

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta**

**Optimalizace nádorové imunoterapie založené na
použití agonistů receptorů TLR2, TLR3 a TLR7
v synergii s kotveným mananem**

Bakalářská práce

Karolína Holková

Školitel: RNDr. Jan Ženka, CSc.

České Budějovice 2018

Holková, K., 2018. Optimalizace nádorové imunoterapie založené na použití agonistů receptorů TLR2, TLR3 a TLR7 v synergii s kotveným mananem. [Optimization of tumor immunotherapy based on the use of TLR2, TLR3 and TLR7 receptor agonists in synergy with anchored mannan. Bc. Thesis, in Czech.] - 53 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation

Immunotherapy based on combination of TLR agonists with phagocytosis stimulation was studied and the effect of addition of checkpoint inhibitor anti-CTLA-4 was evaluated. The possibility of optimization of cancer immunotherapy was tested and mechanisms of this therapy are discussed.

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, 18. 4. 2018

.....

Karolína Holková

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli RNDr. Janu Ženkovi, CSc., za vedení mé bakalářské práce, za rady a za možnost se podílet na řešení tohoto problému. Také chci poděkovat své rodině a přátelům, kteří tu pro mě byli a byli mi oporou.

Obsah

Úvod.....	1
1 Nádor	2
1.1 Příčina vzniku nádoru.....	2
1.2 Rozdělení nádorů.....	3
2 Melanom.....	5
2.1 Melanom B16-F10	5
3 Terapie.....	6
3.1 Záměr léčby.....	6
3.2 Způsob léčby	6
3.2.1 Chirurgie	6
3.2.2 Radioterapie	7
3.2.3 Chemoterapie	7
4 Nádory a imunita	8
4.1 Imunitní systém	8
4.2 Obrana nádoru před imunitním systémem	8
4.3 Nádorové antigeny	8
5 Získaná imunita	10
5.1 Inhibiční a stimulující imunitní kontrolní body	10
6 Vrozená imunita	12
6.1 Fagocytóza	13
7 Imunoterapie.....	14
7.1 Imunoterapie založená na získané imunitě.....	14
7.1.1 Terapeutická vakcinace.....	16
7.2 Imunoterapie založená na vrozené imunitě.....	17
7.2.1 PAMPs – molekulové vzory spojené s patogenem.....	18
7.2.2 PRRs – receptory rozpoznávající vzory.....	18
7.2.3 Toll-like receptor	20
7.2.3.1 Agonisté Toll-like receptorů využité v této práci.....	22
8 Cíle práce.....	24
9 Materiál	25
9.1 Chemikálie	25
9.2 Laboratorní zvířata	25
9.3 Linie nádorových buněk.....	25
10 Metody	26
10.1 Příprava nádorových buněk myšního melanomu B16-F10.....	26
10.2 Příprava manan-BAM	26
10.3 Příprava hydrochlorid Resiquimodu (R-848).....	26
10.4 Transplantace melanomových buněk B16-F10.....	26
10.5 Měření velikosti nádoru	27
10.6 Statistické vyhodnocení.....	27

10.7	Pokus č. 1: Intratumorální aplikace anti-CTLA 4 samotné a v synergii TLR agonistů s kotveným mananem	27
10.8	Pokus č. 2: Intratumorální terapie založená na redukovaném počtu terapeutických dávek 28	
11	Experimentální výsledky	30
11.1	Pokus č. 1: Intratumorální aplikace anti-CTLA 4 samotné a v synergii TLR agonistů s kotveným mananem	30
11.2	Pokus č. 2: Intratumorální terapie založená na redukovaném počtu terapeutických dávek 32	
12	Diskuze	35
	Závěr	38
	Literatura	39
	Seznam obrázků	52
	Seznam tabulek	53

Úvod

V České republice jsou nádorová onemocnění na druhém místě nejčastějších příčin smrti. První místo si zatím drží kardiovaskulární onemocnění (Dientsbier a Skala, 2014). Pomalu se však rakovina stává podstatným problémem pro celý svět. Podle odhadů vzroste v roce 2030 počet nemocných téměř trojnásobně. Jedna z hlavních příčin neustálého růstu počtu pacientů s nádorovým onemocněním je pokrok v medicíně. Díky tomuto pokroku se lidstvo dožívá vyššího věku. Ovšem s vyšším věkem je i vyšší riziko výskytu rakoviny. Čím déle žijeme, tím déle jsme vystavováni karcinogenním faktorům. Tkáně starých lidí jsou náchylnější ke změnám, ať způsobených právě karcinogeny nebo tělu vlastními procesy (Petruželka, 2009).

Je prokázána spojitost mezi nádorovým onemocněním, špatným stravováním a kouřením. Faktory jako kouření, strava, minimální fyzická aktivita, přílišná spotřeba alkoholu a stres, které mohou být činiteli pro vznik rakoviny, řadí toto onemocnění mezi civilizační choroby (Petruželka, 2009).

Jen v roce 2015 umřelo na celém světě na rakovinu 8,8 milionů obyvatel. Rakovina plic je zodpovědná za nejčastější úmrtnost ze všech nádorových onemocnění. Na rakovinu plic celosvětově umírá 1,69 milionů obyvatel, na rakovinu jater 788 000 obyvatel, na rakovinu tlustého střeva a konečníku 774 000 obyvatel, na rakovinu žaludku 754 000 obyvatel a na rakovinu prsu 571 000 (WHO, 2017).

1 Nádor

Nádor lze popsat jako skupinu morfologicky pozměněných buněk rostoucích nezávisle na řídicích mechanismech. Nejčastěji se projevuje jako zvětšení orgánu, který buňky obývají (Stříteský, 2001). Avšak proces nekontrolovatelného růstu a napadání zdravé tkáně probíhá i poté, co příčina, jež způsobila tento stav, přestala působit (Mačák a Mačáková, 2004).

Weinberg s Hanahem v roce 2000 navrhli šest základních rysů, které se zdají být zásadní ve vývoji rakoviny. Mezi rysy patří soběstačnost růstových signálů, neomezený replikační potenciál, necitlivost na signály inhibující růst, angiogeneze, odolnost vůči apoptóze a invazivita a tvorba metastáz (Weinberg a Hanahan, 2000). Trochu to rozvedu.

Soběstačnost růstových signálů zajišťuje buňce neomezený a nekontrolovatelný růst. Stávají se tak víceméně nezávislými na normálních tkání ve svém okolí. K neomezenému růstu je však také potřebná angiogeneze. Angiogeneze je tvorba krevních cév, kterými jsou nádorové buňky zásobované kyslíkem a potřebnými výživovými složkami. Kromě zásobení mají i funkci odvodu oxidu uhličitého a metabolitů. Kromě soběstačnosti v procesu růstu nejsou nádorové buňky citlivé na růst inhibující signály. Růst inhibující signály udržují homeostázu a buněčnou stagnaci. Aby nádorové buňky mohly prospívat, musejí se těmto signálům vyhnout (Weinberg a Hanahan, 2000). Kromě ztráty citlivosti k inhibujícím signálům jsou odolné vůči apoptóze, čímž si zajistí přežití, protože apoptóza by snížila počty nádorových buněk a zamezila růst (Weinberg a Hanahan, 2011). Posledním, a ne zrovna malým problémem je invazivita a tvorba metastáz (Gupta a Massagué, 2006). Tento problém se vyskytuje jen u maligních nádorů. Nádor se „rozpadá“ vlivem ztráty adhezivních molekul, který pojí buňky k sobě. Rozvolněné buňky proniknou do krevních nebo lymfatických tkání a jsou zaneseny do vzdálených tkání, kde se mohou usadit (Weinberg a Hanahan, 2000).

1.1 Příčina vzniku nádoru

Buňky se dělí neustále. Při dělení může dojít k změně v DNA. Pokud se takto poškozená buňka vyhne kontrole a dál se množí, vznikne nádorová buňka. Obvykle nestačí jen jedna změna, ale cca 5 až 10 mutací, aby se buňka mohla transformovat z normální na nádorovou (Masopust a Průša, 2003). Genetické mutace bývají způsobeny vnějšími vlivy, tedy vlivy životního prostředí nebo našeho životního stylu. Takovýmto způsobem vzniká 90-95 % rakovin. Pod zbylých 5-10 % spadají dědičné genetické mutace (Anand a kol., 2008).

Za vnější vlivy považujeme chemické látky, jinak nazývané kancerogeny. Mezi takovéto kancerogeny patří aromatické uhlovodíky, látky odvozené z dehtu, aflatoxin (toxin

produkovaný některými plísněmi), vinylchlorid nebo kouř z cigaret. Z fyzikálních faktorů má největší vliv na transformaci záření jak rentgenové, UV, tak klasické záření s krátkou vlnovou délkou. Teď jsme si řekli, že záření mutace způsobuje, ale jsou případy, kdy určitá dávka může nádor pomoci vyléčit. Například při radioterapii, kdy se radiace používá k léčbě, nikoliv k vytvoření nádoru. Viry také mohou způsobit nádorové bujení. Mezi takové viry patří vir Epstein-Baarové, herpes viry a papilomaviry. Dalšími faktory jsou hormony, pakliže jsou produkovány ve větším množství, než je obvyklé. Například hormon estrogen v přílišném množství způsobuje karcinomy především u žen, a to karcinom vaječnicků, prsu a děložní sliznice (Krejčík a Dvořáček, 1978).

Co se týká faktorů životního stylu, jedná se především o stravu. Pokud je naše strava bohatá na nasycené mastné kyseliny (uzeniny, máslo, tučné mléčné výrobky), ale postrádá vlákninu a antioxidanty (ovoce, zelenina), můžeme vytvořit základ pro vážný problém, například obezitu. Obezita se považuje za hlavní faktor vzniku nemoci diabetes nebo karcinomu tlustého střeva (Pelengaris a Khan, 2006). Za důležitý faktor je také považován věk. Co se věku jako hlavního činitele týče, nejvíce postižené bývají starší populace, kterých se týká karcinom prostaty a kůže. Ale rakovinou mohou onemocnět i mladí lidé, například některými druhy leukémií (Franks a Teich, 1997).

