyšující incidencí (Pizinger, 2003). Kožní forma onemocnění je běžná v západním světě a způsobuje většinou (až v 75 %) úmrtí souvisejících s rakovinou kůže (Schadendorf a Hauschild, 2014).

Pravděpodobnost vzniku maligního melanomu závisí na genotypu, fenotypu a dalších rizikových faktorech, ovšem jediným v současnosti prokázaným, zato hlavním rizikovým faktorem, je sluneční záření (UV) (Langley a Sober, 1997; Fikrle a Pizinger, 2010).

Melanom je nádor rozšířený především u osob s bílou barvou kůže, a to díky vyššímu riziku rychlého spálení, zejména pokud nejsou pravidelně vytavovány UV záření. U ostatních ras je výskyt melanomu nižší (Roesch a Volkenandt, 2009). Nejvyšší incidence je u obyvatel Austrálie, Střední Evropy a Severní Ameriky (Rigel a Carucci, 2000). Reakce na UV záření však není u všech jedinců stejná a předem odhadnutelná (Nestle a Kerl, 2003).

### 1.2.2 Klinické varianty maligního melanomu

Existuje několik typů melanomu, které se odlišují dle místa výskytu a expanze takto:

- **Melanoma in situ** – spíše počínající vývojová fáze melanomu, melanocyty se nachází pouze v epidermis, léze nemá specifické klinické znaky ani se nevyvyšuje nad kožní povrch.
- **Lentigo maligna melanoma** – pomalu rostoucí nádor vyskytující se u nemocných vyššího věku, nachází se na obličeji a dalších místech vystavených slunečnímu záření, dochází k nestejně zbarvení a část léze se může vyvyšovat nad úroveň kožního povrchu.
- **Pvrchově se šířící melanom** – nejčastější varianta melanomu, projevuje se nestejně zbarveným ložiskem, zpočátku je hladkého povrchu, postupným růstem dochází k vyvyšování původní hladké léze nad úroveň okolního kožního povrchu.

- **Nodulární melanom** – druhá nejčastější varianta melanomu, rychle rostoucí nádor s horší prognózou.
- **Akrolentiginózní melanom** – liší se lokalizací, jelikož postihuje plosky nohou, dlaně a podnehtovou oblast, často dochází ke vzniku krvácivého vředu.
- Dalšími variantami jsou melanomy slizniční, oční amelanotické, desmoplastické – ty se vyskytují méně často.

Veškeré formy melanomu mohou metastazovat, a to v kůži, podkoží, lymfatických uzlinách a dalších vnitřních orgánech (Fikrle a Pizinger, 2010).

### 1.2.3 Klinický obraz a diagnostika melanomu

K vyhodnocení melanocytových projevů je používáno pravidlo ABCDE, zavedené již v roce 1985 (Krajsová, 2006), podle kterého jsou kontrolovány následující změny:

- **Asymmetry** – ložisko je nepravidelné, asymetrického tvaru.
- **Borderline** – okraje léze jsou nepravidelné, vyskytují se zářezy a výběžky.
- **Colour** – změna barvy ložiska, nestejně zbarvení ložiska – hnědé, černé, šedomodré, bílé.
- **Diameter** – dochází ke zvětšování průměru ložiska.
- **Evolving** – vývoj, celkové změny velikostí, okrajů, tvaru, barvy a povrchu (Krajsová, 2006; Vorlíček a kol., 2012).

Jako další projev se u nemocných s melanomem se může vyskytovat ztráta pigmentu, při které dojde na jiných částech těla k vymizení hnědého melaninového pigmentu v jiných částech těla. Tímto nálezem se zlepšuje prognóza onemocnění, jelikož se zvyšuje doba přežití (Pizinger, 2003).

Dále je možné provést dermatoskopii, která poskytne pohled na povrch i do hlubších vrstev podezřelé léze. Histopatologickým vyšetřením je pak stanovena konečná diagnóza. Obvykle se provádí také vyšetření spádových uzlin (Rigel a Carucci, 2000).

### 1.2.4 Myší melanom B16-F10 studovaný v této práci

Jsou známy čtyři buněčné linie myšího melanomu B 16 – B16-F0, -F1, -F10 a -BL6. Melanom B16-F0 je rodičovská buněčná linie a všechny linie pocházejí ze syngenního myšího kmene C57BL/6. Buněčné linie těchto melanomů jsou typické invazivitou a schopností tvorby plicních metastáz (Fidler, 1975). Tato schopnost se u myších melanomů

zvyšuje ve vzestupném číselném pořadí. Buněčné linie -F0 a -F1 tedy mají nižší potenciál tvorby metastáz a linie -F10 a BL6 jsou agresivnější a silně metastazují. Ke studiu a vývoji nádorových terapií je dnes velmi často využíván melanom B16-10 (Taniguchi a kol., 1986; Nakamura a kol., 2002). K našim účelům jsou využívány buňky myšího melanomu B16-F10. Melanom B16-F10 byl získán Fidlerovou metodou (Fidler, 1975) a buňky se velmi dobře kultivují a rostou (jejich mitotický cyklus trvá přibližně okolo 12 hodin) (Nakamura a kol., 2002).

### **1.3 Onkologická léčba**

Vzhledem k prudkému nárůstu nádorových onemocnění v minulém století došlo ve 2. polovině století k rozvoji medikamentózní léčby. Ještě dříve byla využívána především chemoterapie. Především v posledních několika letech je ale stále více rozvíjena imunoterapie a biologická léčba. Hojně používaná je také hormonální léčba.

Při terapii nádorů ovšem zůstávají využívané stále i základní léčebné postupy, kterými jsou chirurgické řešení, chemoterapie a radioterapie (Altaner, 2008).

Jednotlivé druhy protinádorové léčby lze rozdělit do dvou skupin. První z nich je lokální léčba, kam patří chirurgický zákrok a radioterapie. Druhou skupinou je systémová nádorová terapie, sem se řadí chemoterapie, imunoterapie, hormonální léčba a biologická terapie. Tyto druhy léčby jsou založeny na cílených lécích, které prokazatelně zlepšují symptomy nemoci a prodlužují život pacientů (Ženka, ústní sdělení).

#### **1.3.1 Chemoterapie**

K rozvoji chemoterapie došlo již v období po první světové válce, kdy byla jako bojový plyn použita látka s názvem bis(2-chlorethyl)sulfid, známější jako yperit. Síra byla poté nahrazena dusíkem, tím vznikl chloralkylamin neboli dusíkatý yperit. Brzy po tom byla nalezena jeho potenciální protinádorová účinnost spočívající ve schopnosti inhibovat proliferaci rychle rostoucích tkání (Kubecová a kol., 2011).

Chemoterapie je léčba prováděná pomocí velkých dávek cytostatik, tedy látek toxických pro buňky. Jsou to látky, které zastavují růst nádorového bujení zásahem do buněčného cyklu. Brání tak dalšímu dělení nádorových buněk, které se vyznačují právě výraznou proliferací. Hlavním předpokladem účinnosti tohoto postupu je vyšší citlivost nádorových buněk na toxické poškození než u zdravých buněk. To však neznamená, že by nemohly být zničeny i některé zdravé buňky (především rychleji se množící tkáň jako kostní dřev)

či vlasové folikuly). Cytostatika působí různými mechanismy a podáváním několika cytostatik, ať už současně či postupně, lze účinek chemoterapie zvýšit, a tím také snížit resistenci buněk na ně. Cytostatika mají samozřejmě i nežádoucí účinky, jelikož inhibují růst také nenádorových buněk a poškozují strukturu DNA (Hynie, 2001).

*„Chemoterapie se v léčbě nádorových onemocnění používá někdy jako metoda samostatná, často je však kombinována s ostatními léčebnými postupy (chirurgie, radioterapie, hormonoterapie). Vzhledem k náročnosti onkologické léčby a jejím vedlejším účinkům je podpůrná léčba nedílnou součástí správně provedené onkologické terapie.“* (Kubecová a kol., 2011).

### **1.3.2 Radioterapie (ozařování)**

Radioterapie je využití rentgenového záření jako standartního léčebného postupu, a to hlavně díky rychlému vývoji techniky využívané pro ozařování a zobrazovacích technologií (Bernier a kol., 2004). Při radioterapii se využívá ionizujícího záření. Do nádoru se dostává určitá dávka záření, která má za cíl omezit růst nádoru poškozením buněk iniciací volných radikálů (nepřímý účinek záření) či ho v některých případech i úplně zničit díky degradaci řetězců DNA (přímý účinek záření). Při tomto léčebném postupu by nemělo dojít k poškození zdravé tkáně. Kromě proliferujících buněk ovšem záření poškozuje i cévní pojivou tkáň. Takový účinek je žádoucí u nádorů, ale na zdravou tkáň to může mít nežádoucí vliv (Vorlíček a kol., 2012).

Spolu s chirurgickým odstraněním a chemoterapií, zůstává radioterapie velmi důležitou metodou používanou při léčbě rakoviny díky velké efektivitě. Z hlediska finančních nákladů tato metoda léčby jako jediná představuje přibližně pouze 5 % z celkových nákladů na onkologickou péči (Ringborg a kol., 2003; Baskar a kol., 2012).

### **1.3.3 Chirurgická léčba**

Chirurgie je základním typem léčby nádorů a hraje velmi zásadní roli v diagnostice, prevenci a terapii většiny nádorů. Profylaktické chirurgické výkonu, tedy úkony spíše preventivní povahy, se používají především u rizikových nezhoubných nádorů. Radikální (kurativní) chirurgický zákrok se volí v případě lokalizovaného nádoru, který nemetastazuje, tedy většinou v raném stadiu. Při operaci je nádor odstraněn s částí okolní tkáně a velmi často i se spádovými mízními uzlinami (lymfadenektomie) (Vorlíček a kol., 2012).

Chirurgická léčba má za cíl odstranit nádor i kmenové nádorové buňky, a to ještě před vznikem metastáz (druhotná ložiska nádorových buněk), které vznikají přesunem buněk do jiných částí těla. V případě výskytu druhotných ložisek je operativní léčba kombinována s chemoterapií a radioterapií (Altaner, 2008).

#### **1.3.4 Hormonální terapie**

Hormonoterapie je léčebný přístup využívající podobného principu jako biologická léčba, tedy přítomnosti specifického znaku, jež je přítomen na nádorové buňce. Tímto specifickým znakem je receptor, v tomto případě přirovnáván z hlediska funkčnosti k zámku, který interaguje se svým ligandem, který funguje jako klíč. Takovou to interakcí ligandu (hormonu či léčebné látky) s receptorem se rozbíhá kaskáda přenosu informací a konečným výsledkem takové interakce je proliferace nádorových buněk a růst nádoru (Kubecová a kol., 2011).

Podmínkou pro fungování této terapie je tedy přítomnost receptoru na nádorové buňce a základem její efektivity je obsazení, zaslepení receptoru či způsobení neexistence ligandu, který by receptor povzbuzoval. Z toho vyplývá, že hormonální terapii lze úspěšně využít pouze u nádorových buněk s prokázanou přítomností hormonálních receptorů (Kubecová a kol., 2011).

#### **1.3.5 Nádorová imunoterapie**

Nádorová imunoterapie se pokouší využít sílu a specifitu imunitního systému k léčbě nádorových onemocnění. Stimulace imunitního systému musí proběhnout na takové úrovni, aby byly efektové složky schopny zničit nádor a zároveň došlo ke kompletnímu vyléčení. Molekulární identifikace lidských nádorově specifických antigenů umožnila rozvoj antigenně specifické imunoterapie (Palucka a Banchereau, 2012).

V posledních letech se nádorová imunoterapie studuje v pokusech *in vivo* či *in vitro* a uplatňuje se také jako léčebný postup. Může být podávána samostatně (jako monoterapie) nebo společně s chemoterapií. Při tomto typu léčby dochází k podpoření přirozené imunitní obrany proti nádorům, a to zasažením do procesu tumorigeneze (vznik nádoru), pokud možno bez nežádoucích účinků na organismus (Králičková a kol., 2011).

Jedním z přístupů je odběr a rozmnožení autologních antigenně specifických T buněk *ex vivo* a následné podání pacientovi. Další možností je nádorová vakcinace, tedy podání

antigenu spolu s pomocnou látkou pro vyvolání odpovědi terapeutických T-buněk *in vivo* (Palucka a Banchereau, 2012).

Vzhledem ke svým vlastnostem jsou využívány dendritické buňky (DCs), které se řadí mezi antigen prezentující buňky a díky prezentaci antigenu CD8<sup>+</sup> T-lymfocytům dochází ke vzniku CTL (cytotoxické T-lymfocyty) (Palucka a Banchereau, 2012). Ty jsou schopny po infiltraci nádoru rozpoznat a zničit nádorové buňky. Po odběru kultur monocytů či CD34<sup>+</sup> HPCs (hematopoetic progenitor cells) jsou z nich získávány DCs, které jsou poté inkubovány s nádorovým antigenem. Vzniklá DCs vakcína je poté podána pacientovi (Banchereau a kol., 2001).

### **1.3.5.1 Experimentální nádorové vakcíny a adjuvans nádorových vakcín**

Užití nádorových vakcín, které vedou k tvorbě imunitní odpovědi specifické k nádorovým antigenům, je v posledním desetiletí velmi zkoumanou oblastí. Klinické studie se zaměřují na možnosti využití terapeutické nádorové vakcinace u pacientů s melanomem, lymfomy, mozkovými nádory, nádory prsu, žaludku, slinivky břišní, tlustého střeva a konečníku, ledvin a také nádorů vaječníků a prostaty. Vakcíny často obsahují nádorové antigeny nebo jejich fragmenty a také adjuvans (Fusek, 2012). K dosažení potřebného imunogenního účinku je třeba používat právě adjuvancia, což jsou látky pomáhající pohlčení antigenu antigen prezentujícími buňkami (APC) (Hořejší a kol., 2013). Takto nově připravené vakcíny, jež jsou založené na rozpoznání imunitních mechanismů, jsou účinnější, bezpečnější a použitelné u širšího spektra patogenů, kde doposud očkovací metody selhávaly. Vhodně upravené vakcíny obsahují například virové či bakteriální vektory jako jsou ptačí poxviry, adenoviry a BCG (Hořejší a kol., 2013).

#### **1.3.5.1.1 Bakteriální adjuvans**

Při léčbě karcinomu močového měchýře se využívá kmene *Bacillus Calmet-Guerin* (BCG). Terapeutické úspěchy byly zaznamenány i při podávání intratumorálních injekcí u několika dalších typů nádorových onemocnění, jakými jsou např. melanom (Morton a kol., 1974; Melvin a kol., 1974; Cohen a kol., 1978; Krown a kol., 1978) či karcinom hlavy a krku (Bier a kol., 1981). BCG lze využít jako monoterapii, tedy jako samostatnou formu léčby, nebo v kombinaci s chemoterapií (Grange a kol., 2008; Králíčková a kol., 2011).

### **1.3.5.2 *Adoptivní imunoterapie***

Adoptivní imunoterapie představuje vývoj nového, ale poměrně drahého, léku pro každého pacienta, a to díky reinfúzi pacientovi vlastních lymfocytů. Tyto lymfocyty byly po několik týdnů kultivovány se směsí cytokinů, což jsou menší signální proteiny, jež se účastní imunitní odpovědi. Každý nádor má specifickou sadu genomických změn a mutací, na které může být zacíleno. Kvůli tomuto zcela specifickému procesu tvorby léčiva ovšem není možné použití adoptivní imunoterapie jakožto univerzálního léku pro jakéhokoliv pacienta v populaci, ale pouze pro pacienta, jehož lymfocyty byly kultivovány (Perica a kol., 2015).

## **1.4 Imunitní systém a principy jeho fungování**

Imunitní systém zajišťuje homeostázu (stálost vnitřního prostředí) a jeho hlavní funkcí je bránit organismus před nebezpečím pocházejícím z vnějšího i vnitřního prostředí. Skládá se ze dvou typů obranných mechanismů – vrozené a získané imunity (Bartůňková a Vernerová, 2002). Díky identifikaci nebezpečných buněk založené na rozpoznávání nových antigenních struktur může dojít k likvidaci těchto nežádoucích složek (Jílek, 2005).

### **1.4.1 *Specifická (získaná, adaptivní) imunita***

K rozvoji specifické imunity došlo o něco později než u nespecifické imunity. Získaná imunita je antigenně specifická, reaguje na cizorodé částice pomocí specifických molekul – protilátek a k jejímu aktivování dochází po setkání s antigenem (látka navozující produkci protilátek). Tyto specifické reakce jsou uloženy do paměti a při příštím setkání s antigenem je imunita schopna zareagovat rychleji. Je schopna rozeznávat i velmi malé rozdíly mezi antigeny (Krejsek a Kopecký, 2004).

Získaná imunita zahrnuje buněčné mechanismy (T-lymfocyty) a humorální (látkové) mechanismy zprostředkované B-lymfocyty a založené na protilátkách. Pro správné fungování specifické imunity je důležitá spolupráce s vrozenou imunitou (Hořejší a kol., 2013).

#### **1.4.1.1 *T-lymfocyty***

T-lymfocyty jsou buňky bránící organismus proti nejrozličnějším infekcím a také proti nádorovému bujení. Dozrávají v thymu (brzlík), kam se dostávají jejich prekurzory z kostní dřeně, které putují do krve a poté do lymfatických cest a opět do krevního řečiště.



Takto putují, dokud nedojde k setkání s antigenem. T-lymfocyty jsou schopny antigen poznat pouze ve spojení s MHC molekulami (molekuly hlavního histokompatibilního komplexu). Po rozpoznání antigenu díky T-buněčnému receptoru (TCR) nacházejícímu se na povrchu T-lymfocytů, dochází ke klonální expanzi příslušných T-lymfocytů (Krejsek a Kopecký, 2004).

T-lymfocyty se dělí dle své funkce na subpopulace  $CD4^+$ , což jsou pomocné buňky ( $T_h$  buňky, tzv. helpery) a  $CD8^+$ , které fungují jako cytotoxické buňky ( $T_c$  buňky). Cytotoxické  $CD8^+$  lymfocyty interagují s MHC molekulami I. třídy a  $CD4^+$  lymfocyty rozpoznávají antigeny v komplexu s MHC molekulami II. třídy (Krejsek a Kopecký, 2004).

Subpopulace  $CD4^+$  se po setkání s antigenem dále dělí na subsety dle produkovaných cytokinů a funkce na  $T_h1$  buňky (sekrece prozánětlivých cytokinů  $IFN-\gamma$  a  $IL-2$ ) a  $T_h2$  buňky (sekrece cytokinů s protilátkovou odpovědí –  $IL-4$ ,  $IL-5$ ,  $IL-6$ ,  $IL-10$ ,  $IL-13$ ) (Mossman a kol., 1986). Tyto dva subsety svou produkcí cytokinů vzájemně ovlivňují rozvoj a aktivaci buněk jednotlivých subsetů.  $IFN-\gamma$  produkovaný  $T_h1$  buňkami řídí rozvoj dalších  $T_h1$  buněk a zároveň tlumí proliferaci  $T_h2$  buněk (Fitch a kol., 1993).  $IL-10$  produkovaný především  $T_h2$  buňkami blokuje aktivaci  $T_h1$  buněk (Fiorentino a kol., 1989).  $T_h3$  je subset T-lymfocytů produkujících  $TGF-\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ ) a  $IL-10$ , někdy jsou označovány jako regulační T-lymfocyty ( $T_{regs}$ ) (Krejsek a Kopecký, 2004). Dále existuje ještě subset buněk  $T_h17$ , které produkují  $IL-17$ , jehož funkcí je stimulace aktivace neutrofilních granulocytů. Produkují také  $IL-21$  aktivující přirozené zabíječe (NK buňky), čímž jsou zesíleny protizánětlivé účinky (Hořejší a Bartůňková, 2009).