1.2 Rozdělení nádorů

Nádory můžeme rozdělit podle biologických vlastností nabenigní neboli nezhoubné, které se označují expanzivním růstem, kdy mechanicky utlačují okolí. Nejsou metastazující a zdržují se ve své lokalitě. Většinou nejsou pro organismus nebezpečné, ale to neznamená, že takový nádor může v těle zůstat. Pak maligní neboli zhoubné, které rostou invazivním způsobem. Buňky vrůstají do okolních tkání, kterou tak poškozují a nakonec ničí. Na rozdíl od nemetastazujících benigních nádorů, maligní metastazují a vytvářejí tak druhová ložiska ve vzdálenějších tkáních a orgánech (Vorlíček, 2006).

Další dělení se rozlišuje podle tkáňového původu. Nádory z epiteliálních buněk, které zahrnují nejčastější druhy nádorů jako rakovina prsu, prostaty, plic, tlustého střeva. Z hemopoetických buněk, jinak krvetvorných, vznikají lymfomy a leukemie. Jiné nádory vznikají ze zárodečných tkání, přesněji z pluripotentních buněk, které se vyskytují ve vaječnicích a varlately. Nádory pojivové tkáně zahrnují rakovinu vzniklou z kostí, chrupavky, tuku a nervů. Z pigmentových buněk vzniká nejčastěji melanom kůže. Máme i smíšené nádory vzniklé z více tkání (Varricchio, 2004).

A poslední dělení je podle místa nálezu. Tedy místa, kde přesně nádor roste. Patří sem nádory prsu, plic, močového měchýře, kolorekta nebo kůže (Siegel a kol, 2015).

2 Melanom

Melanom je shluk zhoubně transformovaných melanocytů, je agresivní a odolný proti léčbě (Markovic a kol, 2007). Řadí se k nejzhoubnějším nádorům vůbec (Štork a kol, 2008).

Maligní melanom můžeme najít všude, kde se vyskytují melanocyty (pigmentové buňky), nejde tedy jen o problém kůže. Primárně se může také vytvořit v oku, plicích, trávicím ústrojí, žlučníku, močovém měchýři nebo ováriích. Ovšem v těchto orgánech se maligní melanom vyskytuje vzácně (Štork a kol, 2008).

Použitím vícerozměrné analýzy byly zjištěny rizikové faktory, které mohou nezávisle ovlivnit šanci zrodu maligního melanomu. Zvýšené riziko vzniku hrozí lidem světlejšího typu, tedy lidem s blond nebo zrzavými vlasy. Lidem, kteří mají v horní části zad hojné množství pih, kteří v pubertě trávili letní měsíce prací venku na slunci tři a více let, anebo utrpěli tři a více spálenin s puchýřky (Rigel a Carucci, 2000).

Samozřejmě, pokud víte, že se ve Vaší rodině maligní melanom objevil, je pravděpodobnost, že stejný osud může potkat i Vás (Rigel a Carucci, 2000).

Prakticky není úplně přesný seznam věcí, které bychom měli či neměli dělat, abychom snížili pravděpodobnost vzniku melanomu. Můžeme v rámci prevence udělat jen tři věci. Chránit se před slunečním zářením, s podezřením na nová znaménka na těle navštívit dermatologa, a v neposlední řadě si můžeme nechat udělat ve specializované laboratoři rozbor DNA a zjistit, jestli nemáme predispozice k vážným nemocem.

2.1 Melanom B16-F10

Melanom B16 je linie myších nádorových buněk odvozených z myši C57BL/6. Přesněji z nádoru, který se roku 1954 objevil na uchu této myši. Linie se používá ve výzkumu jako model lidského melanomu. Zároveň slouží pro studium metastáz (Teicher, 2002). Je více linií buněk B16 a to B16-F0 až B16-BL6. Pro zajímavost víme, že první linií byla linie B16-F1 a teprve z ní byly odvozeny ostatní linie. A ne jak by se dalo předpokládat za počátek B16-F0 (Krejčová, 2016). Konkrétně linie B16-F10 pocházející z původní linie B16 se vyznačuje nejrychlejším množením ze všech linií a metastazuje do okolních tkání, a především do plic (Danciu a kol, 2013).

3 Terapie

Stejně jako máme léčebné postupy různých nemocí, máme i metody, kterými léčíme rakovinu. Terapii můžeme rozdělit na záměr léčby a způsob léčby.

3.1 Záměr léčby

Kurativní záměr

Cílem této léčby je úplné vyléčení, s co nejdelším časovým obdobím bez návratu rakoviny (Adam a kol, 2011).

Paliativní záměr

Cílem je zbavení příznaků nemoci a zastavení či alespoň zpomalení růstu nádoru. V této fázi už není kurativní léčba možná, tak se paliativní snaží ulehčit a zkvalitnit život nemocného (Klener, 2002).

Symptomatický záměr

Cílem je utišit bolest a zkvalitnit život. Pokud dojde až na symptomatickou léčbu, je rakovina v takové fázi, kdy kurativní ani paliativní léčba již není možná (Klener, 2002).

3.2 Způsob léčby

3.2.1 Chirurgie

Jedná se o nejstarší metodu eliminace nádoru. Už ve starověku se lékaři pokoušeli rakovinu vyléčit jejím vyjmutím z těla. Bohužel se nemoc obvykle vrátila i po operaci. Chirurg Paget prohlásil, že nádorové buňky metastazují (Sudhakar, 2009). Buňky se pravděpodobně při migraci usadili v jiné tkáni, kde se začaly množit, a vznikl druhotný nádor. Tím se dá vysvětlit návrat nemoci.

V 19. století se prováděly operace, kde se odebírali i lymfatické uzliny (Sudhakar, 2009). Dá se předpokládat, že po takovém to zákroku se nádor už nevrátil. Je známo, že kreví nebo právě mízou cestují i cizorodé částice, kupříkladu nádorové buňky, které mohou dostat do lymfatických cév, kde mohou vznikat metastázy.

Bohužel chirurgický zákrok se dá použít pouze na nádory, které jsou dobře dostupné a nejsou hodně rozsáhlé.

3.2.2 Radioterapie

Vědci zjistili, že radiační paprsky mohou způsobit rakovinné bujení, ale také jej ukončit (Sudhakar, 2009). Terapie používá radiaci k ozáření poškozených buněk a snaží se co nejvíce ušetřit okolní tkáň (Bucci a kol, 2005). Bohužel nejde záření zacílit jen na poškozené buňky, a tak jsou zasaženy i buňky normální, z kterých může vzniknout sekundární nádor, většinou zhoubný (Bostrom a Soloway, 2007). Záření vytváří ionty, které při průchodu buňkou zanechají energii uvnitř. Energie poškodí DNA, která blokuje dalšímu rozdělování a proliferaci buňky a zastavuje tak nádorový růst (Jackson a Bartek, 2010).

3.2.3 Chemoterapie

Zatímco chirurgie léčí rakovinu fyzicky, chemoterapie se pokouší zničit nádor uvnitř těla bez vnějšího zásahu. Ačkoliv chemoterapie pomáhá nádor zničit, má i vedlejší účinky jako vypadávání vlasů nebo myelosupresi (útlum krvetvorby) (Gerber, 2008). Chemoterapie, stejně jako radioterapie se může kombinovat. Jednou léčbou se může nádor oslabit a druhá léčba může nádor snadněji usmrtit. Například když se chemoterapie použije před operací na oslabení nebo po operaci na zničení zbytků, které ve tkáni zůstaly (Stachová, 2017).

K léčení se používají cytostatika (Vorlíček a kol, 2013). Cytostatika nejvíce postihují rychle proliferující buňky, ale také zasahují zdravé buňky, které svou toxicitou poškozují (Martins a de Oliveira, 2009). Nádorové buňky jsou právě ty, na která cytostatika cílí. Na takovou buňku nepůsobí žádné inhibující signály, a tak roste a množí se bez omezení, čímž na sebe cytostatika upozorní. Zdravé buňky sice mají omezený růst díky inhibujícím signálům, ale cytostatika mohou ovlivnit celý buněčný cyklus nebo jen jeho část, proto ani zdravé nezmutované buňky nejsou a nemohou být zasaženy (Baudino, 2015).

4 Nádory a imunita

4.1 Imunitní systém

Imunitní systém zajišťuje celistvost organismu. Rozlišuje cizí částice od vlastních, přičemž cizí musí zničit, aby ochránil organismus před vnější hrozbou (infekce, ...). Nerozpozná pouze cizí od vlastních, ale dohlíží i na vlastní buňky, mezi kterými se mohou ukrývat škodliviny. Proto průběžně eliminují poškozené, zmutované a staré buňky (Hořejší a Bartůňková, 2009).

4.2 Obrana nádoru před imunitním systémem

Nádory mají nízkou expresi MHC I molekul, které brání rozpoznat imunitnímu systému nádor od vlastní tkáně (Hicklin a kol, 1999). Také málo exprimují nádorové antigeny, které vedou ke vzniku metastáz (Kim a kol, 1972). Ale exprimují i imunosupresivní faktory (faktory, díky kterým organismus reaguje omezeně na antigen tvorbou protilátek): TGF beta vyvolává tvorbu T regulačních lymfocytů z CD4+ (pomocných) lymfocytů. T regulační lymfocyty zároveň produkují TGF beta, a tak to pokračuje dokola. Přímý kontakt T regulačních lymfocytů nebo TGF beta s cytotoxickým lymfocitem potlačí útok cytotoxických lymfocytů. Interleukin 10, který je také produkován T regulačním lymfocitem, snižuje expresi MHC I molekul a omezuje fungování T lymfocytů (Facciabene a kol, 2012). Nádory zvyšují hladinu Fas ligandu (stimuluje apoptózu buněk), který po spolupráci s Fas receptorem efektorových buněk způsobuje jejich vlastní smrt. Snížením hladiny Fas receptoru vyvolají odolnost nádoru před apoptózou (Cascino a kol, 1996). Důležitá je exprese TLR receptorů na povrchu nádorových buněk, ta totiž vede k proliferaci, cytotoxickému ataku a rezistenci k apoptóze (Huang a kol, 2005).