#### **1.4.1.2 B-lymfocyty**

B-lymfocyty jsou základními buňkami specifické humorální imunity. Vznikají z progenitorových buněk přítomných v kostní dřeni a dochází k jejich přesunu a nahromadění v lymfatických tkáních. Po dozrání je na jejich povrchu přítomen BCR (B-buněčný receptor), tedy receptor pro antigen. Pro aktivaci B-lymfocytů a tvorbu protilátek je důležitá spolupráce s T-lymfocyty, a to prostřednictvím pomocných signálů  $T_h2$  T-lymfocytů (Krejsek a Kopecký, 2004).

Diferencované B-lymfocyty jsou hromaděny v lymfatických orgánech, zatímco naivní B-lymfocyty cirkulují, dokud nedojde k jejich setkání s antigenem (Krejsek a Kopecký, 2004).

## **1.4.2 Nespecifická (vrozená, přirozená) imunita**

Hlavními složkami přirozené imunity jsou komplementový systém, NK buňky a fagocytární buňky jako jsou makrofágy a neutrofilové. Schopnost fagocytózy představuje pohlcování, ničení a rozklad mikroorganismů díky membránovým receptorům, které rozpoznávají nebezpečí (Krejsek a Kopecký, 2004).

Fagocytující buňky představují důležitou buněčnou složku nespecifické imunity. Patří mezi ně makrofágy, polymorfonukleární (kromě basofilních granulocytů) a dendritické buňky (DCs), které jsou antigen prezentujícími buňkami (APC). Humorální složky přirozené imunity zahrnují komplement, interferony a další sérové proteiny (Hořejší a Bartůňková, 2009).

Fagocytóza je kompletní proces rozeznávání a pohlcení cizorodých částic rozpoznávaných pomocí receptorů. Chemotaktické faktory uvolňující se z místa zánětu přímo ovlivňují a směřují pohyb fagocytárních buněk (Hořejší a Bartůňková, 2009).

### **1.4.2.1 Polymorfonukleární leukocyty**

Granulocyty neboli polymorfonukleární leukocyty se dělí na neutrofilní, eosinofilní a basofilní granulocyty, z nichž pouze neutrofilové a eosinofily jsou schopny fagocytovat. Obsahují biologicky aktivní látky uvolňující se při imunitních reakcích (Krejsek a Kopecký, 2004).

Nejpočetnější a nejvýznamnější skupinou polymorfonukleárních leukocytů jsou neutrofilní granulocyty (Krejsek a Kopecký, 2004). Na místo zánětu jsou obvykle z leukocytů vyslány jako první a jsou schopny eliminovat mikroorganismy několika mechanismy. Data z několika experimentálních i klinických výzkumů prokazují, že výskyt neutrofilů v místě poranění či infekce je zásadní pro odstranění zánětlivých procesů. Nedávné výzkumy také ukazují a nadále zkoumají mnohem širší pole působnosti neutrofilů (Kolaczowska a Kubes, 2013). Neutrofilové jsou považovány za buňky s krátkým poločasem rozpadu, jelikož při cirkulaci přežívají kolem 5 dnů a po aktivaci přežívají už jen v řádech hodin (Pillay a kol., 2010; Kolaczowska a Kubes, 2013). Kromě pohlcování mikroorganismů produkují například také prozánětlivé cytokiny TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ ), IL-1 $\alpha$  i  $\beta$ , IL-12. Nespecifické granulocytární působení však může působit i jisté poškození vlastních struktur (Krejsek a Kopecký, 2004).

### **1.4.2.2 Makrofágy**

Makrofágy se vyskytují ve všech orgánech, tudíž je u nich velká pravděpodobnost setkání s antigenem. V kostní dřeni jsou z myeloidních prekurzorů diferencovány monocyty, které jsou poté vyplaveny do krve, kde cirkulují. Později putují do tkání a mění se na tkáňové makrofágy nesoucí molekulu CD68. Mají také funkci antigen prezentujících buněk a prezentují tak antigeny fagocytovaných částic v komplexu s molekulami MHC I. či II. třídy T-lymfocytům. Navazují tak spojení mezi specifickou a nespecifickou imunitou (Krejsek a Kopecký, 2004).

Makrofágy také produkují některé cytokiny, jimiž jsou například IL-1 $\alpha$  i  $\beta$ , IL-3, TNF, IL-6, IL-8 a IL-12 (Hořejší a Bartůňková, 2009).

V průběhu progresu nádorů dochází k jejich infiltraci makrofágy. Na základě funkce jsou makrofágy rozdělovány do dvou kategorií na klasické M1 makrofágy a alternativní M2 makrofágy. M1 makrofágy se podílejí na zánětlivých procesech, odstraňování patogenů a protinádorové imunitě. Naproti tomu M2 makrofágy ovlivňují protizánětlivou odezvu, reparační procesy jako je hojení ran a v neposlední řadě mají i pronádorový charakter, kterým podporují růst nádoru produkcí VEGF (vascular endothelial growth factor) a TGF- $\beta$  (Chanmee a kol., 2014; Bajčiová a kol., 2015).

Makrofágy asociované s nádory – TAM (tumor associated macrophages) se podobají M2 makrofágům, a tudíž klinické studie prokazují, že TAM vytvářejí příznivé mikroprostředí pro rozvoj a šíření nádoru (Chanmee a kol., 2014). TAM podporují růst vlastního nádoru expresí růstových faktorů, čímž dochází k podpoře novotvorby cév a potlačení získané imunity. Velké množství produktů uvolňovaných do nádorových buněk stimuluje jejich růst a šíření, a tím i tvorbu metastáz (Sica a kol., 2008).

### **1.4.2.3 Dendritické buňky**

Dendritické buňky (DCs) hrají velmi důležitou úlohu v kontrolování imunitních reakcí a toleranci antigenů tělu vlastních. Hlavními skupinami jsou myeloidní a plazmocytoidní DCs (Banchereau a kol., 2009, Ueno a kol., 2011). Dendritické buňky a makrofágy fungují jako antigen prezentující buňky (Hořejší a Bartůňková, 2009).

Plazmocytoidní DCs jsou charakteristické expresí Toll-like receptorů TLR7 a TLR9, pomocí nichž identifikují nukleové kyseliny patogenů, především virového původu. Produkují také významné množství interferonů (IFN) jako reakci na virové infekce (Kaisho, 2010). Myeloidní DCs se dělí dle svého umístění v těle na DCs v periferních tkáních, DCs

v lymfoidních orgánech a DCs v krvi. Jejich hlavní funkcí je rozpoznávání, pohlcení a prezentace antigenů mikrobů (Klechevsky a kol., 2009).

Díky širokému využití jsou DCs využívány v imunoterapeutických studiích, a to již od roku 1996 (Hsu a kol., 1996).

#### **1.4.2.4 NK buňky (*Natural Killers*)**

NK buňky (přirození zabíječi) jsou lymfocyty patřící do systému nespecifické imunity, které se neřadí k B- ani k T-lymfocytům. Jejich hlavním úkolem je cytotoxická likvidace buněk infikovaných virem nebo nádorově změněných buněk (Medzhitov, 2007).

NK buňky rozeznávají buňky, které neexprimují vlastní molekuly tkáňové slučitelnosti (MHC molekuly). Pro tyto buňky existují na NK buňkách receptory tlumící buněčné funkce (Bartůňková a kol., 2011). NK buňky se pomocí membránových receptorů navazují na ligandy cílových buněk a vyhodnotí, zda mají být zničeny (Krejsek a Kopecký, 2004).

Po rozpoznání buňky nesoucí na svém povrchu vlastní MHC se NK buňky neaktivují. Pokud MHC na buňce není, dojde k aktivaci NK buněk a z cytoplazmy jsou uvolněna granula s perforiny, které buňku proděraví a je umožněn i průnik enzymů kaspáz, čímž je spuštěna apoptóza. Pro NK buňky je charakteristická molekula CD56 a také molekula CD16 (Bartůňková a kol., 2011).

Aktivita NK buněk také vyvolává produkci interferonů typu I, a to buď přímo či nepřímo prostřednictvím exprese IL-15. Interferony typu I stimulují NK buňky a zvyšují expresi MHC I molekul, a tím i prezentaci antigenů cytotoxickým T-lymfocytům. IL-15 zodpovídá za proliferaci a diferenciaci jak NK buněk, tak i cytotoxických lymfocytů, čímž se výrazně uplatňuje v protinádorové imunitě (Ma a kol., 2006).

#### **1.4.2.5 Komplementový systém**

Komplement je látková část vrozené imunity a funguje jako enzymatická kaskáda, která vede k likvidaci patogenů (Ramm a kol., 1982). Je to systém přibližně 30 plazmatických bílkovin, které jsou produkovány jaterními buňkami a z části také makrofágy. Devět základních složek (C1 – C9) v reakci na podněty aktivuje jednotlivé složky, dochází tak ke kaskádovité aktivaci (Bartůňková a kol., 2011). Mezi hlavní funkce komplementového systému patří opsonizace (C3b), chemotaxe (C3a, C5a) a osmotická lýza (komplex C5b – C9) (Hořejší a kol., 2013).

Složky komplementu jsou přítomné v neaktivní podobě a aktivují se třemi různými způsoby (Bartůňková a kol., 2011). Klasickou cestou je aktivace vazbou složky C1 na komplex antigen – protilátka. K aktivaci složky C1 sérovým lektinem vázajícím manósu (MBL) dochází při druhém způsobu – lektinové cestě. Třetí cesta, nazývaná jako alternativní, je vyvolána kontaktem složky C3 s patogenním povrchem, například enzymy uvolněnými z poškozených tkání (Hořejší a Bartůňková, 2009).

#### 1.4.2.6 Cytokiny

Cytokiny jsou základními regulátory imunitního systému. Jsou to především proteiny sekretované leukocyty a jinými buňkami působící prostřednictvím specifických receptorů, dále to mohou být membránové formy, jež jsou zakotvené v cytoplazmatické membráně hydrofobní sekvencí aminokyselin. Mezi membránové cytokiny patří též významné kostimulační molekuly CD80, CD86, CD40L a také FasL (Hořejší a kol., 2013).

Obecně jsou cytokiny označovány jako látky polypeptidové povahy, mezi něž se řadí interleukiny (IL-1 – IL-38), chemokiny (IL-8 a řada příbuzných molekul s chemotaktickou aktivitou), lymfokiny, interferony (IFN- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$  – složky antivirových mechanismů), růstové faktory (TGF – transformující růstové faktory; faktory stimulující kolonie; hematopoetické růstové faktory) a smrtící ligandy (Hořejší a kol., 2013; Klener a Klener jr., 2013).

##### 1.4.2.6.1 Klasifikace cytokinů dle funkce

V následujícím přehledu jsou uvedeny některé skupiny cytokinů, a to dle své funkce.

- **Prozánětlivé cytokiny:** TNF, IL-6, IL-1 $\alpha$  i  $\beta$ , IL-8, IL-12, IL-18, IL-19, IL-22, IL-33, IL-36, MIF
- **Protizánětlivé cytokiny:** IL-1Ra, IL-4, IL-10, IL-25, IL-32, IL-35, IL-37, IL-38, TGF- $\beta$
- **Cytokiny s aktivitou růstových faktorů hematopoetických buněk:** IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-11, IL-14, IL-15, IL-21, IL-34, CD70, GM-CSF, erythropoetin
- **Cytokiny uplatňující se v buněčné složce imunity (T<sub>h</sub>1):** IL-1, IL-2, IL-12, IL-15, IL-16, IL-23, IL-27, IL-31, CD70, IFN - $\gamma$ , GM-CSF, TNF
- **Cytokiny uplatňující se v humorální (látkové) imunitě (T<sub>h</sub>2):** IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13, IL-21, CD40L, TGF- $\beta$

- **Cytokiny s antivirovým účinkem:** IL-28, IL-29, IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN - $\gamma$  (Hořejší a kol., 2013).

K jednotlivým funkčním skupinám je uvedeno několik zástupců cytokinů.

- **GM-CSF** (granulocyte-macrophage colony stimulating factor):

GM-CSF je růstový faktor, jenž byl nejprve objeven jako induktor diferenciaci a proliferace granulocytů a makrofágů. GM-CSF se podílí na široké škále biologických procesů, jež jsou součástí vrozené i získané imunity a jeho produkce je spojena s reakcí na signály oznamující nebezpečí (Wicks a Roberts, 2015).

- **IFN- $\gamma$**  (interferon gamma):

IFN- $\gamma$  má zásadní význam v boji proti patogenům a nádorům. Je produkován především NK buňkami a NK T-lymfocyty (NKT buňky), jakožto součást odpovědi vrozené imunity a T<sub>h</sub>1 buňkami, jakmile se rozvine antigenně specifická imunita (Schoenborn a Wilson, 2007).

- **IL-2** (interleukin 2):

IL-2 vzniká v T-lymfocytech po setkání s antigenem a stimuluje proliferaci antigen specifických T-lymfocytů. Také podporuje sekreci dalších cytokinů T-lymfocyty (např. IFN- $\gamma$ ) a aktivitu NK buněk (Liao a kol., 2013; Klener a Klener jr., 2013).

- **IL-12** (interleukin 12):

IL-12 je klíčovým regulátorem imunitních reakcí zacílených proti intracelulárním patogenům. Tvoří spojení mezi vrozenou a získanou imunitou (Trinchieri, 2003). Zdrojem IL-12 jsou především makrofágy a dendritické buňky. Mezi jeho funkce patří také stimulace aktivace NK buněk, podpora produkce IFN- $\gamma$  aktivovanými T-lymfocyty a NK buňkami. IL-12 je velmi často využíván jako imunomodulátor v nádorové imunoterapii díky antiangiogenním účinkům, tedy tlumení novotvorby cév v nádoru (Klener a Klener jr., 2013).

- **TGF- $\beta$**  (transforming growth factor):

Transformující růstový faktor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) je zásadní pro udržení stálosti vnitřního prostředí epiteliálních, endoteliálních a hematopoetických buněk (Connolly a kol., 2012). Je produkován několika druhy buněk a zastává velké množství funkcí. Mezi tyto funkce patří regulace proliferace buněk,

a to zabráněním růstu buněk a aktivací programované buněčné smrti buněk. Tím dochází k celkovému ovlivnění reakcí imunitního systému (Kehrl, 1991; Connolly a kol., 2012).

Při procesu vzniku nádoru své chování TGF- $\beta$  mění dle fáze vývoje nádoru. Na počátku potlačuje jeho vznik, později se přeměňuje na podpůrce vzniku nádorového onemocnění. Současně potlačuje reakce vrozené i získané imunity (Muraoka a kol., 2002).

## **1.5 Nádorová imunologie (Imunitní systém a nádorová onemocnění)**

Imunitní systém hraje zásadní roli i v boji s nádorovým onemocněním. Imunologický dohled (tumor immune-surveillance) je předpoklad, že jednou ze zásadních rolí imunitního systému je likvidace transformovaných buněk ještě před únikem těchto buněk imunitnímu systému a vytvořením shluků nádorových buněk či metastáz (Klener a Klener jr., 2013).

Rozdíly mezi nádorovými buňkami a zdravými buňkami, z nichž ty nádorové vznikly, mohou být větší či menší. Imunitní mechanismy by je měly rozpoznat a zlikvidovat. Někdy jsou rozdíly tak malé, že imunitní systém není schopen na nádorové buňky účinně zacílit, nebo jsou imunitní reakce pozastaveny mechanismy, kterými nádorové buňky před reakcí imunitního systému uniknou (Hořejší a Bartůňková, 2009). K rozpoznání nádorových buněk mohou sloužit antigeny nádorových buněk, které jsou rozeznány imunitním systémem jako cizí. Rozdíly ale nejsou natolik velké, proto je mnohdy imunitní systém nerozezná (Hořejší a Bartůňková, 2009).

Zásadním pokrokem v oblasti využití imunitního systému jako účinného nástroje v boji s nádorovým onemocněním se stalo objevení schopnosti vrozené imunity identifikovat a zničit nádorové buňky. Profesor Cui prováděl pokusy na myších BALB/c s transplantovaným sarkomem S-180. U jedné takové myši byla objevena mutace SR/CR, jež zapříčinila vyléčení myši. Vznikl tak kmen se schopností spontánní regrese nádorových buněk (SR) nebo úplnou rezistencí vůči transplantování nádorů (CR). Tento objev poukázal na schopnost vrozené imunity nalézt a zlikvidovat nádorové buňky (Cui a kol., 2003).

### **1.5.1 Nádorové antigeny**

Nádorové buňky jsou výsledkem procesu přeměny zdravých buněk a tělu vlastních buněk na nádorové. Na svém povrchu buňky vylučují antigeny, které mohou být imunitním systémem označeny jako cizí (Klener a Klener jr., 2010). Imunitní systém může na nádorové

buňky zareagovat prostřednictvím antigenů dvěma způsoby, a to dle druhu nádorových antigenů (Graziano a Finn, 2005).

Těmito druhy antigenů jsou: tumor specifické antigeny – TSA (tumor-specific antigens) a tumor asociované antigeny – TAA (tumor-associated antigens) (Klener a Klener jr., 2010).

#### □ **Tumor specifické antigeny (TSA)**

TSA se nacházejí pouze na nádorových buňkách a na normálních buňkách se tím pádem nevyskytují. Vznikají procesem přeměny zdravých buněk na nádorové buňky, který je způsoben genovými mutacemi. Mezi TSA patří peptidy schopné navození imunitní reakce (imunogenní peptidy) mutacemi pozměněných onkoproteinů, nebo tumor-supresorových buněk (např. *BCR-ABL*, *RAS*, *protein p53*) a dále virové proteiny onkogenních DNA virů (EBV – Epstein-Baarové virus; HPV – lidský papilomavirus). Velmi často se také jedná o proteiny mutovaných genů, které v procesu přeměny nádorové buňky nehrají žádnou roli, ale vznikají zcela náhodným způsobem jako vedlejší produkty genomické nestability nádorových buněk (Klener a Klener jr., 2013).

#### □ **Tumor asociované antigeny (TAA)**

TAA se nacházejí na nádorových i na normálních buňkách, ale u nádorové populace jsou výrazně produkovány. Zvýšení produkce daného antigenu v nádorové populaci může vyvolat imunitní odpověď. Mezi TAA patří např. *MAGE (melanoma antigen genes)*, které se nacházejí pouze ve tkáních varlat, u melanomu ale dochází k jejich mohutné epxresi. Dále TAA zahrnují onkofetální antigeny produkované pouze v určitém stadiu embryonálního vývoje. Mezi onkofetální antigeny patří např. *CD66/CEA (carcinoembryonic antigen)* a *AFP* neboli  *$\alpha$ -fetoprotein* (Klener a Klener jr., 2013).