4.3 Nádorové antigeny

Buňky prezentují na svém povrchu antigeny pomocí MHC molekul a pomáhají stimulovat T lymfocyty. Víme, že zdravé buňky jsou mutacemi transformovány v nádorové buňky. Dá se předpokládat, že touto změnou procházejí i antigeny prezentované na nádorových buňkách. Nádorové antigeny se dají rozdělit do dvou skupin.

TSA (tumor specific antigens), nádorově specifické antigeny, se vyskytují pouze na nádorech, což je výhoda, protože jinde, než na nádorech je nenajdeme (Philipps a kol, 1985). Dříve se k léčbě moc nevyužívaly kvůli přílišné specifikaci. Jednak nebylo lehké takovou

specificitu dostatečně identifikovat, a také co nádor to jedinečnost. Tudíž i specifické antigeny jsou jen na některých nádorech, na jiných jsou specifické jinak. Ovšem má to i výhodu v tom, že na určitou specifčnost by se mohla vytvořit konkrétní léčba, která by působila pouze proti určitým buňkám, a tedy nepůsobila na buňky, které specifický antigen neobsahují (Parmiani a kol, 2007).

TAA (tumor associated antigens), nádorově asociované antigeny, se objevují nejen na nádorech ale i na jiných buňkách. Dokážeme však od sebe odlišit zdravé buňky od nádorových tak, že u každých buněk se antigeny exprimují v jiný čas, v jiném množství (u zdravých buněk v menším množství) a na jiném místě (Hořejší a Bartůňková, 2005). Nádorově asociované antigeny mohou posloužit jako markery, které napomáhají k diagnostice rakoviny (Old a Chen, 1998). Patří sem prostatický specifický antigen (produkované buňkami prostaty), onkofetální antigeny (nacházejí se v embryonálních buňkách), metastázové antigeny a melanomové antigeny (Klener a Klener jr., 2013).

5 Získaná imunita

Na rozdíl od vrozené nespecifické imunity se získané imunitě jinak říká specifická. A to z důvodu, že pracuje se specifickými antigeny. Dokáže rozpoznat nejjemnější rozdíly mezi jednotlivými antigeny, a tudíž nemůže spolupracovat s každým antigenem, který potká (Ferenčík a kol, 2000). Získaná imunita se vyznačuje diverzitou, kdy dokáže vytvořit ohromné množství strukturně odlišných struktur, které dokážou rozpoznat různé antigeny. Kromě schopnosti rozpoznání odlišností mezi antigeny, a tvorby struktur pro rozpoznání antigenů, má také imunologickou paměť, díky které při pozdějším setkání reaguje rychleji a efektivněji (Bonilla a Oettgen, 2010).

Získaná imunita používá k obraně těla před mikroorganismy mechanismy imunitního typu. K těmto mechanismům se řadí humorální a buněčná odpověď.

K buňkám získané imunity se řadí B lymfocyty a T lymfocyty. B lymfocyty po setkání s antigenem začnou proliferovat a jejich klony se diferencují na plazmatické a paměťové buňky. Plazmatické buňky produkují protilátky, zatímco paměťové právě zastupují imunologickou paměť (LeBien a Tedder, 2008). Tedy tyto buňky si pamatují své setkání s antigenem a při dalším setkání tak taky reaguje. Ačkoliv je při dalším setkání odpověď rychlejší a efektivnější, stále je imunitní odpověď získané imunity pomalejší než vrozené imunity. Pomalost zajišťuje právě fakt, že nejprve se musí buňky rozmnožit, vyprodukovat nějaké protilátky a pak teprve se může něco stát. T lymfocyty se stejně jako B lymfocyty aktivují po setkání s antigenem. Ovšem tady je rozdíl v tom, že B lymfocyty rozpoznávají antigen samotný a T lymfocyty ve spojení s molekulami hlavního histokompatibilního komplexu (MHC) (Springer, 1990). U T lymfocytů také probíhá po aktivaci nejprve proliferace a později diferenciaci na paměťové a efektorové buňky. Paměťové buňky mají stejnou funkci jako i B lymfocytů, ovšem efektorové buňky T lymfocytů se diferencují na cytotoxické CD8⁺ buňky a pomocné CD4⁺ buňky. Pomocné Th buňky produkují lymfokiny, které podporují aktivitu cytotoxických Tc buněk, které po aktivaci mohou zabíjet vlastní pozměněné buňky (Litzman a kol, 2001).

5.1 Inhibiční a stimulující imunitní kontrolní body

Imunitní kontrolní body regulují imunitní systém a dělí se na stimulující a inhibující.

Stimulační kontrolní body podporují aktivaci naivních T lymfocytů, paměťové, efektorové a T regulační buněčné odpovědi. Inhibiční kontrolní body omezují aktivaci T buněk a dobu trvání imunitní odpovědi (Sharpe, 2017). Kontrolní body jsou nádory

využívány k ochraně před atakem imunitního systému (Pardoll, 2012). V protinádorové terapii se využívají protilátky k zablokování inhibičních kontrolních bodů, čímž se aktivuje imunitní odpověď, která byla omezována právě inhibičními kontrolními body.

Mezi inhibiční kontrolní body patří například PD-1, CTLA-4. K stimulujícím bodům zase například CD-40. V terapii se používají jejich anti protějšky (anti PD-1, anti CTLA-4).

PD-1 (Programmed cell death protein 1, CD279) je buněčný receptor, který potlačuje zánětlivou aktivitu T lymfocytů a podporuje tak autotoleranci (Francisco a kol, 2011). Po navázání ligandu PD-L1 a PD-L2 (Programmed death ligand) navozuje apoptozu (programovanou buněčnou smrt) u T lymfocytů, které se setkaly s antigenem na cílové buňce nebo na buňce antigen prezentující (Fife a Pauken, 2011). U T regulačních lymfocytů působí obráceně a místo vyvolání apoptozy stimuluje proliferaci a aktivitu těchto lymfocytů (Francisco a kol, 2009). Použití anti PD-1, tedy potlačení inhibičního PD-1 receptoru, vede k aktivaci a zvýšené aktivitě T lymfocytů a k potlačení aktivity T regulačních lymfocytů.

CTLA-4 (Cytotoxic T Lymphocyte-associated protein 4, CD152) je receptor, který snižuje imunitní odpověď. Antigen prezentující buňky exprimují molekuly CD80 a CD86, které po navázání na receptor CTLA-4 inhibují aktivitu T lymfocytů (Kvistborg a kol, 2014). Také dochází k inhibici aktivace cytotoxických T-lymfocytů. CTLA-4 je také exprimován na regulačních T-lymfocytech, které jsou zodpovědné za imunosupresi (Klener a Klener jr., 2013). Podání anti-CTLA-4 vede ke zvýšené aktivaci a proliferaci T lymfocytů.

CD-40 je proteinový receptor a patří ke stimulujícím kontrolním bodům. Je exprimován antigen prezentujícími buňkami. Navázání ligandu CD-40L (nebo jinak označovaný CD154) na pomocné T lymfocyty navozuje zrání dendritických buněk a stimulaci jejich aktivity. Anti CD-40 plní funkci agonisty CD-40 receptoru. Při stimulaci dendritických buněk pomáhá k aktivaci složek získané imunity a jejich následnou reakci (Bajor a kol, 2015).

6 Vrozená imunita

Vrozená imunita nebyla několik let považována za spojence získané imunity. Každá byla brána jako samostatná část. Vrozená imunita byla brána jako méně důležitá v hierarchii imunitních funkcí (Medzhitov a Janeway, 1997).

Jinak se jí říká i nespecifická z důvodu, že se nespécializuje na určité antigeny, ale brání organismus proti odlišným patogenům. Reaguje na setkání s patogenem okamžitě a při každém dalším setkání reaguje stejně. Svou reakci ani rychlost odpovědi nemění, protože nemá imunitní paměť, na rozdíl od získané imunity. Vrozená imunita používá k obraně organismu obranné mechanismy neimunitního typu, zatímco získaná používá mechanismy imunitního typu.

Mezi mechanismy obrany vrozené imunity neimunitního typu patří anatomická bariéra, kdy kůže, sliznice a jimi produkované hleny, sliny a slzy vytvářejí bariéru mezi vnitřním a vnějším prostředím. Dá se tedy říci, že při pláči čistíme pokožku od bakterií. Pod fyziologickou bariéru spadá tělesná teplota, kdy mnoho mikroorganismů pro nás škodlivých nepřežije ve vyšších teplotách (cca kolem 37 °C a vyšších) a pH sekretů, kdy opět většina patogenů není schopna přežít v kyselém prostředí (Šterzl, 2007).

Aby buňky mohly rozpoznat patogenní antigeny, mají na svém povrchu receptory, které jsou zakódované v zárodečné DNA. Cílem vrozené imunity není poznat každý patogen, ale receptory na buňkách vrozené imunity se soustředí na struktury, které se vyskytují na mnoha mikroorganismech (Krejsek a Kopecký, 2004). PAMPs (pathogen-associated molecular patterns), molekulové vzory spojené s patogenem, jsou rozpoznávány PRRs (pathogen-recognition receptors) nebo Toll-like receptory (Maverakis a kol, 2015). Receptory mohou rozpoznat cizí molekuly i specificky exprimováním receptorů pro Fc fragmenty protilátek a složky komplementu. Ty působí jako opsoniny a jsou to právě ony, kdo označují částici jako cizorodou a představují ji pro fagocyt mnohem přitažlivější. Dalšími opsoniny jsou například fibrinogen, C-reaktivní protein, MBL (manose-binding lectin, lektin vážící mannosu) (Šterzl, 2007).