Především onkofetální antigeny jsou využívány v diagnostice jako nádorové markery – laboratorně prokazatelné látky vylučované nádorovými buňkami (Wepsic, 1983).

### **1.5.2 Protinádorová imunitní odpověď**

Základem protinádorové imunity jsou T-lymfocyty, především CTL (cytotoxické lymfocyty), antigen prezentující buňky (APC), z nichž hlavně dendritické buňky (DCs) a NK buňky (přirození zabíječi). Antigen prezentující buňky nesou toll-like receptory (TLR), jejichž funkcí je rozeznávat molekulární struktury nejružnějších patogenních



mikroorganismů (PAMPs neboli pathogen-associated molecular patterns). Rozpoznávají i molekulární signály spojené s poškozením organismu (DAMPs neboli damage-associated molecular patterns) (Chow a kol., 2012).

Nádor produkuje cytokiny a chemokiny, jež přitahují buňky imunitního systému do míst, kde sídlí nádorové buňky a do blízko ležících lymfatických uzlin. Přitahují právě i APC, které pak pohlcují a zpracovávají DAMPs a antigeny nádorem produkované. Daná interakce, která je zároveň doprovázená kostimulačními signály díky receptoru CD40 a různým cytokinům, vede k aktivaci a dozrávání APC, které na svém povrchu prezentují antigeny patogenů a nádorů. Prezentovány jsou peptidy antigenů odvozené z molekul TA (tumor antigens) a jsou prezentovány přes molekuly hlavního histokompatibilního komplexu (MHC). Vzniklý komplex mezi peptidem endogenního antigenu a molekulou MHC I. třídy je rozeznáván na povrchu T-lymfocytů, ze kterých se postupně vyvíjí CD8<sup>+</sup> cytotoxické T-lymfocyty (CTL). Peptid exogenního antigenu se váže na molekuly MHC II. třídy a ty zase stimulují CD4<sup>+</sup> T-lymfocyty (Borghaei a kol., 2009; Whiteside, 2010).

Vytvořené CTL se krevním řečištěm dostávají do tkání, ve kterých růst nádorů a poškození tkání vyvolal zánět. Pomocí TCR (T-buněčný receptor) a pomocných molekul rozpoznají komplex MHC a peptidu na povrchu nádorové buňky a dochází k aktivaci cytotoxických mechanismů a následnému zničení identifikovaných buněk (Cullen a Martin, 2008; Pardo a kol., 2008).

### **1.5.3 Způsoby úniku nádorů před imunitním systémem**

Nádorové buňky se liší způsoby, kterými unikají imunitním mechanismům, a to dle typu nádorových buněk, avšak velké množství únikových mechanismů se shoduje s mechanismy infekčních mikroorganismů. Tyto mechanismy pracují tak, že vytvoří tolerogenní prostředí, které stimuluje mechanismy tolerance nádorových buněk. Ty pak nejsou správně identifikovány a nemohou být zničeny. Mezi nejdůležitější mechanismy patří např. vysoká variabilita nádorových buněk, nízká hustota exprese MHC I molekul, produkce faktorů inaktivujících T-lymfocyty a jiných blokujících faktorů (Hořejší a kol., 2013).

#### **□ Variabilita**

Variabilita nádorových buněk je jedním ze způsobů vyhnutí se zásahu imunitní obrany. Dochází tak např. ke vzniku mutantních forem, které již nemají nádorový antigen (Hořejší a kol., 2013).

#### □ **Snížená exprese MHC I molekul**

Snížená hustota exprese nádorových antigenů může vést k ignoraci imunitním systémem. K tomu dochází snížením citlivosti k IFN- $\gamma$ , jež zvyšuje právě expresi MHC I, nebo se tak děje mutací, při které dochází ke ztrátě alely MHC I, která prezentuje nádorový antigen (Hořejší a kol., 2013). Pokud je exprimováno jen malé množství MHC I, CTL buňky nemají šanci přítomnost MHC I zaznamenat (Reiniš, 2010). Toto pro CTL malé množství MHC I molekul jsou schopny odhalit NK buňky, které rozpoznávají i buňky, jež mají na svém povrchu velmi málo MHC gp I molekul. NK buňky tudíž nádorové buňky považují za tělu vlastní (Hořejší a kol., 2013).

#### □ **Produkce faktorů inaktivujících T-lymfocyty a další blokuující faktory**

Některé nádory mohou potlačovat imunitu produkcí faktorů inaktivujících T-lymfocyty či pomocí jiných blokuujících faktorů. Mezi tyto faktory patří rozpustné formy nádorových antigenů odvržené z povrchu či cytokiny s tlumícím účinkem, např. TGF- $\beta$  (Transforming growth factor  $\beta$ ) a IL-10 (Hořejší a kol., 2013). Právě díky produkci TGF- $\beta$  dochází ke vzniku T-regulačních lymfocytů ( $T_{regs}$ ) z  $CD4^+$  buněk (Fu a kol., 2004).

$T_{regs}$  díky TGF- $\beta$  potlačují CTL buňky, díky čemuž nádorové buňky unikají imunitnímu systému. Navíc  $T_{regs}$  vylučují TGF- $\beta$ , čímž dále autokrinně podporují svůj vlastní vznik.  $T_{regs}$  taktéž produkují IL-10 (interleukin 10), který je zodpovědný za toleranci nádorových buněk (Facciabene a kol., 2012). Dále IL-10 a TGF- $\beta$  tlumí zrání DCs (Hořejší a kol., 2013).

#### □ **Fas ligand**

Fas ligand (FasL) je transmembránový protein podobný cytokinům skupiny TNF, exprimovaný na povrchu různých transformovaných buněčných linií. FasL se váže na Fas receptor (CD95), který se vyskytuje na povrchu mnoha typů buněk, včetně buněk imunitního systému (Yonehara a kol., 1989; Itoh a kol., 1991; Owen-Schaub a kol., 1992).

Signály přenášejí se přes Fas receptor do buňky, aktivují reakce vedoucí k programované buněčné smrti cílové buňky (O'Connell a kol., 1999).

Fas ligand i Fas receptor se nachází také na povrchu T-lymfocytů. T-lymfocyty jsou tedy schopné sebedestrukce tím, že na povrchu téže buňky se FasL naváže na Fas receptor, a tím dojde k aktivaci programované buněčné smrti (Hořejší a kol., 2013). Přítomnosti Fas ligandu a Fas receptoru na povrchu T-lymfocytů využívají nádorové

buňky, které sníží expresi Fas receptoru, aby unikly lymfocytům, jež na svém povrchu mají Fas ligand a zároveň zvýší expresi Fas ligandu. Tím nádorové buňky nalákají T-lymfocyty do pasti, jelikož T-lymfocyty se naváží na ligandy nádorových buněk, čímž je zahájena aktivace programované buněčné smrti T-lymfocytů (O'Connell a kol., 1999).

## **1.6 Nádorová imunoterapie založená na stimulaci specifické imunity**

Cílem nádorové imunoterapie je využití specifičnosti imunitního systému, díky níž lze nalézt účinnější a méně toxické formy léčby ve srovnání s běžně užívanými terapiemi (Gray a kol., 2006).

Jedním z využívaných přístupů je pasivní imunoterapie, tedy založení imunoterapie na specifické imunitě pomocí monoklonálních protilátek (Bajčiová a kol., 2015). Monoklonální protilátky (mAbs) jsou používány pro zvýšení přirozeně slabé protinádorové imunitní odpovědi až na terapeutickou úroveň. Takové agonistické nebo antagonistické monoklonální protilátky se váží na klíčové systémy imunitního systému, které zvyšují prezentaci antigenů a buněčnou cytotoxicitu (Gray a kol., 2006).

Monoklonální protilátka je složena ze dvou identických částí Fab ( $F(ab)_2$ ), které slouží k vazbě nádorového antigenu a jednoho fragmentu Fc zprostředkovávajícího vazbu a aktivaci buněk imunitního systému jako jsou makrofágy, NK buňky, cytotoxické T-lymfocyty. Navázání protilátky na nádorový antigen směřuje pomocné buňky do místa, kde sídlí nádor, a tím dochází k velkému nárůstu fagocytózy a indukce programované buněčné smrti nádorových buněk cytotoxickými látkami, které jsou sekretovány cytotoxickými T-lymfocyty a NK buňkami (Klener a Klener jr., 2013). Takto je aktivována buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách (ADCC) (Seidel a kol., 2013). Dalším podobným mechanismem monoklonálních protilátek je cytotoxicita závislá na komplementu (CDC) (Klener a Klener jr., 2013).

## **1.7 Nádorová imunoterapie založená na stimulaci nespecifické imunity**

Nespecifická imunita je evolučně konzervována a předávána do další generací prostřednictvím lidského genomu (Bajčiová a kol., 2015).

Imunitní odpověď organismu lze zvýšit nespecifickou stimulací imunitního systému látkami vyvolávajícími zánětlivou odpověď, nebo látkami vedoucími k polyklonální aktivaci lymfocytů (Klener a Klener jr., 2013). Mezi látky vyvolávající zánětlivou odpověď patří například PAMPs (pathogen associated molecular patterns).

### **1.7.1 Pathogen associated molecular patterns (PAMPs)**

Složka vrozené imunity je i v nespočetném množství podnětů z vnějšího a vnitřního prostředí schopna identifikace mikrobiálních signálů nebezpečí (Bajčiová a kol., 2015).

Fagocyty jsou schopné rozeznat struktury nacházející se na povrchu patogenních mikroorganismů. Tyto struktury jsou nezbytné pro život těchto mikroorganismů a jsou označovány jako pathogen associated molecular patterns (PAMPs). Pro tyto charakteristické mikrobiální či apoptotické struktury jsou na fagocytech přítomny různé druhy receptorů označované jako pattern recognition receptors (PRRs). Tyto komponenty jsou rozpoznávány také látkovými složkami nespecifické imunity (např. komplementem) (Hořejší a kol., 2013).

Rozpoznání PAMPs podle PRRs velmi rychle spouští celou řadu antimikrobiálních imunitních odezev, a to indukci různých zánětlivých cytokinů, chemokinů a interferonů typu I. Tyto odpovědi rovněž iniciují rozvoj patogenně specifické a dlouhotrvající získané imunity pomocí B- a T-lymfocytů. Je známo, že několik tříd PRRs hraje zcela klíčovou roli v obraně imunitního systému napadeného organismu (Kumar a kol., 2011).

Příkladem PAMPs mohou být endotoxiny (lipopolysacharidy) gramnegativních bakterií, peptidoglykany charakteristické pro grampozitivní bakterie, glukany a manany typické pro kvasinky a plísňe (Hořejší a kol., 2013).

### **1.7.2 Pattern recognition receptors (PRRs)**

Pattern recognition receptors (PRRs) jsou neustále se rozrůstající skupinou receptorů, které rozpoznávají PAMPs jako jsou molekuly bakteriální stěny bakterií nebo DNA virů a DAMPs uvolňující se po smrti buňky, ve stresových situacích nebo při poranění tkáně (Marabelle a kol., 2014).

Všechny PRRs mohou odhalit přítomnost a typ mikrobiální infekce a aktivovat vhodnou odpověď vrozené imunity, která hraje zásadní roli v první linii obrany, dokud nedojde k zapojení získané imunity a získání specifické odpovědi (Akira a kol., 2006; Palm a Medzhitov, 2009). Přehled nejvýznamnějších PRRs je zaznamenán v tabulce (Tab. I).

**Tab. I:** Přehled PRRs, včetně jejich lokalizace a příslušných ligandů (převzato z Takeuchi a Akira, 2010).

<b>PRRs</b>	<b>Lokalizace</b>	<b>Ligand</b>	<b>Původ ligandu</b>
<b>TLR</b>			
TLR1	Plazmatická membrána	Triacylované lipoproteiny	Bakterie
TLR2	Plazmatická membrána	Lipoproteiny	Bakterie, viry, parazité,
TLR3	Endozomy	ds RNA	Viry
TLR4	Plazmatická membrána	LPS	Bakterie, viry,
TLR5	Plazmatická membrána	Flagellin	Bakterie
TLR6	Plazmatická membrána	Diacylované lipoproteiny	Bakterie, viry
TLR7/TLR8 (lidé)	Endozomy	ssRNA	Viry, bakterie,
TLR9	Endozomy	CpG-DNA	Viry, bakterie, prvoci,
TLR10	Endozomy	Neznámý	Neznámý
TLR11	Plazmatická membrána	Profilin	Prvoci
<b>RLR</b>			
RIG-1	Cytoplazma	Krátká dsRNA, 5' trifosfátová forma dsRNA	RNA viry, DNA virus
MDA5	Cytoplazma	Dlouhá dsRNA	RNA viry (picornaviridae)
LGP2	Cytoplazma	Neznámý	RNA viry
<b>NLR</b>			
NOD1	Cytoplazma	iE-DAP	Bakterie
NOD2	Cytoplazma	MDP	Bakterie
<b>CLR</b>			
Dectin-1	Plazmatická membrána	Betaglukan	Houby
Dectin-2	Plazmatická membrána	Betaglukan	Houby
MINCLE	Plazmatická membrána	SAP130	Houby

### 1.7.2.1 Cytoplazmatické PRRs

Cytoplazmatické PRRs jsou rozděleny do dvou tříd, a to na základě mechanismu jejich aktivace (Meylan a kol., 2006; Takeuchi a Akira, 2007).

#### □ RIG-I-like receptory (RLRs)

Stimulace imunitního systému může být dosaženo zacílením na RIG-I-like receptory (RLRs). Ty rozeznávají zejména virovou DNA. Po navázání odpovídajících ligandů vyvolávají RLRs uvolňování interferonu typu I hostitelskou buňkou, což může nakonec vést k její programované buněčné smrti (Besch a kol., 2009).

#### □ NOD like receptory (NLRs)

NLR jsou jednou ze skupin cytoplazmatických receptorů a tvoří ji více než 20 cytoplazmatických receptorů rozpoznávajících patogeny a nebezpečí (Fritz a kol., 2006).

### 1.7.2.2 *Sekretované PRRs*

#### □ **C-reaktivní protein (CRP)**

C-reaktivní protein odráží míru odpovědi na akutní fázi infekce (Ramamoorthy a kol., 2012). Je syntetizován jaterními buňkami a na základě zvýšení jeho koncentrace v plazmě je identifikačním znakem probíhajícího zánětu a infekce (Pepys a Hirschfield, 2003).

Hlavní funkcí CRP, jakožto složky vrozené imunity, je jeho schopnost vázat fosfocholin a rozpoznávat některé cizí patogeny a fosfolipidy z poškozených buněk. To aktivuje komplementový systém a fagocytární buňky, které iniciují odstranění zacílených buněk. Další protizánětlivé účinky zahrnují indukci zánětlivých cytokinů a tkáňového faktoru v monocytech (Gabay a Kushner, 1999).

#### □ **Lektin vázající manósu (MBL)**

Lektin vázající manósu spolu s rozpustnými mediátory a složkami komplementu významně přispívá k vrozené imunitní obraně (Ip a kol., 2009). Nízká hladina tohoto PRR v krvi může vést k opakovaně se vyskytujícím infekcím (Chumchalová a kol., 2004).

### 1.7.2.3 *Membránové PRRs*

Membránové PRRs rozpoznávají PAMPs v extracelulárním prostoru, nebo také ve fagozómech či endozomech (Palm a Medzhitov, 2009).

#### □ **C-tyl lektinové receptory (CLRs)**

CLRs jsou receptory vyznačující se přítomností domény vázající sacharidy. Nejvýznamnějším zástupci CLR receptorů jsou Dectin-1 a Dectin-2 (Willment a Brown, 2008; Sato a kol., 2009; Kumagai a Akira, 2010). Po rozpoznání PAMPs dochází k zahájení nitrobuněčných signálních drah, čímž je regulována genová exprese (Figdor a kol., 2002).

#### □ **Scavengerové receptory (SRs)**

Scavengerové receptory jsou schopné vázat nejen modifikované lipoproteiny (LDL) o nízké hustotě, ale rozpoznávají a váží další ligandy, včetně endogenních bílkovin a patogenů. Schopnost vázat různé typy ligandů se odvíjí od biologických funkcí jako je vylučování modifikovaných lipoproteinů a patogenů. SRs také regulují mnohé

patologické stavy, včetně aterosklerózy, patogenních infekcí a imunitní dozor související s rakovinou (Zani a kol., 2015).

#### □ **Formylpeptidové receptory (FPRs)**

Formyl peptidové receptory se řadí mezi transmembránové receptory a jsou přítomné zejména na leukocytech (VanCompernelle a kol., 2003). Tyto receptory jsou schopné vázat formylové peptidy, které se nacházejí na povrchu mnoha patogenů (především bakterií), a které jsou silnými chemoatraktanty podporujícími migraci leukocytů do místa infekce (Honeycutt a Niedel, 1986; Le a kol., 2000).

#### □ **Toll-like receptory (TLRs)**

Klíčové jsou při rozpoznání cizorodých struktur receptory skupiny TLR (Toll-like receptor, odvozeno od receptoru Toll), jež rozeznávají mnoho molekul charakteristických pro nejrůznější patogeny – lipopolysacharidy (TLR4), lipoproteiny (TLR2), prokaryotické a virové nukleové kyseliny (TLR7 a TLR9) další (Hořejší a kol., 2013).

#### **1.7.2.4 Toll-like receptory**

Toll-like receptory byly objeveny u octomilek, a to jako první PRRs (Dembic, 2000). Lidské TLR zahrnují rostoucí rodinu deseti příbuzných proteinů zapojených do přirozené imunity (TLR1 – TLR10) (Muzio a kol., 2000), myších Toll-like receptorů je dvanáct (Kawasaki a Kawai, 2013).

Některé TLR jsou lokalizovány na buněčném povrchu, další v intracelulárních membránách (TLR3, TLR7, TLR8 a TLR9), kde jsou vhodné podmínky pro setkání s ligandy uvolňovanými z pohlcených mikroorganismů (Hořejší a kol., 2013).

Toll-like receptory jsou ve vysoké míře exprimovány buňkami imunitního systému, a to jak z myeloidních, tak i z lymfoidních linií, které infiltrují mikroprostředí nádoru (Marabelle a kol., 2014).

## **1.8 Terapeutická protinádorová vakcinace**

Nádorové vakcíny spadají spolu s elektrokoagulací a kryochirurgickými zákroky do oblasti aktivní imunoterapie. První pokusy o aktivní imunoterapii měly za cíl vyvolávat nespecifickou systémovou či nespecifickou nádorovou stimulaci imunitního systému pacienta pomocí navození zánětu. Mezi ně patří použití bakterie BCG (*Bacillus Calmette-*

*Guérin*) využívané při léčbě karcinomu močového měchýře nebo *Corynebacterium parvum*. Současné technologie umožňují právě u vakcín rozpoznání a klonování genů kontrolujících syntézu nádorových antigenů a využití jejich peptidů k identifikaci nádorově specifických CTL. Vakcíny se používají profylaktické a terapeutické (Klener a Klener jr., 2013).

### **1.8.1 Profylaktické vakcíny**

Profylaktické či preventivní vakcíny nalézají své uplatnění především u nádorů, na jejichž vzniku mají podíl viry. Mezi tyto typy vakcín patří vakcína proti hepatitidě B, která zároveň snižuje riziko vzniku hepatocelulárního karcinomu. Dále sem patří vakcíny proti papilomavirům (HPV) (Klener a Klener jr., 2013).

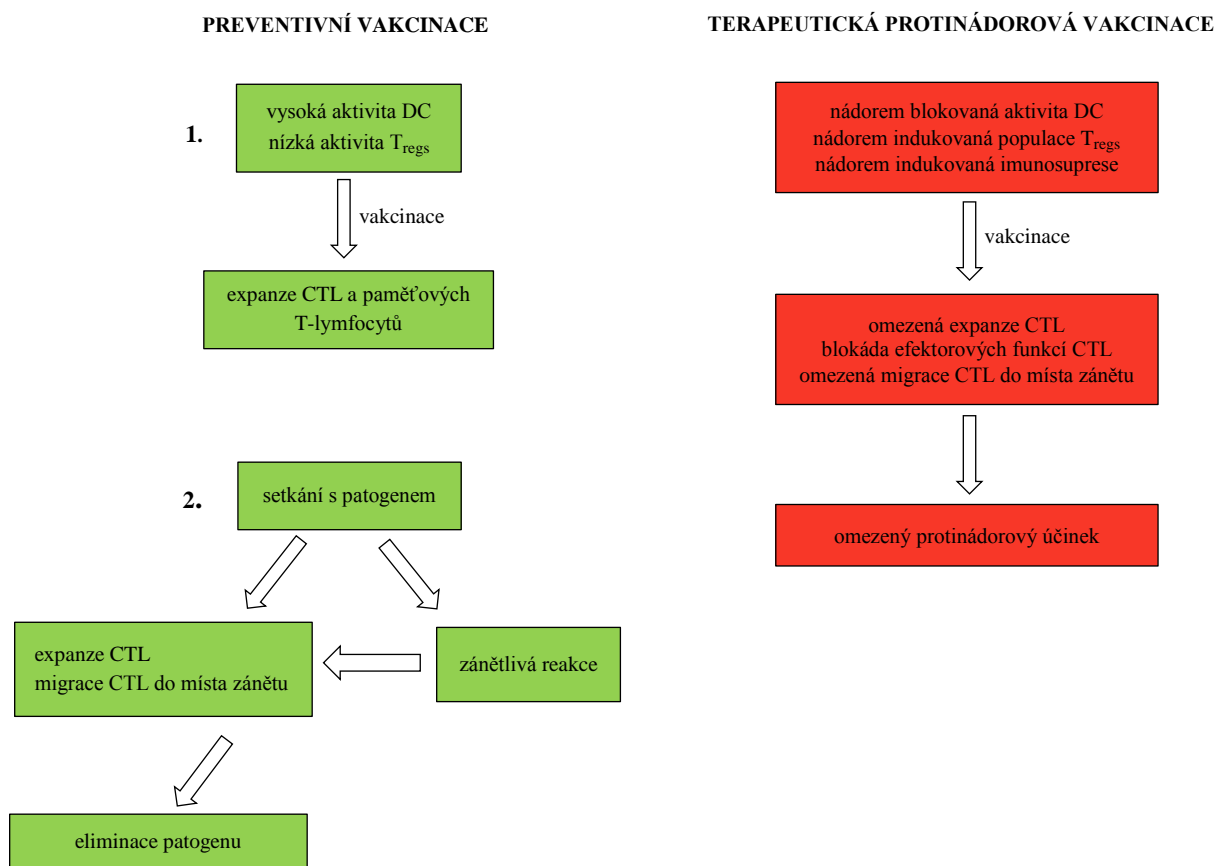
### **1.8.2 Terapeutické vakcíny**

Cílem terapeutických vakcín je indukování diferenciací a rozšíření tumor specifických cytotoxických T-lymfocytů za účelem likvidace nádorových buněk (Klener a Klener, jr., 2013). Lze toho dosáhnout vakcinací indukovanou prezentací nádorových antigenů nebo či zároveň indukovanou prezentací MHC II a kostimulačních molekul obvykle se nacházejících na antigen prezentujících buňkách (CD80 a CD86) (Li a kol., 2007; Le Mercier a kol., 2013). V současné době jsou testovány jakožto nádorové vakcíny i Fc-fúzní proteiny (Klener a Klener, jr., 2013).

Dosavadním problémem terapeutických protinádorových vakcín je absence MHC gp II. třídy nebo skutečnost, že kostimulační molekuly neprodukují cytokiny nezbytné pro aktivaci pomocných CD4<sup>+</sup> T-lymfocytů, čímž nedochází ani k aktivaci efektorových CD8<sup>+</sup> cytotoxických T-lymfocytů. Dalším problémem může být produkce cytokinů a bioaktivních látek nádorovými buňkami či exprese molekul s imunosupresivním účinkem (např. TGF- $\beta$ , IL-10, FasL) na povrchu nádorových buněk. Tím může docházet ke vzniku a rozšíření imunosupresivních buněk (T<sub>regs</sub>) či myeloidních supresorových buněk (MDSC) (Klener a Klener jr., 2013). Vakcinační přípravky mohou být založeny například na použití dendritických buněk (Palucka a Banchereau, 2012).



Na schématu (Obr. 1) je uveden rozdíl mezi preventivní a cílenou terapeutickou protinádorovou vakcinací.



**Obr. 1:** Rozdíly v preventivní a terapeutické vakcinaci (Klener a Klener jr., 2013).

### 1.8.2.1 Vakcíny na bázi dendritických buněk

Dendritické buňky (DCs) mají jakožto antigen prezentující buňky klíčovou roli v řadě imunitních procesů. Díky svým vlastnostem antigenní prezentace a především díky prezentaci antigenu CD8<sup>+</sup> T-lymfocytům vznikají cytotoxické T-lymfocyty, které po infiltraci nádoru rozpoznávají a ničí nádorové buňky (Palucka a Banchereau, 2012).

Nejčastěji jsou dendritické buňky vystavené lyzátu nádorových buněk nebo kultivované za přítomnosti nádorového antigenu či peptidu. Následně je pacientovi podána vzniklá DCs vakcína (Banchereau a kol., 2001).

### 1.8.2.2 DNA vakcíny

DNA vakcíny bývají tvořeny především bakteriálními plazmidy, které mají zabudován gen, který kóduje nádorový antigen. Dále mohou být součástí těchto vakcín geny,

které kódují kostimulační či imunomodulační molekuly. Tyto molekuly mají za cíl posílit proces imunizace (Klener a Klener jr., 2013).

### **1.8.2.3 Užití ligandů PRRs pro nádorovou imunoterapii**

Jedním ze způsobů vakcinace je použití ligandů PRRs (zejména TLRs) jakožto intratumorálních terapeutik. Mechanismus léčebného účinku protinádorových PRRs se různí, a to v závislosti na typu nádorových buněk, mikroprostředí nádoru a použitých ligandů PRRs (Marabelle a kol., 2014). Například Imiquimod, agonista TLR7 má léčebný účinek při aplikaci do subkutánních myších melanomů přímým zabíjením nádorových buněk pomocí plazmocytoidních dendritických buněk (pDCs) (Drobits a kol., 2012).

### **1.8.2.4 Intratumorální imunizace (*in situ* vakcinace)**

*In situ* vakcinace představuje alternativní přístup v léčbě nádorového onemocnění. Vakcína proti nádorovému onemocnění je generována *in vivo*, aniž by bylo nutné předem určit a izolovat TAA (tumor asociované antigeny). Ty jsou běžně uvolňovány po usmrcení nádorových buněk a mohou být následně zpracovány a prezentovány antigen prezentujícími buňkami získané imunitě. Celému procesu uvolnění TAA a prezentaci napomáhají ve vakcíně obsažené imunomodulátory (Hammerich a kol., 2015).

*In situ* vakcíny by tedy v ideálním případě měly být schopny vyvolat imunogenní smrt nádorových buněk, usnadnit uvolnění TAA a zachycení a prezentaci antigenu antigen prezentujícími buňkám pro indukci protinádorové odpovědi T-buněk, čímž je dosaženo systémové protinádorové odpovědi získané imunity a navakcinování celého organismu (Hammerich a kol., 2015). To by také mělo umožnit napadení vzdálených nádorových lézí (Siva a kol., 2013; Marabelle a kol., 2014).

Užití nádorových buněk jako imunomodulátoru, jenž je součástí protinádorové vakcíny, může aktivovat vrozenou imunitu a vést k imunizaci pacientů (Singh a Overwijk, 2015). Kromě utváření nádorově specifické imunity díky zásobením T-buňkami, může intratumorální imunoterapie umožnit atak nádoru potlačením supresivních složek vrozené imunity, jakými jsou např. myeloidní supresorové buňky (MDSC) a M2 makrofágy, a polarizovat imunitní odpověď směrem k tvorbě protinádorových M1 makrofágů (van den Boorn a kol., 2013; Singh a kol., 2014). Taková modifikace mikroprostředí nádoru a systémová protinádorová odpověď u intratumorální imunoterapie je vhodná nejen

ke zničení injikovaného nádoru, ale ovlivňuje též metastázy (Marabelle a kol., 2014; Singh a Overwijk, 2015).

## **1.9 Nádorová imunoterapie založená na kombinaci TLR ligandů a ligandů fagocytárních receptorů – studovaná v této práci**

Základním principem nádorové imunoterapie studované v laboratoři J. Ženky je využití mechanismů vrozené imunity. Používá se intratumorální aplikace směsi TLR agonistů (LPS, resiquimod, POLY I:C, *Listeria monocytogenes* atd.) a ligandů stimulujících fagocytózu (nejčastěji na nádorové buňky kotvený manan, dále pak laminarin, f-MLF) (Janotová a kol., 2014).

Účelem TLR agonistů je vyvolat zánětlivou infiltraci nádorů, účelem ligandů stimulujících fagocytózu je zacílit atak na nádorové buňky. Úkolem této práce bylo zjistit, zda dochází k zapojení i imunity získané a jaké jsou projevy tohoto zapojení.

### **1.9.1 TLR agonisté využití v této práci**

#### **1.9.1.1 Resiquimod (R-848)**

Resiquimod je nízkomolekulární a selektivní ligand, který je agonistou TLR7 u myši a agonistou TLR7 a TLR8 v lidském těle. Resiquimod po navázání na příslušné TLR indukuje sekreci protilátek a cytokinů (INF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ), aktivaci makrofágů a dendritických buněk (Burns a kol., 2000; Bernstein a kol., 2001, Dockrell a Kinghorn, 2001, Bowie, 2007).

#### **1.9.1.2 POLY I:C (polyinosinická-polycitidylická kyselina)**

Polyinosinická-polycitidylická kyselina (POLY I:C) je syntetický analog dvouvláknové RNA (ds RNA) a agonista TLR3. Účinek POLY I:C pro využití v nádorové imunoterapii je úspěšně zkoumán po několik dekád. Nashromážděné důkazy potvrzují, že látka POLY I:C může být použita při vakcinaci pro zvýšení imunitní reakce vrozené a získané imunity a pro změnu mikroprostředí nádoru. Nedávné studie také ukázaly, že aktivací TLR3 a RLR signálů látkou POLY I:C lze přímo vyvolat programovanou buněčnou smrt u některých nádorových buněk (Cheng a Xu, 2010; Chin a kol., 2010).

Po navázání TLR3 dochází k zahájení signální dráhy přes adaptorovou molekulu TRIF, a tím je spuštěna aktivace transkripčních faktorů prozánětlivých cytokinů a proteinu 1,

který zapříčiňuje tvorbu interferonového induktoru typu I. Tím jsou aktivovány NK buňky a je ovlivněno také dozrávání dendritických buněk (Cheng a Xu, 2010).

POLY I:C je nejúčinnější interferonový induktor typu I rozpoznáný TLR3 (Tissari a kol., 2005, Matsumoto a Seya, 2008).

### **1.9.1.3 *Listeria monocytogenes***

*Listeria monocytogenes*, původce listeriózy, je drobná grampozitivní bakterie, jež je využívána především jako agonista TLR2 (Torres a kol., 2004). Její využití v nádorové imunoterapii spočívá v užití jakožto vektoru pro cílené navázání peptidových a proteinových antigenů (Wallecha a kol., 2009). V této práci byly použity teplem usmrcené bakterie.

## **1.9.2 Manan – ligand podporující fagocytózu**

Manan je biologicky odbouratelný a bioaktivní polysacharid, který je díky svým vlastnostem předmětem zájmu v různých odvětvích (Mikkonen a Tenkanen, 2012; Yildiz a Oner, 2014). Nachází se v buněčné stěně mikroorganismů, jako jsou kvasinky a gramnegativní bakterie. Tento polysacharid se skládá z několika podjednotek D-manózu, které jsou spojeny glykosidickou vazbou (Lipke a Ovalle, 1998). Manan se nachází ve vakcinačních přípravcích, které se již používají v klinické praxi. (Apostolopoulos a kol., 2006; Pashov a kol., 2011, Yildiz a Oner, 2014). Využit byl manan například v DNA vakcínách podaných myším k zacílení antigen prezentujících buněk a došlo k vyvolání mnohem silnější imunitní odezvy ve srovnání s prostou DNA imunizací. (Tang a kol., 2009). Manan je totiž antigenní látkou sloužící jako PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) pro vazbu PRRs (pattern recognition receptors). Tato vazba je zprostředkována receptorem zvaným lektin vázající manózu – MBL (mannose nebo manan-binding lectin) a manósovým receptorem – MR (mannose receptor) nacházejícími se na povrchu makrofágů. (Yeeprae a kol., 2006). Dochází tak k aktivování vrozené imunity pomocí komplementu (Hořejší a Bartůňková, 2009).

### **□ Mannan-Binding Lectin (MBL)**

Mannan-Binding Lectin neboli také lektin vázající manózu je protein, který se podílí na aktivaci komplementové kaskády, jež je součástí vrozené imunity. Jeho nedostatek má důležitou roli při opakovaných infekcích. Hladina mannan-binding lectin v krvi je poměrně stabilní, nicméně jsou velké rozdíly mezi různými jedinci. Různorodost hladin se odvíjí od alotypů spojených s mutací v prvním exonu genu

pro MBL v kodónech 52, 54, 57 a s polymorfismy v promotoru. Důležité je, že právě nízká hladina MBL v krvi může vést k opakovaným infekcím některých vážných onemocnění, naopak u intracelulárních parazitů byl prokázán ochranný účinek spojený s nízkými hladinami MBL (Chumchalová a kol., 2004).

MBL aktivuje komplementový systém lektinovou cestou. Tato aktivace počíná navázáním sérového lektinu MBL na sacharidové struktury nacházející se na povrchu mikrobů. Následně je utvořen komplex MBL se serinovou proteázou (MASP-2), která štěpí C4 a C2 na C3 konvertázu. MBL je také schopen připojit se na infekční částici a stimulovat její fagocytózu (pohlcení), funguje tedy jako opsonin. (DeFranco a kol., 2007). Jak již bylo zmíněno, MBL patří mezi sekretované PRRs.

#### □ **Mannose Receptor (MR)**

Manósový receptor (MR) je proteinem nacházejícím se na povrchu makrofágů a na nezralých dendritických buňkách. Funguje jako PRR a zprostředkovává fagocytární aktivitu patogenů obsahujících manózu. MR patří mezi multilektinové receptory a sestává se z pěti typů domén – série 8-10 lektinových domén (CTLDs), N-terminální na cystein bohatá doména, fibronektinová doména typu II, transmembránová a lektinová doména. Lektinová doména je esenciální pro rozpoznání mnoha druhů antigenů (Stahl a Ezekowitz, 1998).

### **1.9.2.1 Látky užitě ke kotvení terapeutik na nádorové buňky**

Nejlépeších léčebných účinků je doposud dosahováno použitím motivů stimulujících fagocytózu – TLR agonistů v kombinaci s ligandy podporujícími fagocytózu – které jsou kotvené na nádorové buňky přímo.

V předchozích studiích Janotové a kol. (Janotová a kol., 2014) byla taková vazba zprostředkována pomocí bifunkčního crosslinkeru SMCC, který byl použit i v této práci.

#### □ **Kotvení pomocí SMCC (sukcinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyklohexan-1-karboxylát)**

SMCC je heterobifunkčním (na každém konci je jiná reaktivní skupina) crosslinkerem na jednom konci obsahujícím maleimidovou skupinu, která váže sulfhydrylové skupiny (Williams a Caput, 2010). Na druhém konci SMCC obsahuje NHS skupinu, jež umožňuje navázání terapeutické látky (Mattson a kol., 1993). Toto navázání na nádorové buňky je ještě podpořeno hodinu před aplikováním terapeutika aplikací TCEP (tris(2-karboxyethyl)fosfin).

□ **Podpora kotvení pomocí TCEP (tris(2-karboxyethyl) fosfin)**

TCEP redukcí cysteinů uvolňuje sulfhydrylové (–SH) vazby, čímž umožňuje kovalentní vazbu SMMC nesoucí terapeutika (Janotová a kol., 2014).

Díky takové vazbě agonistů dochází k podpoření napadení nádorových buněk, což vede k likvidaci nádorových buněk (Janotová a kol., 2014).

## 2. Cíle práce

Tato práce je součástí cesty za nalezením vhodné odpovědi na otázku nádorové imunoterapie, již se zabývá tým vedený RNDr. Janem Ženkou, CSc. Konkrétně tato práce se zaměřuje na studium propojení dvou typů imunitních odpovědí a ověření terapeutické vakcinace, která vyúsťuje ve vývoj vhodných protinádorových vakcín.

Cíle této bakalářské práce:

Rešerše zaměřená na nádorovou imunoterapii včetně otázky protinádorové vakcinace, která bude doplněna prvními experimenty:

- Hledání vhodné nádorové imunoterapie použitelné v humánní medicíně a její optimalizace.
- Nádorová imunoterapie primárního nádoru a ovlivnění růstu paralelního neléčeného nádoru.
- Ověření možnosti terapeutické vakcinace.

### 3. Materiály a metody

#### 3.1 Chemikálie

V pokusech byly používány tyto chemikálie:

- Aditiva – antibiotická/antimykotická směs (amphotericin B, penicilin G, streptomycin) (Biosera)
- DMSO - *dimethylsulfoxide* (Sigma-Aldrich, USA)
- EDTA – *ethylenediaminetetraacetic acid* (Sigma-Aldrich, USA)
- FCS – *fetal calf serum* (Sigma-Aldrich, USA)
- GM-CSF – *granulocyte-macrophage colony stimulating factor* (Sigma-Aldrich)
- Listeria monocytogenes* (heat killed *Listeria monocytogenes*) (InvivoGen)
- Manan – ze *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma-Aldrich, USA)
- PBS – *Phosphate buffered saline* (Sigma-Aldrich, USA)
- POLY I:C – *polyinosinic:polycytidylic acid* (Sigma-Aldrich, USA)
- Resiquimod (R-848) (Tocris, UK)
- RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, USA)
- SMCC – *Succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl) cyklohexane-1-carboxylate* (Thermo)
- N-hydroxysuccinimide ester* (Thermo, USA)
- TCEP – *Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride* (Sigma-Aldrich, USA)
- Trypanová modř (Sigma-Aldrich, USA)
- Trypsin (Sigma-Aldrich, USA)

#### 3.2 Laboratorní zvířata

Pro práci byly při pokusech použity samice inbredních myši kmene C57BL/6N od společnosti Charles River Laboratories. Při zahájení terapie byly myši 8 týdnů a jejich váha se pohybovala v rozmezí 18 – 20 g. Byly chovány za standardních podmínek v prostředí o konstantní teplotě 22°C a relativní vzdušné vlhkosti 65 % v místnosti s nastavenou fotoperiodou 12/12. Uloženy byly v plastických klecích s podestýlkou z dřevěných hoblin a stálým přísunem potravy (granulovaná směs) a sterilní vody.