PAMPs se vyskytují na patogenech, ale pokud je „patogenní“ nebo nakažená vlastní buňka, vystaví na svém povrchu antigen cizího mikroorganismu a informují tak okolní buňky, zejména buňky schopné fagocytózy, že jsou napadené a měly by být eliminovány, aby se patogen nemohl dál množit. Pokud makrofág pohltí patogen, podnítl tak odpověď vrozené imunity (Aderem s Underhill, 1999). Na rozdíl od získané imunity přichází okamžitá reakce a nečeká se na buněčnou proliferaci (Krejsek a Kopecký, 2004).

6.1 Fagocytóza

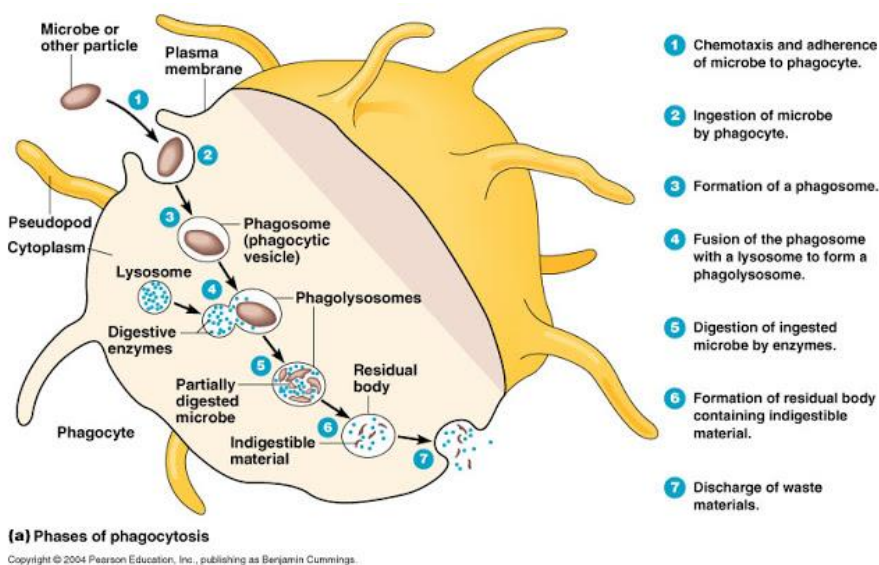
Za základní mechanismus vrozené imunity se považuje fagocytóza. Fagocytóza se dá považovat za prostředník, který spojuje specifickou a nespecifickou imunitu. V první řadě odstraňuje tělu škodlivé mikroorganismy a v druhé vstřebané antigeny upraví do podoby, která spustí procesy specifické imunity (Horváthová, 2014).

Mezi buňky s největší fagocytární schopností se řadí monocyty, neutrofilní granulocyty a tkáňové makrofágy (Šterzl, 2007).

Fagocytóza začíná ve chvíli, kdy chemotaktické signály vytvoří koncentrační gradient, jejímž směrem (směrem největší koncentrace signálu) se buňky pohybují. Za chemotaktické faktory považujeme například cytosin interleukin-8, který přitahuje neutrofile (Hořejší a Bartůňková, 2009). Signál může přijít jak od bakterií, které se dostaly těle, tak z vnitřku těla (Ferenčík, 2005).

Po nalezení patogenu přilne fagocyt na cizorodou částici a svými pseudopodii částici obklopí. Po úplném obklopení se vytvoří fagozom, který se sloučí s lysozomem. Lysozom obsahuje baktericidní látky a hydrolytické enzymy v tekutině o pH 4-5. Všichni tyto činitele napadnou patogenní částice, usmrtí je, rozloží a vyloučí pryč (Hořejší a Bartůňková, 2009).

Už bylo řečeno, že PAMPs a cizí antigeny jsou rozpoznávané PRRs. Aby nedocházelo k napadení vlastních zdravých buněk, mají buňky na svém povrchu ochranné proteiny. Tyto proteiny emitují inhibiční signály, například signál don't eat me (Horváthová, 2014).



Obr.1: Proces fagocytózy; (převzato z: <http://mad-physio.blogspot.cz/2010/07/what-is-infection-physical-barriers-and.html>).

7 Imunoterapie

Imunoterapie využívá buňky vlastního těla nebo látky uměle vyrobené na základě látek, které jsou tělu vlastní. Tyto syntetické látky mohou několikanásobně převýšit schopnosti přirozeně vyprodukovaných látek. Využívají se ke stimulaci imunitní odpovědi.

Imunoterapie se používá ve chvílích, kdy je nádor odstraněn, ale stále je možné, že v těle přebývají zbytkové nádorové buňky, které nejsou prokazatelně běžně používanými molekulárně biologickými metodami (Hořejší a Bartůňková, 2009).

Terapie cílí na určité molekuly. Není tedy možné léčbu uplatnit na všechny nádory. Každý nádor má své specifické molekulové změny, nádorové antigeny, které nejsou na všech nádorech stejné (Baudino, 2015).

Imunoterapie se dělí na založenou na získané imunitě a na vrozené imunitě.

7.1 Imunoterapie založená na získané imunitě

Imunoterapie, která k léčbě využívá získanou imunitu, využívá i její mechanismy, jako antigen prezentující buňky, B lymfocyty, T lymfocyty či specifické protilátky (Medzhitov a Janeway, 1997).

Imunoterapie využívá protilátky jako nosiče toxinů nebo léčiv, opsonizanty, aktivátory komplementu nebo k navození ADCC reakce (buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách) (Hořejší a Bartůňková, 2009).

Monoklonální protilátky jsou nejčastěji používaná varianta v léčbě. Monoklonální protilátky pocházejí z jedné plazmatické buňky za pomoci klonálních mechanismů (Weiner a kol, 2009). Rozpoznávají a napadají specifické proteiny vyskytující se na povrchu buněk (Weiner, 2010). Jsou dvě možnosti, jak můžeme za pomoci protilátek likvidovat nádorové buňky.

Buňky mohou být zabity přímo. Protilátka může blokovat receptory nebo neutralizovat povrchové enzymy a tím navodit apoptózu buňky (Scott a kol, 2012). Nebo může být na protilátku navázán toxin, který je tak zanesen do místa nádoru, kde způsobí nekrózu (Hořejší a Bartůňková, 2009).

Další možností je vyvolání imunitní odpovědi. Protilátka povzbudí jak vrozený, tak získaný imunitní systém k likvidaci nádorové buňky. Princip vrozeného imunitního systému spočívá v tom, že protilátka po navázání na nádorový antigen způsobí opsonizaci a aktivuje efektní imunitní mechanismy, jako fagocytoza nebo ADCC (Hořejší a Bartůňková, 2009),

také aktivuje komplement nebo NK buňky (Scott a kol, 2012). Co se týče získaného imunitního systému, využívá se při aktivaci T-lymfocytů (Hodi a kol, 2010).

Další možnost léčby závisící na získané imunitě jsou dendritické buňky. Dendritické buňky se připravují následovným způsobem. Osobě postižené nádorem jsou odebrány monocyty, ze kterých se v laboratoři připraví nezralé dendritické buňky. Spolu s monocytami se odebere i nádorová tkáň. Z tkáně se připraví směs nádorových antigenů, kterou nezralé dendritické buňky zpracují a posléze prezentují na svém povrchu. Takto upravené dendritické buňky jsou následně vpraveny do těla pacienta. V těle dojde k aktivaci T lymfocytů, které započnou boj nádorovými buňkami (Gilboa, 2007).

Také je možné odebrat pacientovi imunitní buňky, in vitro je stimulovat a vrátit zpět do těla (Chong a kol, 1992). Jedná se o LAK buňky (Lymphokine activated killer), tedy NK buňky (Natural killer) a T-lymfocyty, které jsou aktivovány interleukinem 2 (Rovenský a kol, 2006). Nebo TIL (Tumor infiltrating lymphocytes), který je taktéž odebrán, kultivován s interleukinem 2 a následně vrácen zpět do těla. Po návratu do těla dokáže imunitní systém lépe rozpoznávat nádorové buňky (Yamaue a kol, 1990).

Terapie pomocí adoptivního transferu T lymfocytů začíná odebráním krve pacientovi, který trpí maligním nádorem. Z krve se izolují antigenně specifické T lymfocyty, které se mnohonásobně namnoží a vrátí se do pacienta. Nevýhodou je, že takto nemocné tělo dlouhodobě neprodukuje dostatek imunitních molekul (interleukin 2, ...), které stimulují funkce T lymfocytů (Dzivenu a kol, 2003).

Další možností je odebrání nádorových buněk, kdy je následně in vitro upravena jejich genetická informace. Buňkám se pomocí cytostatik nebo ozáření zamezí v dělení. Po této úpravě jsou buňky vráceny zpět do těla, kde jsou lépe rozpoznatelné pro imunitní systém a vyvolávají protinádorovou T-lymfocytární odpověď (Hořejší a Bartůňková, 2009).

K imunoterapii nádoru se využívají také cytokiny. Cytokiny jsou malé proteiny o velikosti 5-20 kDa (Weaver a kol, 2007). Jsou produkovány buňkami imunitního systému, jako jsou T-lymfocyty, B-lymfocyty, makrofágy, bílé krvinky, žírné buňky, endotelové nebo různé stromální buňky (Lackie, 2010). Jejich uvolnění ovlivňuje chování buněk kolem. Neovlivňují jen své okolí, ale mají mnohem větší rozsah, což je klíčové pro rychlou aktivaci imunitní odpovědi (Lee a Margolin, 2011).

Různé cytokiny vyvolávají různé imunitní odpovědi a často působí pleiotropně (Lee a kol, 2011). Cytokiny můžeme dělit do kategorií podle jejich schopností. Například na cytokiny zvyšující buněčnou imunitní odpověď nebo upřednostňující protilátkovou odpověď. Některé cytokiny mají aktivující (př. interleukin 2, 12, TNF) nebo supresivní

účinky (př. TGF-beta, interleukin 10) (Shulgin a kol, 2016). Právě tyto cytokiny se díky svým účinkům využívají v imunoterapii nádorů.