### **3.3 Buněčná linie melanomu B16-F10**

Při všech experimentech byly použity nádorové buňky z buněčné linie melanomu B16-F10. Buňky byly kultivovány v RPMI 1640 s 10% FCS a s aditivou o těchto výsledných koncentracích: Amphotericin B 0,25 µg/ml, Penicilin G 100 j./ml, Streptomycin 100 µg/ml a L-glutamin 292 µg/ml. Tato kultivace probíhala v termostatu při teplotě 37°C a v atmosféře nasycené vodními parami s 5 % oxidu uhličitého.

### **3.4 Příprava buněk melanomu B16-F10 pro transplantaci**

Po nárůstu buněk v dostatečném množství bylo slito kultivační médium a buňky byly 3× propláchnuty dostatečným množstvím sterilního pufovaného fyziologického roztoku (PBS). Následně bylo přidáno 0,5 ml trypsinizační směsi (0,25% trypsin, 0,02% EDTA v PBS) a buňky byly inkubovány 5 minut v termostatu při 37°C. Po těchto několika minutách došlo k odpoutání buněk. Proces trypsinizace byl ukončen přidáním 5 ml RPMI 1640 s 10% FCS. Pomocí Pasteurovy pipety byly buňky rozsuspendovány a následovala centrifugace (10min/150G/4°C). Poté byl slit supernatant, přidáno RPMI 1640 bez FCS a byl rozsuspendován buněčný pelet. Vzorek suspenze byl dále naředěn v poměru 1:1 trypanovou modří (0,5% trypanová modř), aby mohl být stanoven aktuální počet buněk (došlo k rozpoznání mrtvých a živých buněk). Pomocí Bürkerovy byla stanovena koncentrace buněk v 1 ml média, ta pak byla upravena na potřebnou koncentraci  $4 \times 10^6$  buněk v 1 ml média.

### **3.5 Transplantace buněk melanomu B16-F10**

Transplantace myšního melanomu byla prováděna na myších oholených ve spodní části zad. Subkutánně (s.c.) jim byla do pravého oholeného boku (případně do obou boků v případě dvou souběžných nádorů) vpravena suspenze obsahující  $4 \times 10^5$  buněk B16-F10 v 0,1 ml RPMI 1640 bez séra na myš.

### **3.6 Měření velikosti nádorů**

Velikost nádoru byla měřena pomocí kaliperu a z naměřených hodnot byl vypočítán objem nádoru podle vzorce  $V = \pi/6AB^2$ , kde A vyjadřuje největší rozměr nádoru a B nejmenší (Inaba a kol., 1986). Oba rozměry jsou uváděny v milimetrech. Nádory byly během experimentů měřeny obden.

### 3.7 Průměrná redukce nádorového růstu

Výpočet průměrné redukce nádorového růstu od počátku terapie v porovnání s kontrolní skupinou byl proveden dle následujícího vzorce:

$$\frac{(\text{průměrný objem nádorů v kontrole}) - (\text{průměrný objem nádorů v léčené skupině}) \times 100}{\text{průměrný objem nádorů v kontrole}}$$

Redukce byla stanovována ve dnech 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28 a 30. Z výsledných hodnot byla získána hodnota průměrné redukce nádorového růstu, která je vyjádřena v %.

### 3.8 Počítání plicních metastáz

Po usmrcení myši byly vypitvány myši plíce, které byly po několik dní uchovány ve 4% roztoku formaldehydu. Následně byly prohlíženy pod binolupou, při čemž se počítala všechna metastatická ložiska – ta vypadají jako černé tečky různých velikostí (Větvička a kol., 2007). Plicní tkáň v době fixace ve formaldehydu zesvětlala a metastázy tak byly díky barevnému kontrastu viditelnější.

### 3.9 Příprava terapeutik

#### 3.9.1 Syntéza manan-SMCC

Roztok mananu v prostředí octanu amonného a kyanoborohydridu sodného byl při pH 7,45 a pokojové teplotě redukčně aminován po dobu 40 minut. Poté byl roztok dialyzován za použití dialyzační trubice MWCO 3500 (Serva-Heidelberg, Německo) proti PBS při 4°C. Dále bylo potřeba zkontrolovat pH mannanu-NH<sub>2</sub> (požadovaná hodnota musí být 7,4). Poté byl připraven roztok SMCC v DMSO a jeho ekvimolární množství bylo přidáno k manan-NH<sub>2</sub>. Takto připravená směs byla při pH 7,4 a pokojové teplotě nechána reagovat po dobu 40 minut. Následně byla směs přes noc dialyzována za použití dialyzační trubice MWCO 3500 (Serva-Heidelberg, Německo) proti PBS při 4°C. Po dialyzaci byl získán 0,2 mM roztok manan-SMCC v PBS.

#### 3.9.2 Příprava roztoků Resiquimodu (Resiquimod.HCl)

Resiquimod je ve formě báze, a tudíž je ve vodě těžko rozpustitelný, proto byl nejdříve připraven hydrochlorid. 1,5 mg Resiquimodu bylo smícháno se 4,2 µl 3,5 % HCl.

Koncentrace R-848 byla upravena na 0,5 mg v 1 ml PBS. Roztoky použité v následujících experimentech byly dále připraveny buď přidáním samotného PBS, nebo přidáním PBS obsahujícího další látky (0,2 mM roztok manan-SMCC v PBS, *Listeria monocytogenes*, *Listeria monocytogenes*-SMCC, POLY I:C).

### **3.9.3 Příprava *Listeria monocytogenes*-SMCC (v 0,2 mM manan-SMCC)**

$1 \times 10^{10}$  tepelně usmrcených bakterií *Listeria monocytogenes* bylo rozsuspendováno v 1 ml PBS. Z toho bylo odebráno 500  $\mu$ l suspenze bakterií, ke kterým bylo přidáno 5 ml 0,2 mM roztoku manan-SMCC v PBS (pH 7,4) připraveného výše uvedeným postupem. Dále bylo přidáno 1,25 mg SMCC (62,5  $\mu$ l roztoku 2 mg SMCC bylo rozpuštěno ve 100  $\mu$ l DMSO). Takto připravená směs byla inkubována 40 minut při pokojové teplotě a následně dialyzována v dialyzační trubici MWCO 3500 proti PBS při 4°C přes noc ze stálého míchání.

### **3.10 Statistické vyhodnocení dat**

Výsledná data byla ověřena a statisticky vyhodnocena pomocí parametrických (ANOVA doplněná post-hoc Tukey testem a Unequal testem) a neparametrických metod (Friedman test a Wilcoxon test) v programu STATISTICA 12. Přežívání myší bylo hodnoceno pomocí Kaplan-Meierovy křivky v programu STATISTICA 12. Ve všech grafech je použita střední chyba průměru (SEM).

## 4. Experimenty

### 4.1 Studium vlivu kotveného mananu ve spojení s R-848 a *Listeria monocytogenes* na růst terapeuticky ovlivňovaného i souběžného neléčeného melanomu

V pokusu bylo použito 30 myší, kterým byly subkutánně transplantovány melanomové buňky do pravého i levého boku. Dvanáctý den po injikaci melanomů byly myši rozděleny do 5 skupin (A, B, C, D, K) po 6 myších.

Každá skupina byla léčena jiným terapeutikem, a to dle následujícího schématu:

**Skupina A:** i.t. aplikace 50  $\mu$ l roztoku 0,5 mg R-848.HCl/ml + 0,2 mM manan-SMCC

**Skupina B:** i.t. aplikace 50  $\mu$ l roztoku 0,5 mg R-848.HCl/ml + 0,2 mM manan-SMCC + *Listeria monocytogenes*-SMCC, 1000 mil./ml

**Skupina C:** i.t. aplikace 50  $\mu$ l roztoku 0,5 mg R-848.HCl

**Skupina D:** i.t. aplikace 50  $\mu$ l roztoku 0,2 mM manan-SMCC

**Skupina K:** i.t. aplikace 50  $\mu$ l PBS (kontrola)

Skupinám A, B, C, D, K bylo hodinu před aplikací jednotlivých látek injikováno i.t. vždy 50  $\mu$ l 50mM roztoku TCEP v PBS.

Terapie byla zahájena v den terapie 0, tedy dvanáctý den po transplantaci melanomových buněk. Terapeutika byla podána celkem dvanáctkrát ve čtyřech pulzech (dny 0, 1, 2,...8, 9, 10,...16, 17, 18,...24, 25, 26), a to intratumorálně a pouze do pravého nádoru. Obden (vždy v sudý den) až do 30. dne od zahájení terapie byla měřena velikost všech nádorů. Po ukončení léčby byla sledována doba přežití myší.

## 4.2 Vakcinace buňkami B16-F10 s navázaným mananem ve směsi s TLR agonisty

K provedení tohoto pokusu bylo použito 30 myší (randomizovány po 6 myších do 5 skupin - A, B, C, D, K). Myším bylo 8. den po transplantaci nádoru subkutánně (s.c., levý bok bez nádorů) vpraveno 50  $\mu$ l terapeutik:

**Skupina A:** s.c. aplikace 50  $\mu$ l suspenze  $4 \times 10^5$  mrazem zabitých B16-F10 + manan-SMCC + R-848 + POLY I:C

**Skupina B:** s.c. aplikace 50  $\mu$ l suspenze  $4 \times 10^5$  mrazem zabitých B16-F10 + manan-SMCC + R-848 + POLY I:C + *Listeria monocytogenes*

**Skupina C:** s.c. aplikace 50  $\mu$ l suspenze  $4 \times 10^5$  mrazem zabitých B16-F10 + R-848 + POLY I:C

**Skupina D:** s.c. aplikace 50  $\mu$ l suspenze  $4 \times 10^5$  mrazem zabitých B16-F10 + R-848 + POLY I:C + *Listeria monocytogenes*

**Skupina K:** PBS

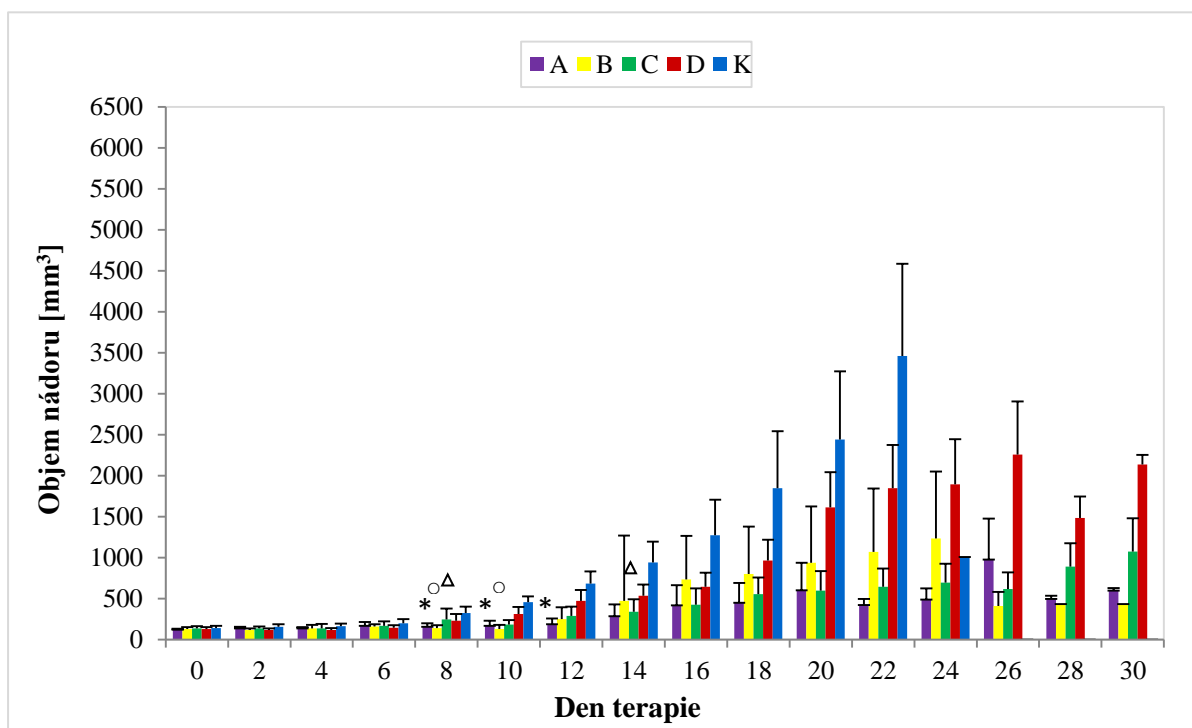
Terapeutika byla podána celkem dvanáctkrát ve čtyřech pulzech (dny 0, 1, 2,...8, 9, 10,...16, 17, 18,...24, 25, 26), a to vždy s.c. do levého boku bez nádorů. U myší byla obden (vždy v sudý den) až do 30. dne od zahájení terapie měřena velikost nádorů. Po ukončení léčby byla sledována doba přežití myší.

Po skončení terapie byly přeživší myší pro vyhodnocení plicních metastáz usmrceny cervikální dislokací (zlomení vazy) a jejich plíce byly vypitvány a uloženy do 4% roztoku formaldehydu. Následně byly plíce prohlíženy pod binolupou, přičemž se počítala všechna metastatická ložiska.

## 5. Výsledky

### 5.1 Studium vlivu kotveného mananu ve spojení s R-848 a *Listeria monocytogenes* na růst terapeuticky ovlivňovaného i souběžného neléčeného melanomu

Cílem tohoto experimentu bylo studium synergie dvou TLR agonistů (R-848 a *Listeria monocytogenes*) s vázáním mananu na nádorové buňky pomocí linkeru a efekt této terapie na souběžný neléčený nádor. Z grafu (Obr. 2), kde jsou znázorněny objemy pravých, léčených nádorů, je patrné, že v prvních 16 dnech terapie nebyl zásadnější rozdíl mezi jednotlivými terapeutiky. Ke konci terapie nejvíce fungovaly komplexní směsi s TLR agonisty a vázaným mananem.



Obr. 2: Vliv jednotlivých terapií na velikost melanomu.

**A** – R-848.HCl + manan-SMCC, **B** – R-848.HCl + manan-SMCC + *Listeria monocytogenes*-SMCC, **C** – R-848.HCl, **D** – manan-SMCC, **K** – kontrola PBS.

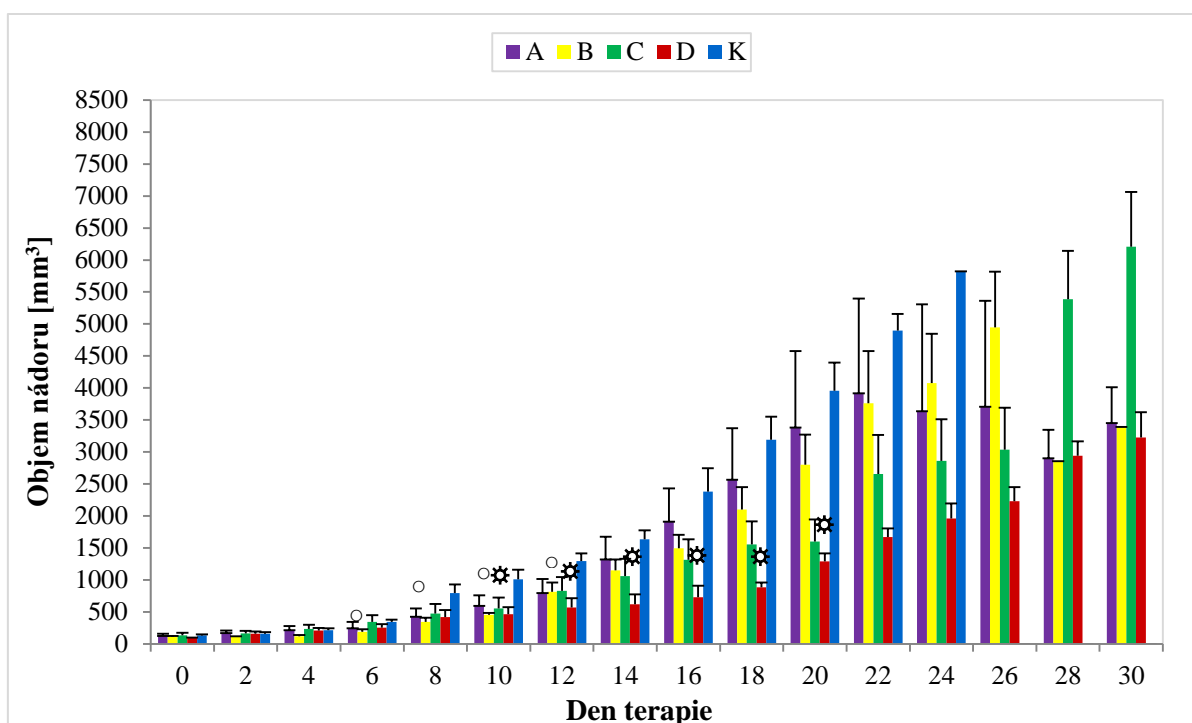
Hladiny statistické významnosti:

skupiny A ve srovnání s kontrolní skupinou: \* $P \leq 0,05$

skupiny B ve srovnání s kontrolní skupinou:  $\circ P \leq 0,05$

skupiny C ve srovnání s kontrolní skupinou:  $\Delta P \leq 0,05$

V tomto pokusu byly implantovány nádorové buňky melanomu B16-F10 na oba boky myši. Léčen byl však vždy jen pravý nádor. Graf (Obr. 3) ukazuje míru ovlivnění paralelního levého nádoru terapeutiky aplikovanými pouze do pravých nádorů myši. Z tohoto grafu (Obr. 3) je patrné, že při terapii dosahuje nejvyšší redukce nádorového růstu levého nádoru použití roztoku samotného terapeutika manan-SMCC (skupina D). Hodnota této redukce je 53,84 %. V další skupině, kde byla použita terapie R-848.HCl, dosahuje redukce nádorového růstu redukce o 45,61 %. Ve skupině, kde byla testována terapie R-848.HCl + mannan-SMCC + *Listeria monocytogenes*-SMCC (skupina B), činí průměrná redukce nádorového růstu 35,86 %. Při použití terapie R-848.HCl + manan-SMCC činila redukce pouhých 28,69 %.



**Obr. 3:** Vliv terapie na růst levého neléčeného nádoru.

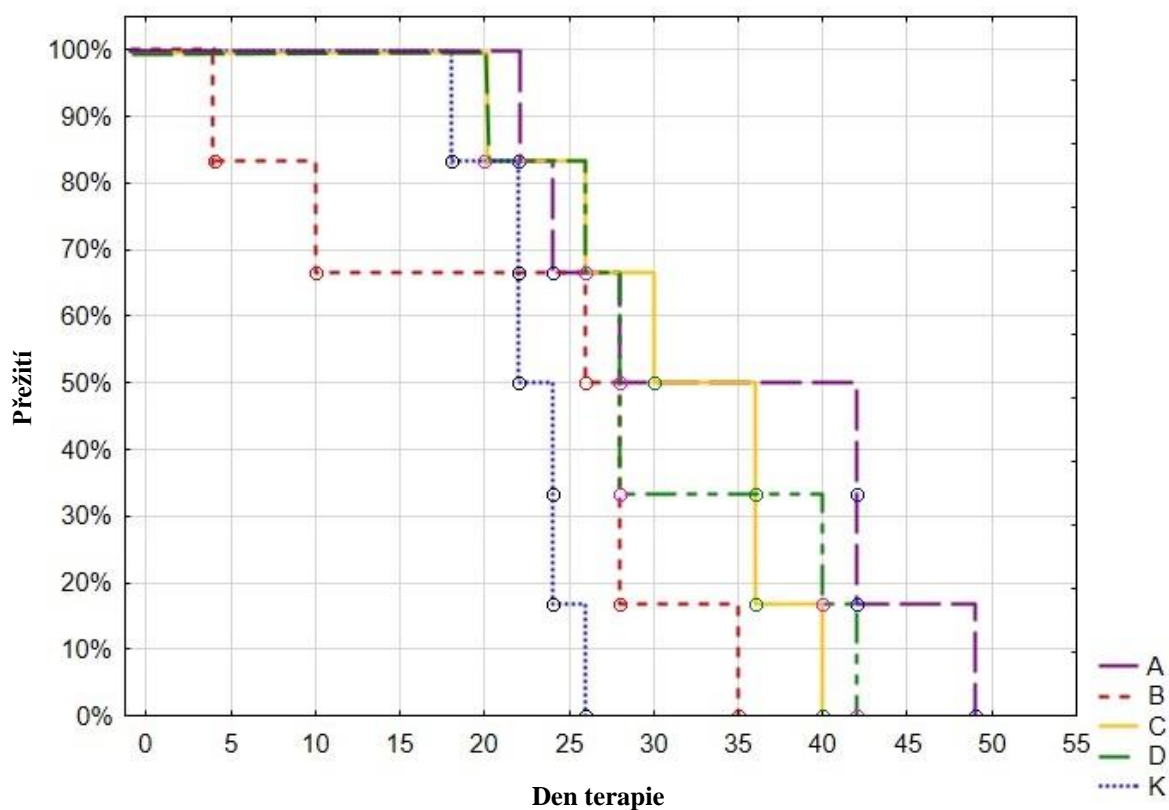
**A** – *R-848.HCl* + *manan-SMCC*, **B** – *R-848.HCl* + *manan-SMCC* + *Listeria monocytogenes-SMCC*, **C** – *R-848.HCl*, **D** – *manan-SMCC*, **K** – kontrola *PBS*

Hladina statistické významnosti:

skupiny B ve srovnání s kontrolní skupinou: ○  $P \leq 0,05$

skupiny D ve srovnání s kontrolní skupinou: ⚙  $P \leq 0,05$

Po skončení terapie byla pozorována a zaznamenávána doba přežití myši, aby bylo zjištěno, jaký vliv má terapie na prodloužení života myši. Ze zaznamenaných dat (Obr. 4) vyplývá, že dané terapie neměly zásadní vliv na přežití myši. Skupina A přežila v průměru 34,5 dne, skupina B 21,8 dne, skupina C 31,3 dne, skupina D 30,7 dne a kontrolní skupina K 24,3 dne. Poslední myš pokusu (léčená kombinací R-848.HCl + manan-SMCC) přežila do 49. dne od počátku terapie. U žádné z myši v tomto pokusu tedy nebylo docíleno hranice přežití 100 dní a více. Z výsledků vyplývá, že zatížení organismů myši bylo velmi vysoké.



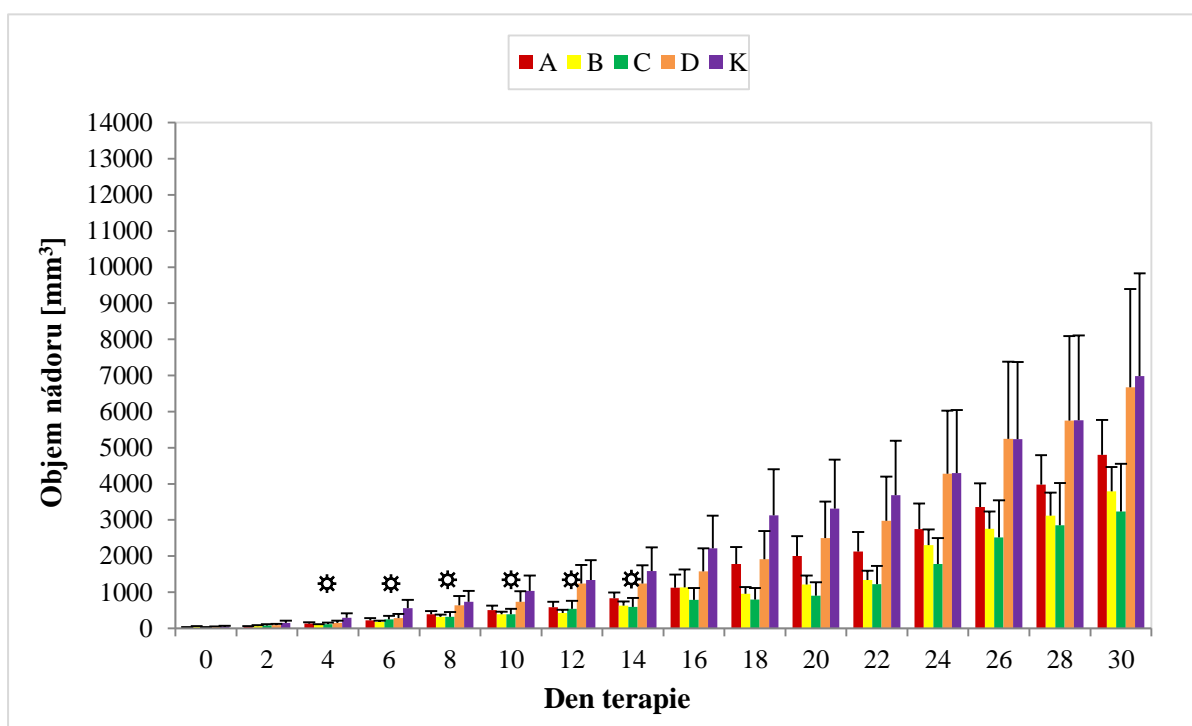
**Obr. 4:** Vliv léčby na přežití.

**A** – *R-848.HCl* + *manan-SMCC*, **B** – *R-848.HCl* + *manan-SMCC* + *Listeria monocytogenes-SMCC*, **C** – *R-848.HCl*, **D** – *manan-SMCC*, **K** – kontrola PBS



## 5.2 Vakcinace buňkami B16-F10 s navázaným mananem ve směsi s TLR agonisty

Hlavním cílem tohoto experimentu bylo zjistit, zda je možné využít suspenzi mrazem usmrcených nádorových buněk opsonizovaných navázaným mananem v kombinaci s ligandy TLR receptorů jako vakcinační terapeutikum. Výsledky pokusu jsou zaznamenány v následujícím grafu (Obr. 5). Ve skupině A bylo užito terapie  $4 \times 10^5$  mrazem zabitých B16-F10 s navázaným manan-SMCC + R-848 + POLY I:C a průměrná redukce nádorového růstu činí 46,15 %. Ve skupině B, kde byla ke stejné směsi přidána *Listeria monocytogenes*, došlo k průměrné redukci růstu o 57,89 %. Nejvyšší redukce nádorového růstu dosáhla skupina C s redukcí o 60,84 %. Kombinace  $4 \times 10^5$  mrazem zabitých B16-F10 + R-848 + POLY I:C + *Listeria monocytogenes* vykazovala nejmenší redukci nádorového růstu s hodnotou 25,72 %.



**Obr. 5:** Vliv terapie na růst nádorů pomocí R-848, mrazem zabitých nádorových buněk a kombinací dalších TLR agonistů.

**A** –  $4 \times 10^5$  mrazem zabitých B16-F10 + manan-SMCC + R-848 + POLY I:C

**B** –  $4 \times 10^5$  mrazem zabitých B16-F10 + manan-SMCC + R-848 + POLY I:C + *Listeria monocytogenes*

**C** –  $4 \times 10^5$  mrazem zabitých B16-F10 + R-848 + POLY I:C

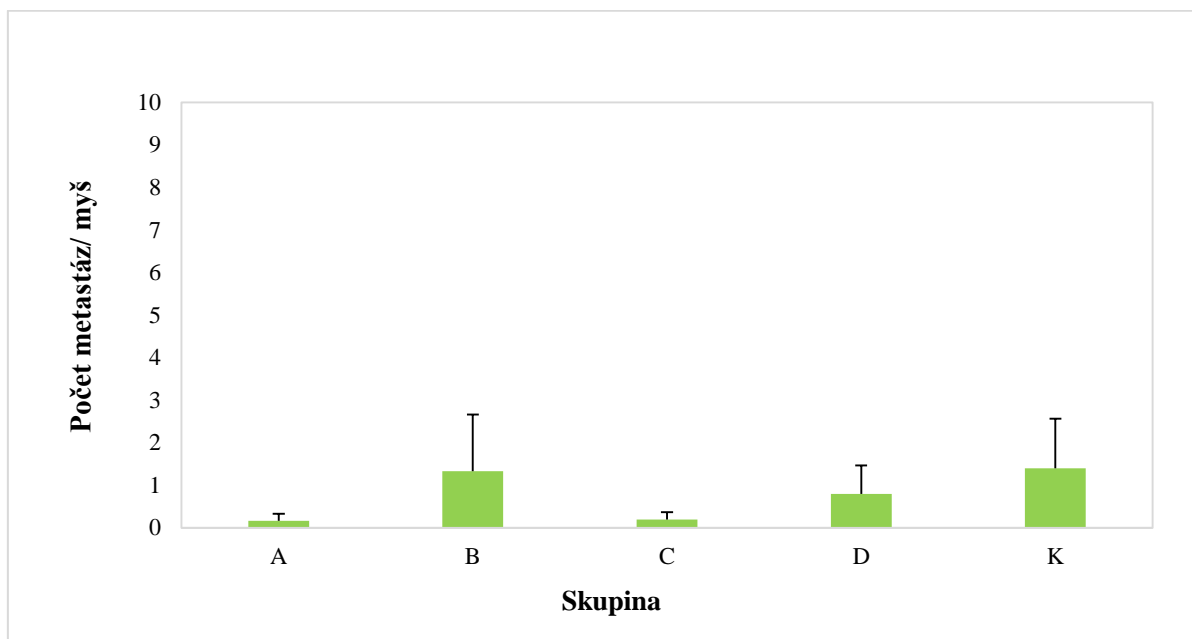
**D** –  $4 \times 10^5$  mrazem zabíjících B16-F10 + R-848 + POLY I:C + *Listeria monocytogenes*

**K** – kontrola PBS

Hladiny statistické významnosti:

skupiny C ve srovnání s kontrolní skupinou: ☼  $P \leq 0,05$

Z grafu na obrázku 6 je patrné, že terapie pomocí  $4 \times 10^5$  mrazem zabíjících B16-F10 s i bez navázaného mananu měla významný vliv na redukci metastazování, což svědčí o předání informací získané imunitě.



**Obr. 6:** Vliv terapie na průměrný počet metastáz ve skupině (intenzita metastazování).

**A** –  $4 \times 10^5$  mrazem zabíjících B16-F10 + manan-SMCC + R-848 + POLY I:C

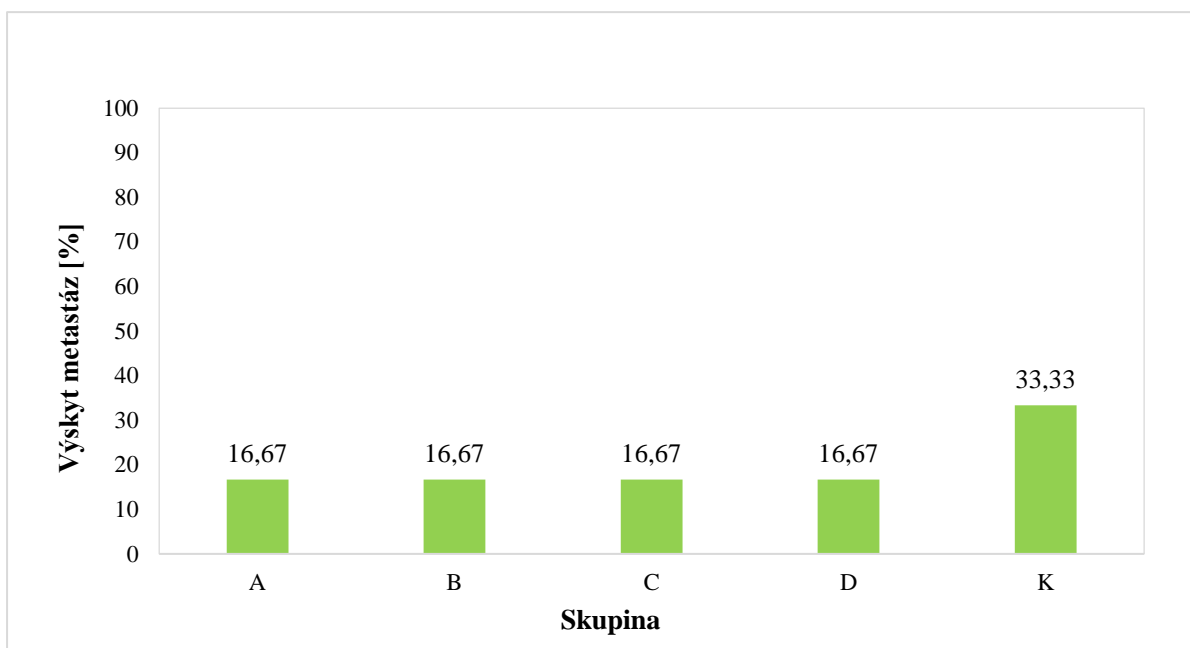
**B** –  $4 \times 10^5$  mrazem zabíjících B16-F10 + manan-SMCC + R-848 + POLY I:C + *Listeria monocytogenes*

**C** –  $4 \times 10^5$  mrazem zabíjících B16-F10 + R-848 + POLY I:C

**D** –  $4 \times 10^5$  mrazem zabíjících B16-F10 + R-848 + POLY I:C + *Listeria monocytogenes*

**K** – kontrola PBS

Na obrázku 7 je pak znázorněna prevalence metastáz.



**Obr. 7:** Vliv terapie na prevalenci metastáz.

**A** –  $4 \times 10^5$  mrazem zabíjících B16-F10 + manan-SMCC + R-848 + POLY I:C

**B** –  $4 \times 10^5$  mrazem zabíjících B16-F10 + manan-SMCC + R-848 + POLY I:C + *Listeria monocytogenes*

**C** –  $4 \times 10^5$  mrazem zabíjících B16-F10 + R-848 + POLY I:C

**D** –  $4 \times 10^5$  mrazem zabíjících B16-F10 + R-848 + POLY I:C + *Listeria monocytogenes*

**K** – kontrola PBS

## 6. Diskuze

Cílem imunoterapie je navození a posílení buněčné i látkové složky protinádorové imunity, a tím co nejšetrněji bojovat proti nádorovým onemocněním. Proto je právě imunoterapie považována za dosud nejvhodnější možný postup léčby.

Tato práce se v návaznosti na předchozí práce vedené RNDr. Janem Ženkou, CSc. zaměřuje na objasnění otázek souvisejících s podpořením imunitního systému, terapeutickou protinádorovou vakcinací a také na nalezení dalších metod zdokonalujících dosud užívané úspěšné metody léčby založené na kombinaci TLR signalizace a rozpoznávajících mechanizmů fagocytů.

Underhill a Gantner (Underhill a Gantner, 2004) ve své práci popsali synergii TLR signalizace se stimulací fagocytózy vedoucí k silné imunitní odpovědi na úrovni vrozené imunity. Tuto ideu potvrdila práce Janotové a kol. (Janotová a kol., 2014), díky čemuž jsou rozvíjeny další experimenty zaměřující se na kombinaci TLR signalizace s podporou fagocytózy. Zejména agonisté TLR2, TLR3, TLR4 a TLR9 jsou vhodné ke zvýšení zánětlivé imunitní odpovědi, která napomáhá léčbě nádorového onemocnění. Tyto stimulanty, zvané také jako adjuvans, podporují účinnost terapeutických vakcín, a to především zvýšením aktivity myeloidních buněk jako jsou makrofágy, monocyty a dendritické buňky. Jako první TLR agonista byl v naší laboratoři testován lipopolysacharid (LPS), agonista TLR4, jež byl identifikován a získán z gramnegativních bakterií (Garay a kol., 2007; Borghaei a kol., 2009).

V práci Janotové a kol. (Janotová a kol., 2014) se LPS prokázal jako vhodný TLR agonista. LPS však není kvůli jeho toxicitě možno použít jako léčebný prostředek pro lidský organismus. Proto je nutné za něj hledat vhodnou náhradu. Tato práce se tedy zaměřuje na nalezení vhodných funkčních kombinací resiquimodu.HCl a dalších ligandů schopných stimulovat proces fagocytózy.

Práce Kumžákové (Kumžáková, 2015) ukázala, že účinnost terapie založené na synergii resiquimodu s kotveným mananem je možno výrazně zlepšit přidáním dalších TLR agonistů, jako je drobná grampozitivní bakterie *Listeria monocytogenes* ukotvená na nádorové buňky. Proto byla použita i v této práci.

Historie použití bakterií v nádorové terapii se datuje již od 19. století. Tehdy americký chirurg William Coley léčil neoperabilní sarkomy intratumorální injekcí směsi tvořené inaktivními bakteriemi *Streptococcus pyogenes* a *Serratia marcescens* (v té době *Bacillus prodigiosus*) (Coley, 1891). S tímto preparátem, později nazvaným jako Coleyho toxiny, dosáhl okolo 10% úspěšnosti vyléčení. Od té doby se datují počátky nespecifické imunoterapie založené na podávání extraktů patogenních mikroorganismů (Coley, 1910).

Několik let poté byla zjištěna vhodnost použití pro léčbu nádorových onemocnění i extraktů z jiných bakterií, kterými jsou například *Mycobacterium Bovis*, *Corynebacterium parvum* a *Listeria monocytogenes* (Borghaei a kol., 2009; Bedognetti a kol., 2010; Mellman a kol., 2011). Poslední zmiňovaná bakterie vykazovala díky sekreci prozánětlivých cytokinů (např. IL-12) poměrně silnou nespecifickou imunitní odpověď (Flo a kol., 2000).