Vakcinace je další možností léčby. Máme profylaktickou vakcinaci, která slouží jako prevence. Využívá se u nádorů vzniklých virovou infekcí, kupříkladu proti papilomavirům (HPV) nebo proti hepatitidě B. Dále máme terapeutickou vakcinaci. Na rozdíl od preventivní se používá ve chvíli, když nemoc už propukla (Klener a Klener jr., 2013).

7.1.1 Terapeutická vakcinace

Žádná léčba není bezchybná, proto se terapeutická vakcinace potýká s problémy.

Jedním z mnoha problémů je nepřítomnost MHC glykoproteinu II. třídy nebo neproduktivita cytokinů kostimulačními molekulami. Tyto cytokiny jsou nezbytné pro aktivaci pomocných CD4⁺ T-lymfocytů, tudíž ani nedochází k aktivaci efektorových CD8⁺ cytotoxických T-lymfocytů. Také nádorové buňky produkují cytokiny nebo na svém povrchu exprimují imunopresivní molekuly jako interleukin 10 nebo TGF beta (Transforming growth factor beta) (Klener a Klener jr., 2013).

DNA vakcíny

DNA vakcíny jsou tvořeny plazmidy, které vnášejí genetickou informaci do organismu. Genetická informace s pomocí infikování buňky a produkce antigenů aktivuje získanou imunitu. DNA vakcíny jsou zaměřeny na antigen prezentující buňky (APC), které prezentují antigeny lymfocytům. Nebo mohou být umístěny do buněk, které jsou fagocytovány antigen prezentujícími buňkami (Stevenson a kol, 2004).

DNA vakcíny mohou být aplikovány injekčně nebo metodou „gene gun“. Metoda „gene gun“ používá pro transport genetické informace do buňky elementární částice těžkého kovu (nejčastěji zlato) potažené DNA (Porgador a kol, 1998). Pro zesílení účinků DNA vakcín se používají adjuvans (usmrcené buňky bakterií, heat-shock proteiny, cytokiny). Adjuvans mají aktivovat vrozenou i získanou imunitu přímo v nádoru (Stevenson a kol, 2004).

Peptidové vakcíny

Lymfocyty mají schopnost rozpoznat nádorové antigeny, čehož využívají peptidové vakcíny. Imunitní odpověď T-lymfocytů a B-lymfocytů se vyvolává pomocí uměle nasyntetizovaných antigenních determinant (epitop, oblast antigenu, která je rozpoznávána imunitními receptory). Tím jsou aktivovány mechanismy získané imunity, které mohou vést k nekróze

nádorové tkáně (Pérez-Torres a kol, 2013). Jako většina vakcín i peptidové využívají adjuvans pro zvýšení účinků.

Intratumorální vakcinace

Intratumorální vakcinace nebo jinak in situ, tedy v místě, je vytvářena in vivo, aniž by se předem určovaly a izolovaly tumor asociované antigeny. Vakcíny obsahují imunomodulátory, které napomáhají uvolnění tumor asociovaných antigenů a následně prezentaci antigen prezentujícími buňkami. Prezentace antigenu indukuje odpověď T lymfocytů (Hammerich a kol, 2015). Jako imunomodulátory v protinádorových vakcínách se používají také nádorové buňky, které mohou aktivovat vrozenou imunitu, a zároveň vést k imunizaci (Singh a Overwijk, 2015). Nejenom že se při intratumorální terapii vlivem zásobení T-lymfocyty utváří nádorově specifická imunita, umožňuje terapie potlačením supresivních složek vrozené imunity atak na nádor (Singh a kol., 2014). Intratumorální terapie je vhodná jak ke zničení nádoru, do kterého byla injekčně vstříknuta vakcína, ale ovlivňuje i metastázy (Marabelle a kol., 2014).

Odpověď nádoru na intratumorální vakcinaci popsal koncem 19. století doktor William Coley. Coley potvrdil, že extrakt z bakterií způsobujících erysipelas (akutní lokalizovaný zánět kůže) intratumorálním podáním může vyléčit pevný tumor (Coley, 1893). Později se začal používat k léčbě nádoru Bacillus Calmette-Guerin (BCG). (Zbar a Tanaka, 1971). Lékaři hlásili terapeutické výhody intratumorálních injekcí Bacillus Calmette-Guerin u melanomu (Cohen a kol, 1978) nebo karcinomu skvanozních buněk hlavy a krku (Marabelle a kol, 2014). Doktor Morton a jeho kolegové uvedli, že intratumorální injekce Bacillus Calmette-Guerin vyvolaly u lidí s metastatickým regresí u 90 % přímo injikovaných nádorů a 20 % u neinjikovaných nádorů (metastázi) (Morton a kol, 1974). Oproti nim Bast a jeho kolegové zkoumali 12 studií, kde byli pacienti s metastatickým melanomem léčeni intratumorální bakterií Bacillus Calmette-Guerin. Ti zjistili, že regrese nastala u 58% injikovaných nádorů a u 14 % neinjikovaných nádorů (Bast a kol, 1974). Shimada s kolegy zjistil, že prozánětlivé vlastnosti složek nukleové kyseliny Bacillus Calmette-Guerin mají částečný podíl na terapeutických účincích vakcín s touto bakterií (Shimada a kol, 1985).

7.2 Imunoterapie založená na vrozené imunitě

Imunoterapie k léčbě využívá vrozenou imunitu. Například stimulaci zánětu. Do nádoru je vpravena za pomoci injekce suspenze mykobakteriální vakcíny. Ta nepřímo vyvolá i útok na nádorové buňky (Hořejší a Bartůňková, 2009).

Využitím cytokínů v léčbě je možné vyvolat apoptózu nádorových buněk nebo zastavují jejich množení a tím nádorový růst. Těmito cytokíny jsou hlavně interferon alfa, beta, tumor necrosis factor alfa, interleukin 4 a 6 (Dzivenu a kol, 2003).

Dále se využívají PAMPs (pathogen associated molecular patterns), které jsou rozpoznávány PRRs (pathogen recognition receptors) (Tomas a Badini, 2011).

7.2.1 PAMPs – molekulové vzory spojené s patogenem

PAMPs jsou molekulové vzory vyskytující se na povrchu patogenních mikroorganismů. Díky těmto vzorům je pro vrozenou imunitu snadnější rozpoznat patogen od vlastní buňky, protože na hostitelských buňkách se nevyskytují (Hořejší a Bartůňková, 2009).

PAMP může být složka bakteriální stěny lipopolysacharid (LPS) nebo endotoxiny na membráně gram negativních bakterií (Silhavy a kol, 2010). Dalšími PAMPsmohou být lipoproteiny, bakteriální flagelin, z gram pozitivních bakterií kyselina lipoteichoová, peptidoglykeny, dvouvláknová RNA (dsRNA – nukleové kyseliny ve spojení s viry) (Mahla a kol, 2013).

7.2.2 PRRs – receptory rozpoznávající vzory

PRRs jsou receptory na rozpoznání PAMPs. Receptory na rozpoznání molekulových vzorů mají důležitou roli při správném fungování vrozené imunity. Jsou kódované v zárodečné linii, a jak jejich název napovídá, odhalují patogenní molekuly (Kumar a kol, 2011). Jsou exprimované buňkami vrozené imunity, kterými mohou být makrofágy, neutrofily, dendritické buňky, monocyty, epitelální buňky (Alberts a kol, 2002). Kromě odhalování patogenních molekul, odhalují také DAMPs (damage associated molecular patterns). DAMPs neboli česky molekulové vzory spojené s poškozením, jsou složky uvolňované z poškozených buněk (Osamu a Akira, 2010).

Receptory se dále dělí na tři třídy: cytoplazmatické, sekretované a membránové.

Cytoplazmatické receptory

NOD like receptor rozpoznávají bakteriální peptidoglykany a organizují protizánětlivou a antimikrobiální imunitní odpověď (Caruso a kol, 2014).

RIG-1-like receptory rozpoznávají intracelulární vzory, které pomáhají rozpoznávat viry (Offermanns a Rosenthal, 2011).

Sekretované receptory

C reaktivní protein je protein akutní fáze syntetizovaný játry. Hladina proteinu vzrůstá poté, co makrofágy a T lymfocyty sekretují cytokín interleukin 6 (Thompson a kol, 1999). Interleukin 6 funguje prozánětlivě, tedy podporuje vznik a pozdější rozvoj zánětu (van der Pool a kol, 1997). Protein se váže na fosforylcholin na fosfolipidech, které se vyskytují na povrchu bakterií (Chang a kol, 2002). Navázáním aktivuje komplement a fagocytující buňky, které podněcují eliminaci cílené buňky (Gabay a Kusher, 1999).

Manozu vázající lektin je stejně jako C reaktivní protein tvořený v játrech a je sekretován při akutní infekci. Zapřičiňuje se o spuštění komplementové kaskády, které vede k opsonizaci mikroorganismu a urychluje fagocytózu (Medzhitov a Janeway, 2002). K aktivaci komplementu vedou tři cesty. Manozu vázající lektin využívá cestulektinovou. Manozu vázající lektin se váže na sacharidy, nacházející se na povrchu patogenů (bakterie, plísňe, viry). Nízká hladina manozu vázajícího lektinu v krvi vede k opakovaným infekcím (Chumchalová a kol, 2004).

Membránové receptory

C typ lektinové receptory (př. Dectin-1, Dectin-2) rozpoznávají sacharidy hub, virů a bakterií. Po navázání na PAMPs se aktivují signální dráhy, které vedou ke změně genové exprese. C typ lektinové receptory jsou exprimovány na monocytech, dendritických buňkách a makrofázích (Figdor a kol, 2002).