V **prvním experimentu** bylo snahou zjistit vliv účinku terapie na druhý paralelní neléčený nádor. Doposud se ukázalo (Kumžáková, 2015), že specifická imunita působící systémově může být zapojena i do procesu nádorové imunoterapie, která je založena na kombinaci TLR agonistů a ligandů aktivujících fagocytózu. Myši vyléčené touto terapií vykazovaly totiž rezistenci vůči retransplantaci melanomových buněk, a to stodvacátý i pětistý den od zahájení terapie (Ženka, ústní sdělení). To samo ukazuje na nutnou spoluúčast imunologické paměti charakteristické pro získanou imunitu. Pro průkaz tohoto zjištěného jevu byl použit model postavený na dvou paralelních nádorech, z nichž je lokálně léčen pouze pravý nádor a vliv na levý neléčený nádor byl sledován. Tímto postupem docházelo léčbou pravého nádoru k vakcinaci organismu proti druhému nádoru díky postupnému zabíjení nádorových buněk, fagocytóze a prezentaci antigenů získané imunitě. Sledováním vlivu na vývoj levého neléčeného nádoru bylo možné analyzovat účinek terapie.

Terapie pravého nádoru se odrážela v růstu paralelního neléčeného nádoru. Jeho vývoj byl výrazně zpomalen. Je zajímavé, že největšího efektu (více než 50% zpomalení růstu) bylo dosaženo ve skupině léčené kotvením samotného mananu. Význam tohoto pozorování bude však třeba potvrdit dalšími experimenty.

Experiment potvrdil závěry Kumžákové (Kumžáková, 2015) týkající se vhodnosti použití kombinace resiquimodu/mananu pro nádorovou terapii zejména pak při terapii primárního nádoru. Nicméně terapeutický výsledek byl výrazně slabší. To lze vysvětlit tím, že se jednalo o dva nádory, které nejen organismus vyčerpávají, ale také štěpí imunitní

odpověď. Pro studium zapojení získané imunity a potlačování metastáz intratumorální imunizací (vakcinací vlastním nádorem) bude proto třeba, aby paralelní nádor byl menší.

Bylo zjištěno, že nádorová imunoterapie založená na synergii TLR agonistů a podpory fagocytózy je funkční i z pohledu použití jako intratumorální vakcinace, kdy terapií primárního nádoru se dosahuje navakcinování celého organismu (Marabelle a kol., 2014; Hammerich a kol., 2015; Singh a Overwijk, 2015).

Ve **druhém experimentu** bylo hlavním cílem vyzkoušet možnost použití mananem opsonizovaných melanomových buněk v kombinaci s TLR agonisty, tentokrát i včetně POLY I:C, jehož přidání má na účinnost terapie pozitivní dopad (Glaserová, 2015). Byl zaznamenán terapeutický efekt kolem 60% redukce nádorového růstu, a to při použití melanomových buněk s i bez navázaného mananu. Vliv byl zaznamenán i v oblasti redukce výskytu metastáz. Do budoucna se tedy nabízí možnost konstrukce takto založených protinádorových terapeutických vakcín tam, kde není možná intratumorální aplikace terapeutika. Bude to však vyžadovat optimalizaci terapie a to jak dávek, počtu nádorových buněk, tak i vhodného časování.

I druhý experiment prokázal systémový efekt terapie a podporuje tedy názor, že na imunoterapeutický zásah na úrovni vrozené imunity navazuje vakcinace organismu a zapojení získané imunity. Tento názor podporují i nedávné studie provedené na imunodeficientních myších či analýzy tvorby antigen specifických CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> lymfocytů (Ženka, ústní sdělení).

## **7. Závěrečný souhrn**

- Byla vypracována rešerše na téma nádorové imunoterapie včetně otázek terapeutické nádorové vakcinace.
- Byly potvrzeny závěry týkající se vhodnosti použití resiquimodu v synergii s kotveným mananem pro nádorovou imunoterapii.
- Bylo zjištěno, že imunoterapie primárního nádoru brzdí růst paralelního nádoru.
- Byla zjištěna účinnost terapeutických vakcín založených na kombinaci TLR agonistů s mrazem zabitými nádorovými buňkami.

## 8. Seznam užitých zkratek

ADCC – buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách (*antibody dependent cellular cytotoxicity*)

AFP – *alfa-fetoprotein*

APC – antigen prezentující buňka (*antigen presenting cell*)

BCR – B-buněčný receptor (*B-cell receptor*)

BCR-ABL – *breakpoint cluster region-Abelson tyrosine kinase* - fúzní gen u chronické myeloidní leukemie

C1 – C9 – složky komplementu

CDC – cytotoxicita závislá na komplementu (*complement dependent cytotoxicity*)

CEA – karcinoembryonální antigen (*carcinoembryonic antigen*)

CLRs – C-typ lektinové receptory (*C-type lectin-like receptors*)

CRP – C-reaktivní protein

CTLDs – C-typ lektinové domény (*C-type lectin-like domains*)

CTLs – cytotoxické T-lymfocyty (*cytotoxic lymphocytes*)

DAMPs – molekulové vzory spojené s poškozením (*damage-associated molecular patterns*)

DCs – dendritické buňky (*dendritic cells*)

DMSO – dimethyl sulfoxid (*dimethylsulfoxide*)

DNA – deoxyribonukleová kyselina (*deoxyribonucleic acid*)

dsRNA – dvouvláknová ribonukleová kyselina (*double-stranded ribonucleic acid*)

EBV – Epstein-Baarové virus

EDTA – kyselina ethylendiamintetraoctová (*ethylenediaminetetraacetic acid*)

FCS – fetální bovinní sérum (*fetal calf serum*)

GM-CSF – faktor stimulující vznik kolonií granulocytů a makrofágů (*granulocyte macrophage colony-stimulating factor*)

HPC – *hematopoietic progenitor cells*

HPV – lidský papilomavirus

IL – interleukin

IFN (alfa, beta, gamma) – interferon

i.t. – intratumorální aplikace injekce (*intratumoral*)

MAb – monoklonální protilátka (*monoclonal antibody*)

MAGE – *melanoma antigen genes*

MASP2 – *mannan-binding lectin serine protease 2*



MBL – lektin vázající manózu (*mannan-binding lectin*)  
MDSC – myeloidní supresorové buňky (*myeloid-derived suppressor cells*)  
MHC – hlavní histokompatibilní komplex (*major histocompatibility complex*)  
MIF – faktor inhibující migraci monocytů/makrofágů (*macrophage/monocyte migration inhibitory factor*)  
NK buňky – přirození zabíječi (*natural killers*)  
NKT buňky – NK T-lymfocyty (*natural killers T-cells*)  
NLRs – NOD like receptory (*NOD-like receptors*)  
PAMPs – molekulové vzory spojené s patogeny, struktury charakteristické pro patogenní mikroorganismy (*pathogen-associated molecular patterns*)  
PBS – sterilní pufovaný fyziologický roztok (*phosphate buffered saline*)  
pDCs – plazmocytoidní dendritické buňky (*plasmacytoid dendritic cells*)  
POLY I:C – polyinosinická-polycitidylická kyselina (*polyinosinic:polycytidylic acid*)  
PRRs – receptory rozpoznávající molekulové vzory (*pattern recognition receptors*)  
R-848 – Resiquimod  
RLRs – RIG-I-like receptory (*RIG-I-like receptors*)  
s.c. – subkutánní aplikace injekce (*subcutaneous*)  
SMCC – sukcinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyklohexan-1-karboxylát (*Succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate*)  
SRs – scavengerové receptory (*scavenger receptors*)  
TAA – antigeny asociované s nádory (*tumor associated antigens*)  
TAM – makrofágy asociované s nádory (*tumor associated macrophages*)  
Tc – cytotoxické buňky  
TCEP – tris(2-karboxyethyl) fosfin (*tris(2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride*)  
TCR – T-buněčný receptor (*T-cell receptor*)  
TGF – transformující růstový faktor (*transforming growth factor*)  
Th – pomocný T lymfocyt (*helper T cell*)  
TLRs – Toll-like receptory (*Toll-like receptors*)  
TNF – tumor nekrotizující faktor (*tumor necrosis factor*)  
TRIF – *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$*   
TSA – antigeny specifické pro nádory (*tumor specific antigens*)  
VEGF – vaskulární endoteliální růstový faktor (*vascular endothelial growth factor*)

## 9. Citovaná literatura

Akira, S., Uematsu, S., Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*; 124(4): 783-801.

Altaner, Č. (2008). *Buněčná a molekulární biologie rakoviny*. Radix, spol. s. r.o.; 127s.

Apostolopoulos, V., Pietersz, G. A., Tsibanis, A., Tsikkinis, A., Drakaki, H., Loveland, B. E., Piddlesden, S. J., Plebanski, M., Pouniotis, D. S., Alexis, M. N., McKenzie, I. F., Vassilaros, S. (2006). Pilot phase III immunotherapy study in early-stage breast cancer patients using oxidized mannan-MUC1 [ISRCTN71711835]. *Breast Cancer Research*; 8(3): R27.

Bajčiová, V., Büchler, T., Czudek, S., Dundr, P., Feltl, D., Fučíková, T., Halámka, M., Hamšíková, E., Hausner, P., Konopásek, B., Kopecký, J., Krajsová, I., Krejsek, J., Melichar, B., Němečková, Š., Netíková, I., Petruželka, L., Říhová, B., Skálová, H., Staněk, L., Svoboda, J., Špaček, J., Tachezy, R., Ušiaková, Z., Vočka, M., Votruba, J., Závadová, E., Zemanová, M. (2015). *Onkologická imunologie*. 1. vydání, Mladá fronta; 318s.

Banchereau, J., Klechevsky, E., Schmitt, N., Morita, R., Palucka, K., Ueno, H. (2009). Harnessing human dendritic cell subsets to design novel vaccines. *Annals of the New York Academy of Sciences*; 1174: 24-32.

Banchereau, J., Palucka, A. K., Dhodapkar, M., Burkeholder, S., Taquet, N., Rolland, A., Taquet, S., Coquery, S., Wittkowski, K. M., Bhardwaj, N., Pineiro, L., Steinman, R., Fay, J. (2001). Immune and clinical responses in patients with metastatic melanoma to CD34<sup>+</sup> progenitor-derived dendritic cell vaccine. *Cancer Research*; 61: 6451-6458.

Bartůňková, J., Paulík, M. a kol. (2011). *Vyšetřovací metody v imunologii*. 2. vydání, Grada; 178s.

Bartůňková, J., Vernerová, E. (2002). *Imunologie a alergologie*. Triton; 81s.

Baskar, R., Lee K. A., Yeo R., Yeoh, K-W. (2012). Cancer and radiation therapy: current advances and future directions. *International Journal of Medical Sciences*; 9: 193-199.

Bedognetti, D., Wang, E., Sertoli, M. R., Marincola, F. M. (2010). Gene expression profiling in vaccine therapy and immunotherapy for cancer. *Expert Review of Vaccines*; 9: 555-565.

- Bernier, J., Domenge, Ch., Ozsahin, M., Matuszewska, K., Lefébvre, J.-L., Greiner, R. H., Giralt, J., Maingon, P., Rolland, F., Bolla, M., Cognetti, F., Bourhis, J., Kirkpatrick, A., van Glabbeke, M. (2004). Postoperative Irradiation with or without Concomitant Chemotherapy for Locally Advanced Head and Neck Cancer. *The New England Journal of Medicine*; 350: 1945-1952.
- Bernstein, D. I., Harrison, Ch. J., Tomai, M. A, Miller, R. L. (2001). Daily or Weekly Therapy with Resiquimod (R-848) Reduces Genital Recurrences in Herpes Simplex Virus-Infected Guinea Pigs during and after Treatment. *The Journal of Infectious Diseases*; 183: 844–849.
- Besch, R., Poeck, H., Hohenauer, T., Senft, D., Häcker G, Berking, C., Hornung, V., Endres, S., Ruzicka, T., Rothenfusser, S., Hartmann, G. (2009). Proapoptotic signaling induced by RIG-I and MDA-5 results in type I interferon-independent apoptosis in human melanoma cells. *The Journal Clinical Investigation*; 119: 2399-2411.
- Bier, J., Rapp, H., Borsos, T. (1981). Randomized clinical study on intratumoral BCG-cell wall preparation (CWP) therapy in patients with squamous cell carcinoma in the head and neck region. *Cancer Immunology, Immunotherapy*; 12: 71–79.
- Borghaei, H., Smith, M. R., Campbell, K. S. (2009). Immunotherapy of cancer. *European Journal of Pharmacology*; 625: 41-54.
- Bowie, A. G. (2007). Translational Mini-Review Series on Toll-like Receptors: Recent advances in understanding the role of Toll-like receptors in anti-viral immunity. *Clinical & Experimental Immunology*; 147(2): 217-226.
- Cohen, M., Jessup, J., Felix, E. (1978). Metastatic cutaneous malignant melanoma. A randomized prospective study of intralesional *Bacillus Calmette-Guerin* versus intralesional dinitrochlorobenzene. *Cancer*; 41: 2456-2463.
- Coley, W. B. (1891). Contribution to the Knowledge of Sarcoma. *Annals of Surgery*; 14: 199-220.
- Coley, W. B. (1910). The treatment of inoperable sarcoma by bacterial toxins (The mixed toxins of the *Streptococcus erysipelas* and the *Bacillus prodigiosus*). *Proceedings of the Royal Society of Medicine*; 3: 1-48.

- Connolly, E. C., J. Freimuth, J., Akhurst, R. J. (2012). Complexities of TGF beta targeted cancer therapy. *International Journal of Biological Sciences*; 8: 964-978.
- Cui, Z., Willingham, M. C., Hicks, A. M., Alexander-Miller, M. A., Howard, T. D., Hawkins, G. A., Miller, M. S., Weir, H. M., Du, W., DeLong, C. J. (2003). Spontaneous regression of advanced cancer: identification of a unique genetically determined, age-dependent trait in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 100(11): 6682-6687.
- Cullen, S. P., Martin, S. J. (2008). Mechanisms of granule-dependent killing. *Cell Death & Differentiation*; 15: 251-262.
- DeFranco, A. L., Locksley, R. M., Robertson, M. (2007). Immunity: The immune response in infectious and inflammatory disease. *Primers in Biology*; 387s.
- Dembic Z. (2000). Immune system protects integrity of tissues. *Molecular Immunology*; 37: 563-569.
- Dockrell, D. H., Kinghorn, G. R. (2001). Imiquimod and resiquimod as novel immunomodulators. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*; 48: 751-755.
- Drobits, B., Holcman, M., Amberg, N., Swiecki, M., Grundtner, R., Hammer, M., Colonna, M., Sibilica, M. (2012). Imiquimod clears tumors in mice independent of adaptive immunity by converting pDCs into tumor-killing effector cells. *The Journal of Clinical Investigation*; 122: 575-585.
- Facciabene, A., Motz, G. T., Coukos, G. (2012). T-regulatory cells: key players in tumor immune escape and angiogenesis. *Cancer Research*; 72(9): 2162-2171.
- Fidler, I. J. (1975). Biological behavior of malignant melanoma cells correlated to their survival *in vivo*. *Cancer Research*, 35(1): 218-224.
- Figdor, C. G., van Kooyk, Y., Adema, G. J. (2002). C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells. *Nature Reviews Immunology*; 2(2): 77-84.
- Fikrle, T., Pizinger, K. (2010). Maligní melanom. *Onkologie*. 4(4): 225-228.
- Fiorentino, D. F., Bond, M. W., Mossmann, T. R. (1989). Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *The Journal of experimental Medicine*; 170: 2081-2095.
- Fitch, F. W., McKisick, M. D., Lancki, D. W., Gajewski, T. F. (1993). Differential regulation of murine T lymphocyte subsets. *Annual Review of Immunology*; 11: 29-48.

- Flo, T. H., Halaas, Ø., Lien, E., Ryan, L., Teti, G., Golenbock, D. T., Sundan, A., Espevik, T. (2000). Human toll-like receptor 2 mediates monocyte activation by *Listeria monocytogenes*, but not by group B streptococci or lipopolysaccharide. *The Journal of Immunology*, 164(4): 2064-2069.
- Fritz, J. H., Ferrero, R. L., Philpott, D. J., Girardin, S. E. (2006). NOD-like proteins in immunity, inflammation and disease. *Nature Immunology*; 7: 1250-1257.
- Fu, S., Zhang, N., Yopp, A. C., Chen, D., Mao, M., Chen D., Zhang H., Ding Y., Bromberg J. S. (2004). TGF- $\beta$  induces Foxp3<sup>+</sup> T-Regulatory Cells from CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> Precursors. *American Journal of Transplantation*; 4: 1614-1627.
- Fusek, M., Víttek, L., Blahoš, J. jr., Hajdúch, M., Ruml, T. (2012). *Biologická léčiva: teoretické základy a klinická praxe*. 1. vydání. Grada, 288s.
- Gabay, C., Kuser, I. (1999). Acute - Phase Proteins and Other Systemic Responses to Inflammation. *The New England Journal of Medicine*; 340: 448-454.
- Garay, R. P., Viens, P., Bauer, J., Normier, G., Bardou, M., Jeannin, J. F., Chiavaroli, C. (2007). Cancer relapse under chemotherapy: why TLR2/4 receptor agonists can help. *European Journal of Pharmacology*; 563: 1–17.
- Glaserová, S. (2015). Studium klinicky aplikovatelné nádorové imunoterapie a jejich mechanismů. Diplomová práce. *Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích*; 86s.
- Grange, J. M., Bottaso, O., Standford, C. A., Standford, J. L. (2008). The use of mycobacterial adjuvant-based agents for immunotherapy of cancer. *Vaccine*; 26(39): 4984-4990.
- Gray, J. C., Johnson, P. W. M., Glennie, M. J. (2006). Therapeutic potential of immunostimulatory monoclonal antibodies. *Clinical Science*; 111: 93-106.
- Graziano, D. F., Finn, O. J. (2005). Tumor antigens and tumor antigen discovery. *Cancer Treatment and Research*; 123: 89-111.
- Hammerich, L., Binder, A., Brody, J. D. (2015). In situ vaccination: Cancer immunotherapy both personalized and off-the-shelf. *Molecular Oncology*; 9: 1996-1981.
- Hanahan, D., Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*; 100: 57-70.

- Honeycutt, P. J., Niedel, J. E. (1986). Cytochalasin B enhancement of the diacylglycerol response in formyl peptide-stimulated neutrophils. *The Journal of Biological Chemistry*; 261: 15900.
- Hořejší, V., Bartůňková, J., Brdička, T., Špíšek, R. (2013). *Základy imunologie*. 5. vydání. Triton; 330s.
- Hořejší, V., Bartůňková, J. (2009). *Základy imunologie*. 4. vydání. Triton; 316s.
- Hsu, F. J., Benike, C., Fagnoni, F., Liles, T. M., Czerwinski, D., Taidi, B., Engleman, E. G., Levy, R. (1996). Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nature Medicine*; 2(1): 52-58.
- Hynie, S. (2001). *Farmakologie v kostce*. Triton; 520s.
- Chanmee, T., Ontong, P., Konno, K., Itano, N. (2014). Tumor-Associated Macrophages as Major Players in the Tumor Microenvironment. *Cancers*; 6: 1670-1690.
- Cheng, Y. S., Xu, F. (2010). Anticancer function of polyinosinic-polycytidylic acid. *Cancer Biology & Therapy*; 10(12): 1219-1223.
- Chin, A. I., Miyahira, A. K., Covarrubias, A., Teague, J., Guo, B., Dempsey, P. W., Cheng, G. (2010). Toll-like receptor 3-mediated suppression of TRAMP prostate cancer shows the critical role of type I interferons in tumor immune surveillance. *Cancer Research*; 70: 2595-2603.
- Chow, M. T., Moller, A., Smyth, M. J. (2012). Inflammation and immune surveillance in cancer. *Seminars in Cancer Biology*; 22: 23-32.
- Chumchalová, J., Štěrba, J., Múdrý, P. (2004). Manan vázající lektin a jeho význam v přirozené imunitě. *Česko-slovenská pediatrie*; (9): 477-481.
- Inaba, M., Tashiro, T., Kobayashi, T., Fujimoto, S., Sakurai, Y., Maruo, K., Ohnishi, Y., Ueyama, Y., Nomura, T. (1986). Evaluation of response rates to various antitumor agents of human gastric tumors implanted in nude mouse. *Japanese Journal of Cancer Research*; 77(2): 190-196.
- Ip, W. K. E., Takahashi, K., Ezekowitz, R. A., Stuart, L. M. (2009). Mannose-binding lectin and innate immunity. *Immunological Reviews*; 230: 9-21.

Itoh, N., S. Yonehara, S., A. Ishii, A., M. Yonehara, Mizushima, S. I., M. Sameshima, M., A. Hase, A., Y. Seto, Y., Nagata, S. (1991). The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell*; 66: 233-243.

Janotová, T., Jalovecká, M., Auerová, M., Švecová, I., Bruzlová, P., Maierová, V., Kumžáková, Z., Čunátová, Š., Vlčková, Z., Caisová, V., 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.

Jílek, P. (2005). *Základy imunologie*. Ewopharma s. r. o.; 75s.

Kaisho, T. (2010). Molecular mechanisms for plasmacytoid dendritic cell function and development. *Vaccine*; 28(50): 8046-8047.

Kawasaki, T., Kawai, T. (2013). Toll-like receptor signaling pathways. *Frontiers in immunology*, 5: 461-461.

Kehrl, J. H. (1991). Transforming growth factor-beta: an important mediator of immunoregulation. *The International Journal of Cell Cloning*; 9: 438-450.

Klechevsky, E., Liu, M., Morita, R., Banchereau, R., Thompson-Snipes, L., Palucka, A. K., Ueno, H., Banchereau, J. (2009). Understanding human myeloid dendritic cell subsets for the rational design of novel vaccines. *Human Immunology*; 70(5): 281-8.

Klener, P., Klener, P. jr. (2010). *Nová protinádorová léčiva a léčebné strategie v onkologii*. Grada; 232s.

Klener, P., Klener, P. jr. (2013). *Principy protinádorové systémové léčby*. Grada; 200s.

Kolaczowska E., Kubes P. (2013). Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 13: 159-175.

Krajsová, I. (2006). *Melanom*. 1. vyd. Praha: Jessenius Maxdorf.

Králíčková, P., Krejsek, J., Krémová, I. (2011). Biologická léčba v onkologii. *Praktický lékař*; 4(4): 189-192.

Krejsek, J., Kopecký, O. (2004). *Klinická imunologie*. NUCLEUS HK; 941s.

- Krown, S. E., Hilal, E. Y., Pinsky, C. M., Hirshaut, Y., Wanebo, H. J., Hansen, J. A., Huvos, A. G., Oettgen, H. F. (1978). Intralesional injection of the methanol extraction residue of *Bacillus Calmette-Guerin* (MER) into cutaneous metastases of malignant melanoma. *Cancer*; 42: 2648–2460.
- Kubecová, M., Kindlová, E., Brychta, M., Ambruš, M., Šejdová, M., Loukotková, L., Majirský, M., Pumprlová, A., Odrážka, K., Stejskal, J., Šefrová J. (2011). *Onkologie, učební texty pro studenty 3. Lékařské fakulty UK*. Lékařská fakulta UK; 178s.
- Kumagai, Y., Akira, S. (2010). Identification and functions of pattern-recognition receptors. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*; 125: 985-992.
- Kumar, H., Kawai, T., Akira, S. (2011). Pathogen recognition by the innate immune system. *International Reviews of Immunology*; 30(1): 16-34.
- Kumžáková, Z. (2015). Hledání agonistů Toll-like receptorů použitelných synergicky s ligandy fagocytárních receptorů pro imunoterapii nádorových onemocnění v humánní medicíně. Diplomová práce. *Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích*; 86s.
- Langley, R. G., Sober, A. J. (1997). A clinical review evidence for the role of ultraviolet radiation in the etiology of cutaneous melanoma. *Cancer Investigation*; 15(6): 561-567.
- Le, Y., Li, B., Gong, W., Shen, W., Hu, J., Dunlop, N. M., Oppenheim, J. J., Wang, J. M. (2000). Novel pathophysiological role of classical chemotactic peptide receptors and their communications with chemokine receptors. *Immunological Reviews*; 177: 185.
- Le Mercier, I., Poujol, D., Sanlaville, A., Sisirak, V., Gobert, M., Durand, I., Dubois, B., Treilleux, I., Marvel, J., Vlach, J., Blay, J. Y., Bendriss-Vermare, N., Caux, C., Puisieux, I., Goutagny, N. (2013). Tumor promotion by intratumoral plasmacytoid dendritic cells is reversed by TLR7 ligand treatment. *Cancer Research*; 73: 4629-4640.
- Li, J., Song, W., Czerwinski, D. K. K., Varghese, B., Uematsu, S., Akira, S., Krieg, A. M., Levy, R. (2007). Lymphoma Immunotherapy with CpG oligodeoxynucleotides requires TLR9 either in the host or in the tumor itself. *The Journal of Immunology*; 179: 2493-2500.
- Liao, W., Lin, J.-X., Leonard, W. J. (2013). Interleukin-2 at the Crossroads of Effector Responses, Tolerance, and Immunotherapy. *Immunity*; 38(1): 13-25.



- Lipke, P. N., Ovalle, R. (1998). Cell wall architecture in yeast: New structure and new challenges. *Journal of Bacteriology*; 180(15): 3735-3740.
- Ma, A., Koka, R., Burkett, P. (2006). Diverse functions of IL-2, IL-15, and IL-7 in lymphoid homeostasis. *Annual Review of Immunology*; 24: 657-679.
- Mačák, J., Mačáková, J. (2004). *Patologie*. Grada; 348s.
- Marabelle, A., Kohrt, H., Caux, C., Levy, R. (2014). Intratumoral Immunization: A New Paradigm for Cancer Therapy. *Clinical Cancer Research*; 20: 1747-1756.
- Mattson, G., Conklin, E., Desai, S., Nielander, G., Savage, M. D., Morgensen, S. (1993). A practical approach to crosslinking. *Molecular Biology Reports*; 17(3): 167-183.
- Matsumoto, M., Seya, T. (2008). TLR3: interferon induction by double-stranded RNA including poly (I:C). *Advanced Drug Delivery Reviews*; 60: 805-812.
- Medzhitov, R. (2007). Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*; 449: 819-826.
- Mellman, I., Coukos, G., Dranoff, G. (2011). Cancer immunotherapy comes of age. *Nature*; 480: 480-489.
- Melvin, J., Silverstein, M. J., DeKernion, J., Morton, D. L. (1974). Malignant melanomametastatic to the bladder. Regression following intratumor injection of BCG vaccine. *JAMA*; 229: 688.
- Meylan, E., Tschopp, J., Karin, M. (2006). Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature*; 442: 39-44.
- Mikkonen, K. S., Tenkanen, M. (2012). Sustainable food-packaging materials based on future biorefinery products: xylans and mannans. *Trends in Food Science & Technology*; 28(2): 90-102.
- Morton, D. L., Eilber, F. R., Holmes, E. C., Hunt, J. S., Ketcham, A. S., Silverstein, M. J., Sparks, F. C. (1974). BCG immunotherapy of malignant melanoma: summary of a seven-year experience. *Annals of Surgery*; 180: 635-643.

- Mossman, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A., Coffman, R. L. (1986). Two types of murine helper T cell clone I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *The Journal of Immunology*; 136: 2348-2357.
- Muraoka, R. S., Dumont, N., Ritter, C. A., Dugger, T. C., Brantley, D. M., Chen, J., Easterly, E., Roebuck, L. R., Ryan, S., Gotwals, P. J., Kotliansky, V., Arteaga, C. L. (2002). Blockade of TGF-beta inhibits mammary tumor cell viability, migration, and metastases. *Journal of Clinical Investigation*; 109: 1551-1559.
- Muzio, M., Bosisio, D., Polentarutti, N. (2000). Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *The Journal of Immunology*; 164: 5998-6004.
- Nakamura, K., Yoshikawa, N., Yamaguchi, Y., Kagota, S., Shinozuka, K., Kunimoto, M. (2002). Characterization of mouse melanoma cell lines by their mortal malignancy using an experimental metastatic model. *Life Sciences*; 70: 791-798.
- Nestle, F. O., Kerl, H. (2003). *Melanoma*. In: *Bologna JL*, et al. *Dermatology*. Mosby, 1789-1815.
- O'Connell, J., Bennett, M. W., O'Sullivan, G. C., O'Callaghan, J., Collins, J. K., Shanahan, F. (1999). Expression of Fas (CD95/APO-1) ligand by human breast cancers: significance for tumor immune privilege. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 6(4): 457-463.
- Owen-Schaub, L. B., Yonehara, S., Crump III, W. L., Grimm, E. A (1992). DNA fragmentation and cell death is selectively triggered in activated human lymphocytes by Fas antigen engagement. *Cellular Immunology*; 140: 197-205.
- Palm, N. W., Medzhitov, R. (2009). Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity. *Immunological Reviews*; 227: 221-233.
- Palucka, K., Banchereau, J. (2012). Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nature Review Cancer*; 12(4): 265-277.
- Pardo, J., Wallich, R., Martin, P., Urban, C., Rongvaux, A., Flavell, R. A., Mullbacher, A., Borner, C., Simon, M. M. (2008). Granzyme B-induced cell death exerted by *ex vivo* CTL:

discriminating requirements for cell death and some of its signs. *Cell Death & Differentiation*; 15: 567-579.

Pashov A., Monzavi-Karbassi, B., Kieber-Emmons, T. (2011). Glycan-mediated immune responses to tumor cells. *Human vaccines*; 7: 156-165.

Pepys, M. B., Hirschfield, G. M. (2003). C-reactive protein: A critical update. *The Journal of Clinical Investigation*; 111: 1805-1812.

Perica, K., Varela, J. C., Oelke, M., Schneck, J. (2015). Adoptive T-Cell Immunotherapy for Cancer. *Rambam Maimonides Medical Journal*; 6(1): 1-9.

Petruželka, L., Konopásek, B. (2003). *Klinická onkologie*. Karolinum; 274s.

Pizinger, K. (2003). *Kožní pigmentové projevy*. Grada; 124s.

Pillay, J., den Braber, I., Vrisekoop, N., Kwast, L. M., de Boer, R. J., Borghans, J. A., Tesselaar, K., Koenderman, L. (2010). *In vivo* labeling with 2H<sub>2</sub>O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood*; 116(4): 625-627.

Ramamoorthy, R. D., Nallasamy, V., Reddy, R., Esther, N., Maruthappan, Y. (2012). A review of C-reactive protein: A diagnostic indicator in periodontal medicine. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*; 4(2): 422-426.

Ramm, L. E., Whitlow M. B., Mayer M. M. (1982). Transmembrane channel formation by complement: functional analysis of the number of C5b6, C7, C8, and C9 molecules required for a single channel. *Immunology*; 79: 4751-4755.

Reiniš, M. (2010). Immunotherapy of MHC class I-deficient tumors. *Future Oncology*; 6(10): 1577-1589.

Rejthar, A., Vojtěšek, B. (2002). *Obecná patologie nádorového růstu*. Grada; 208s.

Rigel, D. S., Carruci, J. A. (2000). Malignant melanoma: prevention, early detection, and treatment in the 21<sup>st</sup> century. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*; 50: 215-236.

Ringborg, U., Bergqvist, D., Brorsson, B., Cavallin-Ståhl, E., Ceberg, J., Einhorn, N., Frödin, J. E., Järhult, J., Lamnevik, G., Lindholm, C., Littbrand, B., Norlund, A., Nylén, U., Rosén, M., Svensson, H., Möller, T. R. (2003). The Swedish Council on Technology Assessment in Health Care: systematic overview of radiotherapy for cancer including a prospective

survey of radiotherapy practice in Sweden 2001-summary and conclusions. *Acta Oncologica*; 42: 357-365.

Roesch, A., Volkenandt, M. (2009). *Melanoma*. In: *Braun-Falco' Dermatology. 3rd Edition, Heidelberg: Springer*; 1416-1432.

Sato, S., St-Pierre, C., Bhaumik, P., Nieminen, J. (2009). Galectins in innate immunity: dual functions of host soluble b-galactoside-binding lectins as damage-associated molecular patterns (DAMPs) and as receptors for pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). *Immunological Reviews*; 230: 172-187.

Seidel, U. J. E., Schlegel, P., Lang, P. (2013). Natural killer cell mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity in tumor immunotherapy with therapeutic antibodies. *Frontiers in Immunology*; 4: 76.

Schadendorf, D., Hauschild, A. (2014). Melanoma in 2013: Melanoma - the run of success continues. *Nature Review Clinical Oncology*; 11: 75-76.

Schoenborn, J. R., Wilson, C. B. (2007). Regulation of inteferon-gamma during innate and adaptive immune responses. *Advances in Immunology*; 96: 41-101.

Sica, A., Allavena, P., Mantovani, A. (2008). Cancer related inflammation: The macrophage connection. *Cancer Letter*; 267(2): 204-215.

Singh, M., Khong, H., Dai, Z., Huang, X. F., Wargo, J. A., Cooper, Z. A., Vasilakos, J. P., Hwu, P., Overwijk, W. W. (2014). Effective innate and adaptive antimelanoma immunity through localized TLR7/8 activation. *The Journal of Immunology*; 193: 4722-4731.

Singh, M., Overwijk, W. W. (2015). Intratumoral immunotherapy for melanoma. *Cancer Immunology, Immunotherapy*; 64: 911-921.

Siva, S., Macmanus, M. P., Martin, R. F., Martin, O. A. (2013). Abscopal effects of radiation therapy: a clinical review for the radiobiologist. *Cancer Letters*; S0304-3835: 00672-1.

Stahl, P. D., Ezekowitz, R. (1998). The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense. *Current Opinion in Immunology*; 10(1): 50-55.

Takeuchi, O., Akira, S. (2010). Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell*; 140(6): 805.

- Takeuchi, O., Akira, S. (2007). Recognition of viruses by innate immunity. *Immunological Reviews*; 220: 214-224.
- Tang, C. K., Sheng, K. C., Esparon, S. E., Proudfoot, O., Apostolopoulos, V., Pietersz, G. A. (2009). Molecular basis of improved immunogenicity in DNA vaccination mediated by a mannan based carrier. *Biomaterials*; 30: 1389-1400.
- Taniguchi, S., Kawano, T., Kakunaga, T., Baba. T. (1986). Differences in expression of a variant actin between low and high metastatic B16 melanoma. *The Journal of Biological Chemistry*, 261: 6100-6106.
- Tissari, J., Siren, J., Meri, S., Julkunen, I., Matikainen, S. (2005). IFN- $\alpha$  enhances TLR3-mediated antiviral cytokine expression in human endothelial and epithelial cells by up-regulating TLR3 expression. *The Journal Immunology*; 174: 4289-4294.
- Torres, D., Barrier, M., Bihl, F., Quesniaux, V. J. F., Maillet, I., Akira, S., Ryffel, B., Erard, F. (2004). Toll-like receptor 2 is required for optimal control of *Listeria monocytogenes* infection. *Infection and Immunity*; 72(4): 2131-2139.
- Trinchieri, G. (2003). Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology*; 3(2): 133-146.
- Ueno, H., Klechevsky, E., Schmitt, N., Ni, L., Flamar, A. L., Zurawski, S., Zurawski, G., Palucka, K., Banchereau, J., Oh, S. (2011). Targeting human dendritic cell subsets for improved vaccines. *Seminars in Immunology*; 23(1): 21-27.
- Underhill, D. M., Gantner, B. (2004). Integration of Toll-like receptor and phagocytic signaling for tailored immunity. *Microbes and Infection*, 6(15): 1368-1373.
- van den Boorn, J. G., Hartmann, G. (2013). Turning tumors into vaccines: co-opting the innate immune system. *Immunity*; 39: 27-37.
- VanCompernelle, S. E., Clark, K. L., Rummel, K. A., Todd, S. C. (2003). Expression and Function of Formyl Peptide Receptors on Human Fibroblast Cells. *The Journal of Immunology*; 171(4): 2050-2056.
- Větvička, V., Dvořák, B., Větvičková, J., Richter, J. (2007). Orally administered marine (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -d-glucan Phycarine stimulates both humoral and cellular immunity. *International Journal of Biological Macromolecules*; 40: 291-298.
- Vorlíček, J., Abrahámová, J., Vorlíčková, H. (2012). *Klinická onkologie pro sestry*. Grada; 448s.

- Wallecha, A., Maciag, P. C., Rivera, S., Paterson, Y., Shahabi, V. (2009). Construction and characterization of an attenuated *Listeria monocytogenes* strain for clinical use in cancer immunotherapy. *Clinical and Vaccine Immunology*; 16(1): 96-103.
- Wattel, E. Preudhomme, C., Hecquet, B., Vanrumbeke, M., Quesnel, B., Dervite, I., Morel, P., Fenaux, P. (1994). p53 mutations are associated with resistance to chemotherapy and short survival in hematologic malignancies. *Blood*; 84: 3148-3157.
- Weinberg, R. A. (1989). Oncogenes, antioncogenes, and the molecular bases of multistep carcinogenesis. *Cancer Research*; 49: 3713-3721.
- Wepsic, H. T. (1983). Overview of oncofetal antigens in cancer. *Annals of clinical and laboratory science*; 13(4): 261-262.
- Whiteside, T. L. (2010). Immune responses to malignancies. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*; 125: 272-283.
- Wicks, I. P., Roberts, A. W. (2015). Targeting GM-CSF in inflammatory diseases. *Nature Reviews Rheumatology*; 12: 37-48.
- Williams, B. A. R., Caput, J. C. (2010). Synthesis of Peptide-Oligonucleotide Conjugates Using a Heterobifunctional Crosslinker. *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*; 4: Unit 4.41.
- Willment, J. A., Brown, G. D. (2008). C-type lectin receptors in antifungal immunity. *Trends in Microbiology*; 16: 27-32.
- Yeeprae, W., Kawakami, S., Yamashita, F., Hashida, M. (2006). Effect of mannose density on mannose receptor-mediated cellular uptake of mannosylate O/W emulsions by macrophages. *Journal of Controlled Released*; 114(2): 193-201.
- Yildiz, S. Y., Oner, E. T. (2014). Mannan as promising bioactive material for drug nanocarrier systems. *Application of Nanotechnology in Drug Delivery*; 311-327.
- Yonehara, S., Ishii, A., Yonehara, M. (1989). A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen codownregulated with the receptor of tumor necrosis factor. *The Journal of Experimental Medicine*; 169: 1747-1756.

Zani, I. A., Stephen, S. L., Mughal, N. A., Russell, D., Homer-Vanniasinkam, S., Wheatcroft, S. B., Ponnambalam, S. (2015). Scavenger receptor structure and function in health. *Cells; 4*: 178-201.