Formyl peptidové receptory (např. formyl peptidový receptor 1, formyl peptidový receptor 2) se vyskytují na leukocytech (Fu a kol, 2006). Rozpoznávají formyl peptidové molekuly a jsou jedni z těch, které pomáhají při obraně při bakteriální infekci (Le a kol, 2002). Ne všechny formyl peptidové receptory se vyskytují na leukocytech. Například N-formyl peptid může pocházet krom leukocytů také z endogenního prostředí (prasklé hostitelské buňky vypouštějící mitochondriální proteiny), nebo exogenního zdroje (proteiny uvolňované patogeny, které napadají buňky) (Le a kol, 2001).

Scavengerové receptory vážou modifikovaný lipoprotein s nízkou hustotou, různé ligandy, patogeny a endogenní proteiny. Také regulují patofyziologické stavy jako patogenní infekce, ateroskleróza, imunitní dohled a rakovinu (Zani a kol, 2015).

Mezi membránové receptory se řadí také Toll-like receptory, které jsou dobře prozkoumané a byly využity v této práci.

7.2.3 Toll-like receptor

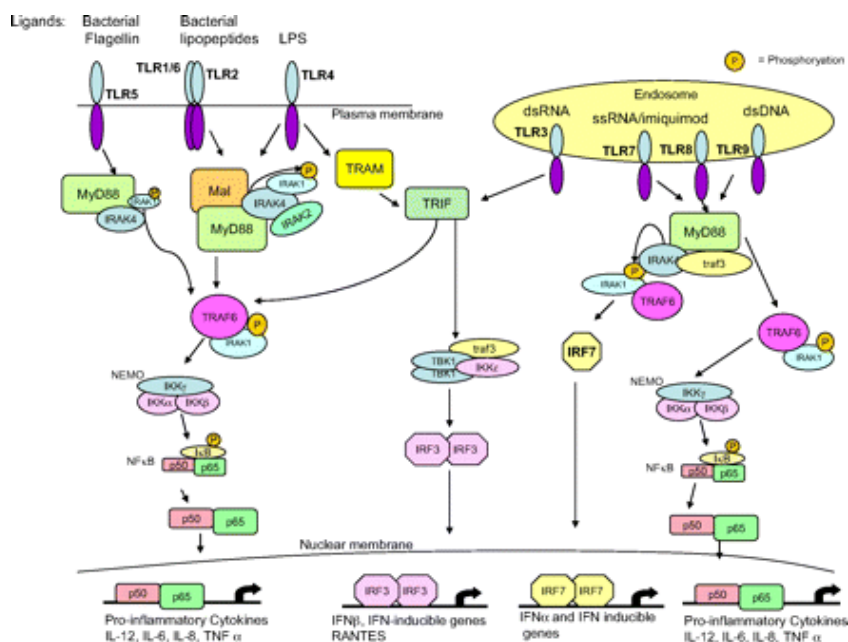
Je exprimován v buněčné membráně buněk vrozené imunity (monocytů, dendritických buněk, makrofágů), buněk získané imunity (T lymfocytů, B lymfocytů) i buněk mimo imunitu (fibroblasty, epitelové a endotelové buňky) (Delneste a kol, 2007). Receptory rozpoznávají nejrůznější cizorodé struktury, jako lipoproteiny, lipopolysacharidy, virové a prokaryotické nukleové kyseliny a další (Hořejší a kol, 2013). U lidí bylo objeveno 10 typů Toll-like receptorů, zatímco u myši 13, z toho receptory 1–9 jsou pro lidi a myši společné (Thompson a kol, 2011).

Toll-like receptory stejně jako ostatní receptory rozpoznávají PAMPs. Po navázání patogenu na receptor se spustí signální kaskáda, která vede k expresi cytokínů (Medzhitov a kol, 1997). Signalizace Toll like receptorů může proběhnout pomocí MyD 88, nebo pomocí TRIF.

Signalizaci s MyD 88 (myeloidní diferenciační 88) využívají všechny typy Toll like receptorů, s výjimkou Toll like receptoru 3. Když se na Toll like receptor naváže jemu vlastní ligand, dojde ke konformační změně v receptoru a rekrutuje adaptační protein MyD 88. Následně dojde k aktivaci proteinové kinázy NF- κ B (transkripční nukleární faktor- κ B) a MAP kinázy (mitogen-activated protein kinases) (Kawai a Akira, 2010).

Signalizaci za pomoci TRIF (TIR domain-containing adaptor inducing interferon beta) využívá Toll like receptor 3 a Toll like receptor 4. I když Toll like receptor 4 může být aktivován první zmiňovanou signalizací s MyD 88. Po navázání ligandu na receptor dojde k rekrutaci adaptéru TRIF. TRIF aktivuje TBK 1 a RIPK 1 kinázy. Po aktivaci dojde k produkci interferonu typu I. (Cook a kol, 2004), kam patří antivirové a protizánětlivé cytokíny (Cruse a Lewis, 2003).

Jednotlivé receptory ale rozpoznávají odlišné patogenní vzory.



Obr. 2: Signalizační dráhy Toll-like receptorů;(převzato z Luke a kol, 2009).

V následující tabulce jsou stručně shrnuty všechny Toll-like receptory.

Tab. I: Přehled Toll-like receptorů (převzato a upraveno dle Kvardová, 2016).

TLR	Buněčná lokalizace	Adaptorová molekula	Ligand	Zdroj ligandu
TLR 1-2	Membrána	MyD 88	Triacylované lipoproteiny, lipoteichová kyselina, peptidoglykany	Bakterie
			Zymosan	Houby
			Pam ₃ CSK ₄	Syntetické
TLR 2-6	Membrána	MyD 88	Diacylové lipopeptidy	Bakterie
			HSPs, HMGB1, kyselina močová, fibronectin, ECM proteiny	Endogenní
TLR 3	Endozomy	TRIF	ds RNA	Viry
			POLY I:C	Syntetické
TLR 4	Membrána (nebo endozomy)	MyD 88/ TRIF	β-defensin 2, fibronectin EDA, HMGB1, snapin, tenascin C	Endogenní
			LPS, lipoteichová kyselina	Bakterie
TLR 5	Membrána	MyD 88	Flagellin	Bakterie
TLR 7-8	Endozomy	MyD 88	ss RNA	Viry
			CpG-A, Poly G10, Poly G3	Syntetické
TLR 9	Endozomy	MyD 88	nemetylované CpG DNA	Syntetické
TLR 10	Membrána	MyD 88	Pam ₃ CSK ₄ , PamCysPamSK ₄	Syntetické
			Neznámé přírodní ligandy	-
TLR 11	-	-	Toxoplasma gondii, prolifin	Prvoci
TLR 12	-	-	neznámé	-
TLR 13	Endozomy	MyD 88	VSV	Viry

Ve své práci jsem se zabývala Toll-like receptory 2, 3 a 7 a jejich agonisty.

Toll like receptor 2 je exprimován na monocytech, dendritických buňkách, mikroglíích, makrofágách, polymorfonukleárních leukocytech, T buňkách (včetně T regulačních buněk) a B buňkách. Také ho můžeme nalézt epitelu plicních aleveol, na Bowmanových kapslích v ledvinových krvinkách a renálních tubulí (Cario, 2008). Toll like receptor 2 rozpoznává mikrobiální molekuly z řad grampozitivních bakterií, gramnegativních bakterií, mykoplasmat a kvasinek (Kawai a Akira, 2007).

Toll like receptor 3 je hojně exprimován v pankreatu, placentě a na dendritické subpopulaci leukocytů. Toll like receptor 3 rozpoznává dsRNA (dvouvláknová RNA), která je spojována s virovou infekcí. Oproti ostatním Toll like receptorům používá Toll like receptor 3 jako jedinou signalizační dráhu TRIF. (Kawai a Akira, 2007).

Toll like receptor 7 je exprimován v placentě, slezině a plicích (Chuang a Ulevitch, 2000). Toll like receptor 7 rozpoznává ss RNA virů (jednovláknovou RNA) jako HIV a HCV. Také váže malé syntetické antivirové sloučeniny jako imidazaquinolin (Heil a kol, 2004).

7.2.3.1 Agonisté Toll-like receptorů využité v této práci

Za agonistu se považuje ligand, který je navázáním na receptor schopný vyvolat fyziologickou odpověď.

Resiquimod (R-848)

Resiquimod funguje jako modifikátor imunitní odpovědi (Tomai a kol, 1995). Jedná se o syntetickou látku, u které byla zjištěna antivirová a protinádorová aktivita (Meyer a kol, 2013). Je schopen aktivovat imunitní odpověď indukci cytokínů jako interferon alfa a interleukin 12. Oba jsou zodpovědní za stimulaci dendritických buněk, monocytů a makrofágů (Tomai a kol, 1995). Jako agonista se u myší řadí k Toll like receptoru 7, u lidí je agonistou Toll-like receptor 7 a Toll-like receptor 8.

Polyinosinická-polycitidylická kyselina (POLY I:C)

Jde o syntetickou látku (Liu a kol, 2012), představující analog dvouřetězcové RNA. Ta navazuje protinádorovou imunitní reakci. Dochází k produkci interferonu alfa, beta, interleukinů 1, 6, 12 a tumor necrosis factoru alfa (Zhou a kol, 2013). Aktivuje NK buňky, B lymfocyty a makrofágy (Qu a kol, 2002) Jako agonista patří k Toll-like receptoru 3.

Kyselina lipoteichová (LTA)

Můžeme ji najít v buněčné stěně grampozitivních bakterií (Ginsburg, 2002). Jako agonista patří k Toll-like receptoru 2. Po navázání na receptor se aktivuje transkripční faktor NF- κ B. NF- κ B reguluje produkci protizánětlivých chemokinů a cytokinů a pomáhá při aktivaci leukocytů (Lawrence, 2009).

Manan

Manan je ligand, který byl využit jako podpora fagocytózy. Je to polysacharid, který můžeme nalézt v buněčné stěně gramnegativních bakterií a kvasinek (Cawley a Ballou, 1972). Skládá se z podjednotek D-manózy, které jsou spojené beta(1,4)-glykosidickou vazbou (Moreira, 2008). Podle vazby se rozlišuje alfa a beta manan (Lipke a Ovalle, 1998). Manan je považován za antigenní látku (Janeway a Medzhitov, 2002).

Manan je rozpoznáván dvěma receptory.

Manozový receptor je transmembránový protein (Stahl a Ezekowitz, 1998), který se nachází na dendritických buňkách a makrofázích. Manozový receptor rozpozná manozové zbytky na povrchu virů a bakterií, díky čemuž může patogeny navázat a napomáhá tak fagocytoze (Crespo a kol, 2011). Manozový receptor zodpovídá za tvorbu prozánětlivých signálů, které vedou k produkci tumor necrosis factor alfa, interleukinu 6 a 12 (Pathak a Palan, 2005).

Druhým receptorem je Manozu vázající lektin (MBL). Tento receptor napomáhá k aktivaci komplementové kaskády, funguje jako opsonin a napomáhá tak snadnější fagocytoze (Takahashi a Ezekowitz, 2005).

Manan byl ukotven na molekuly za pomoci BAM (Biocompatible Anchor for Cell Membrane – biokompatibilní kotva pro buněčnou membránu). BAM obsahuje polyethylenglykol, který slouží ke zvýšení hydrofilních vlastností sloučeniny a alifatický řetězec kyseliny olejové, který slouží jako kotva do hydrofobní části buněčné membrány. Na konci polyethylenglykolových řetězců jsou umístěny reaktivní skupiny, díky kterým dokáže vázat fyziologicky aktivní látky nebo vázat na povrchy různých materiálů (NOF Corporation, 2015).

8 Cíle práce

- Nádorová terapie s použitím R-848, POLY I:C, LTA a MANAN-BAM v kombinaci s modulací imunitní odpovědi pomocí protilátek.
- Optimalizace nádorové terapie a studium mechanismů jejího účinku.

9 Materiál

9.1 Chemikálie

- Biocompatible Anchor for cell Membrane (BAM) (NOF Corporation, USA);
- D-MEM (Sigma-Aldrich, USA);
- Fetal Calf Serum (FCS) (Sigma-Aldrich, USA);
- Kyselina lipoteichová (LTA) (Sigma-Aldrich, USA);
- Lipopolysacharid (LPS) (Sigma-Aldrich, USA);
- Manan (Sigma-Aldrich, USA);
- Polyinosinická-polycitidylická kyselina (POLY I:C) (Sigma-Aldrich, USA);
- RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, USA);
- Resiquimod (R-848) (Tocris Bioscience, USA);
- Trypanová modř (Sigma-Aldrich, USA);
- Trypsin (Sigma-Aldrich, USA).

9.2 Laboratorní zvířata

Na pokusy *in vivo* byly použity myši samice z linie C57BL/6N pocházející z chovu Charles River Laboratories. Myši byly staré 8 týdnů s váhou 18 až 20 g. Myši měly neomezený přístup ke krmivu a sterilní vodě. Chovány byly při fotoperiodě 12 hodin světlo a 12 hodin tma.

9.3 Linie nádorových buněk

Na pokus byly použity nádorové buňky myšního melanomu B16-F10 kultivované v RPMI 1640 s 10% Fetal Calf Serum (FCS), 1% glutaminu, 1% antibiotik a 0,1% merkaproetanu při teplotě 37°C. Buňky byly kultivovány v atmosféře, která byla nasycená vodními parami s koncentrací 5% CO₂.

Nádorové buňky myšního melanomu B16-F10 byly darem prof. Říhové z Mikrobiologického ústavu v Praze.

10 Metody

10.1 Příprava nádorových buněk myšího melanomu B16-F10

Prve bylo odstraněno kultivační médium. Poté byly buňky třikrát propláchnuty sterilním PBS. Po propláchnutí byla provedena trypsinizace (0,02% trypsin, 0,02 EDTA v PBS) po dobu 5 minut v termostatu v teplotě 37°C. Trypsinizace byla ukončena přidáním malého množství média RPMI 1640 s 10% Fetal Calf Serum (FCS). Rozvolněné buňky byly centrifugovány 10 minut v teplotě 4°C a přetížení 150G. Po skončení centrifugace bylo médium vylito. K peletu buněk bylo přidáno 3 ml média RPMI 1640 bez séra. Po rozvolnění buněk se napipetovalo 30 µl suspenze do nové zkumavky. K suspenzi se přidalo 30 µl trypanové modři. Smíchaná směs byla nepipetována do Bürkerovi komůrky. Byly spočteny živé neobarvené buňky a následně byly zředěny na správnou koncentraci.

10.2 Příprava manan-BAM

V prostředí, které obsahovalo octan amonný ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$), byl po dobu pěti dní při teplotě 50°C a pH 7,5 redukován roztok mananu kyanoborohybridem sodným (NaBH_3CN). Takto vzniklý roztok byl dializován při teplotě 4°C proti PBS. Dialýza probíhala přes noc. Byla použita dialyzační membrána MWCO 3500 (Serva, Heidelberg).

Následně proběhlo navázání Biokompatibilní kotvy pro buněčnou membránu (BAM) na amino-skupinu mananu. Ukotvení cytoplazmatické membrány nádorové buňky je možno díky hydrofobnímu konci molekuly BAM, který je tvořen kyselinou olejovou. Druhý konec molekuly BAM je hydrofilní, obsahuje polyethylenglykol a reaktivní NHS skupinu, umožňující vazbu ligandů obsahujících aminoskupinu (Kato a kol, 2004).

10.3 Příprava hydrochlorid Resiquimodu (R-848)

Resiquimod.HCl byl připraven smícháním Resiquimodu s ekvivalentem 3,5% kyselinou chlorovodíkovou (HCl). Kyselina chlorovodíková zvyšuje rozpustost Resiquimodu ve vodě, proto byla na Resiquimod navázána.

10.4 Transplantace melanomových buněk B16-F10

Než mohla transplantace proběhnout, byla myším oholena srst na pravém boku z důvodu lepšího sledování růstu nádoru. Transplantace proběhla subkutánně. Bylo transplantováno 400 000 buněk B16-F10 v 0,1 ml RPMI 1640 bez séra.

10.5 Měření velikosti nádoru

Velikost nádoru byla měřen v průběhu terapie, a to každý druhý den. Měření probíhalo za pomoci kaliperu a zjišťovali se dva rozměry, výška a délka.

Z naměřených rozměrů se vypočítal objem nádoru za pomoci vzorce: $V = \frac{\pi}{6} AB^2$.

V tomto vzorci bereme A jako délku nádoru a B jako výšku nádoru (Li a kol, 2009).



Obr. 3: Kaliper (převzato z <http://chopn.registry.cz/index-en.php?pg=home--instruction-manual-for-ffmi-and-mamc-skinfold-measurement>).

10.6 Statistické vyhodnocení

Statistické vyhodnocení výsledků bylo provedeno za pomoci programů MO Excel a Statistica XII (One Way ANOVA, Tukeyho *post hoc*, nakřivku přežití byl použit Kaplan-Mayerův test). V grafech byla použita střední chyba průměru (SEM).

10.7 Pokus č. 1: Intratumorální aplikace anti-CTLA 4 samotné a v synergii TLR agonistů s kotveným mananem

Na pokus bylo použito 24 samic myšního kmene C57BL/6N. Po 12 dnech od transplantace nádorovými buňkami melanomu B16-F10, byly myši náhodně rozděleny do 4 skupin, A až D. V každé skupině bylo 6 myší. Každá z myší měla vlastní box s podestýlkou, přístupem k vodě a krmivu.

Den, kdy došlo k rozdělení do skupin, byl zároveň zaznamenán jako den 0. V den 0 proběhlo první měření nádorů a zároveň první aplikace terapeutických látek.

Měření probíhalo každý druhý den. Terapie obsahovala 4 pulzy po třech injekcích. Terapeutické látky byly podány celkem ve 12 dnech. Byly to dny 0,1,2,8,9,10,16,17,18,24,25 a 26.

Přehled terapie (skupina, podaná látka)

A - 0,5 mg R-848 + 0,5 mg POLY (I:C) + 0,5 mg LTA/ ml 0,2 mM manan-BAM v PBS;

B - 0,5 mg R-848 + 0,5 mg POLY (I:C) + 0,5 mg LTA + 0,4 mg anti-CTLA 4/ ml 0,2 mM manan-BAM v 1 ml PBS;

C - 0,4 mg anti-CTLA 4 ml PBS;

D - PBS.

Všechny uvedené roztoky byly aplikovány v uvedených dnech intratumorálně v množství 50 µl/myš.

Poslední měření nádorů bylo provedeno v den 30. Následující dny probíhalo pouze sledování přežití. V den 100 bylo sledování ukončeno. Myši, které přežily, byly usmrceny.

Kvůli kolísajícím výsledkům v posledních dnech měření (úhyn), byly vzaty výsledky do 20. dne měření.

10.8 Pokus č. 2: Intratumorální terapie založená na redukovaném počtu terapeutických dávek

Na pokus bylo použito 24 samic myšího kmene C57BL/6N. Po 12 dnech od transplantace nádorovými buňkami melanomu B16-F10 byly myši náhodně rozděleny do 4 skupin, A až D. V každé skupině bylo 6 myší. Každý z myší měla vlastní box s podestýlkou, přístupem k vodě a krmivu.

Den, kdy došlo k rozdělení do skupin, byl zároveň zaznamenán jako den 0. V den 0 proběhlo první měření nádorů a zároveň první aplikace terapeutických látek.

Měření probíhalo každý druhý den. Terapie obsahovala 2 pulzy (0,1,2,8,9,10), 1 pulz (0,1,2) a pouze jedno podání terapeutické látky (0). Jako terapeutikum byla použita směs 0,5 mg R-848 + 0,5 mg POLY (I:C) + 0,5 mg LTA/ ml 0,2 mM manan-BAM v PBS, aplikována intratumorálně v množství 50 µl/myš.

Přehled terapie (skupina, pulzy):

A - 0;

B - 0,1,2;

C - 0,1,2,8,9,10;

D-kontrola.

Poslední měření nádorů bylo provedeno v den 14. Následující dny probíhalo pouze sledování přežití. V den 100 bylo sledování ukončeno. Myši, které přežily, byly usmrceny.

11 Experimentální výsledky

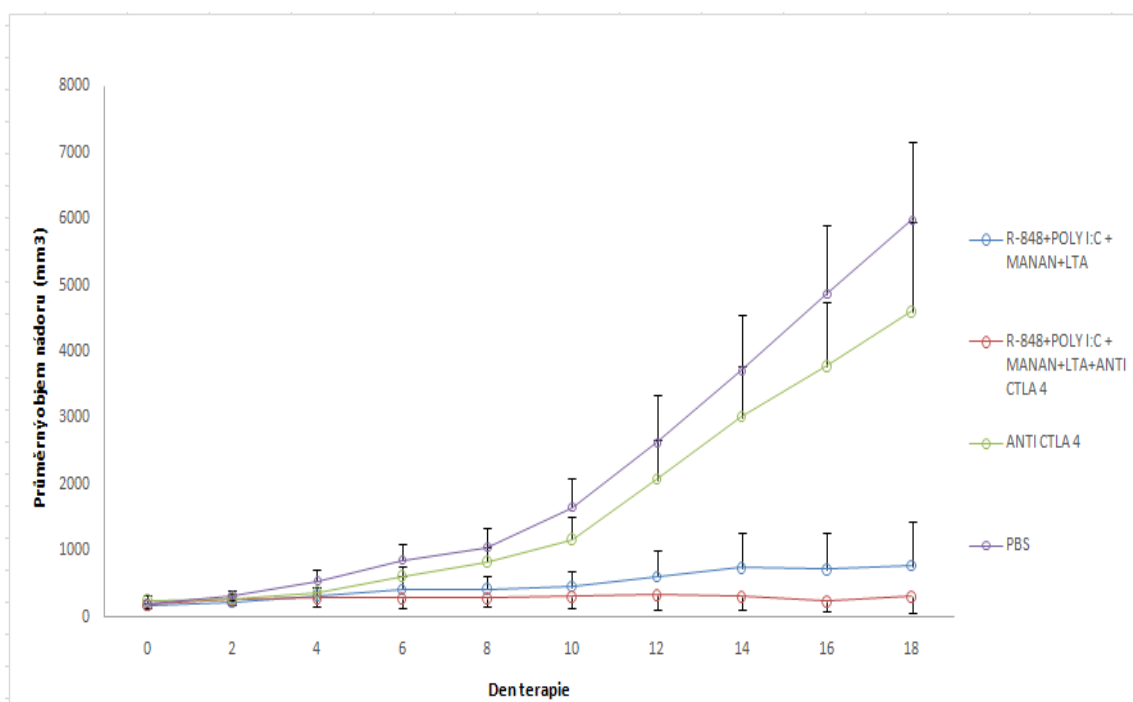
11.1 Pokus č. 1: Intratumorální aplikace anti-CTLA 4 samotné a v synergii TLR agonistů s kotveným mananem

Cílem bylo zjistit vliv podáním samostatné monoklonální protilátky anti-CTLA 4 na snižování velikosti nádorů a na dobu přežití po skončení podání terapeutických látek. Také byl sledován tento účinek ve spolupráci s TLR agonisty a kotveným mananem.

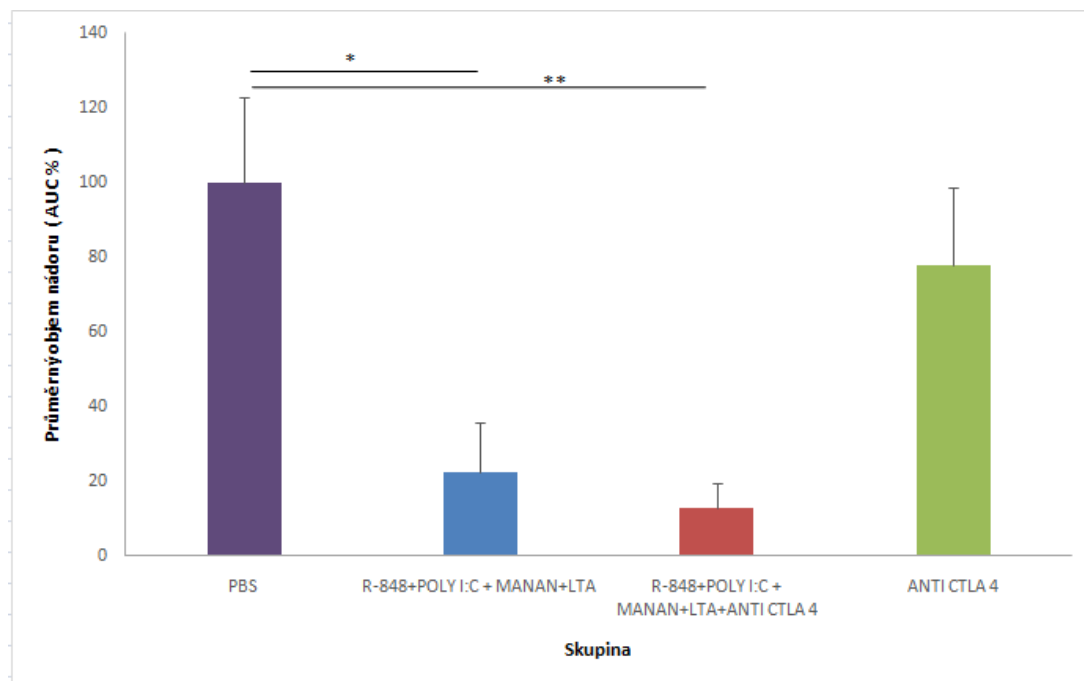
Terapie složená z R-848 + POLY I:C + MANAN + LTA + anti-CTLA 4 vyvolala redukci nádorového růstu 87% oproti kontrolní skupině PBS. Hladina významnosti byla dosažena. Kombinace TLR agonistů s kotveným mananem a monoklonální protilátkou anti-CTLA 4 má výraznější vliv na redukci nádorového růstu, než monoklonální protilátka anti-CTLA 4 samotná nebo TLR agonisté s kotveným mananem.

Terapie složená z R-848 + POLY I:C + MANAN + LTA vyvolala redukci nádorového růstu 78% oproti kontrolní skupině PBS. Redukce byla stále významná, avšak slabší než terapie s anti-CTLA 4. Hladina významnosti byla dosažena.

Terapie založená na monoklonální protilátce anti-CTLA 4 vyvolala redukci nádorového růstu 22%. Tato terapie byla nejméně účinná. Hladina významnosti nebyla dosažena (Obr. 4 a 5).

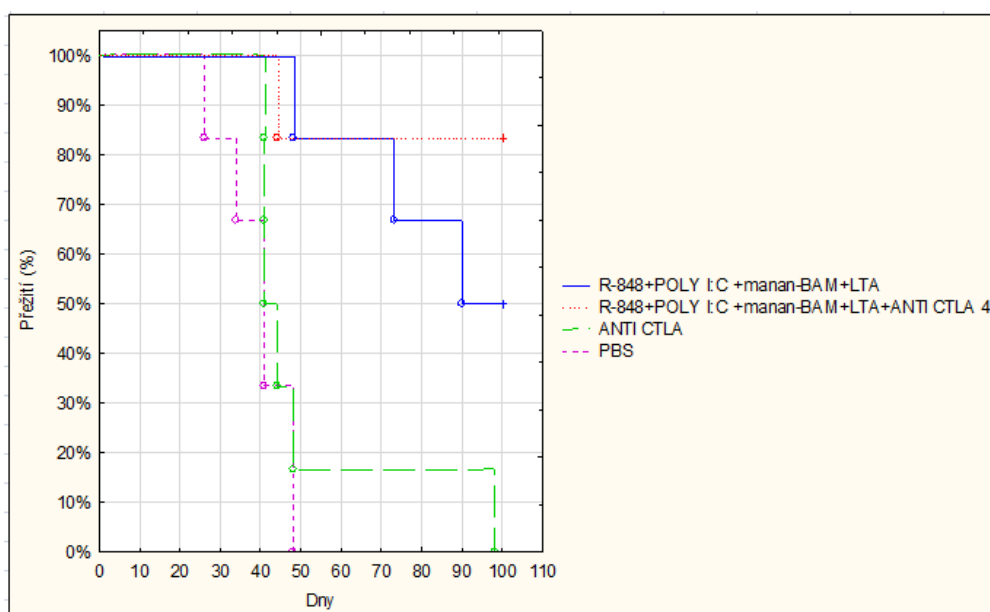


Obr. 4: Vliv anti-CTLA 4 samotné a v kombinaci s TLR agonisty a kotveným mananem na růst melanomu B16-F10.



Obr. 5: Vliv anti-CTLA 4 samotné a v kombinaci s TLR agonisty a kotveným mananem na růst melanomu B16-F10 – vyhodnocení ploch pod křivkou (AUC), *= $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$ vztaženo ke kontrolní skupině PBS.

Po ukončení léčby byla sledována doba jejich přežití. Nejúspěšnější byla skupina léčená terapeutiky R-848 + POLY I:C + MANAN-BAM + LTA + anti-CTLA 4, kde přežilo 5/6 myši 100 dní. U skupiny léčené R-848 + POLY I:C + MANAN-BAM + LTA přežily 3/6 myši 100 dní. U kontrolní skupiny s PBS a skupiny se samostatným anti-CTLA 4 nepřežila 100 dní žádná myš (Obr. 6).



Obr. 6: Vliv anti-CTLA 4 samotné a v kombinaci s TLR agonisty a kotveným mananem na délku přežití myši s transplantovaným melanomem B16-F10.

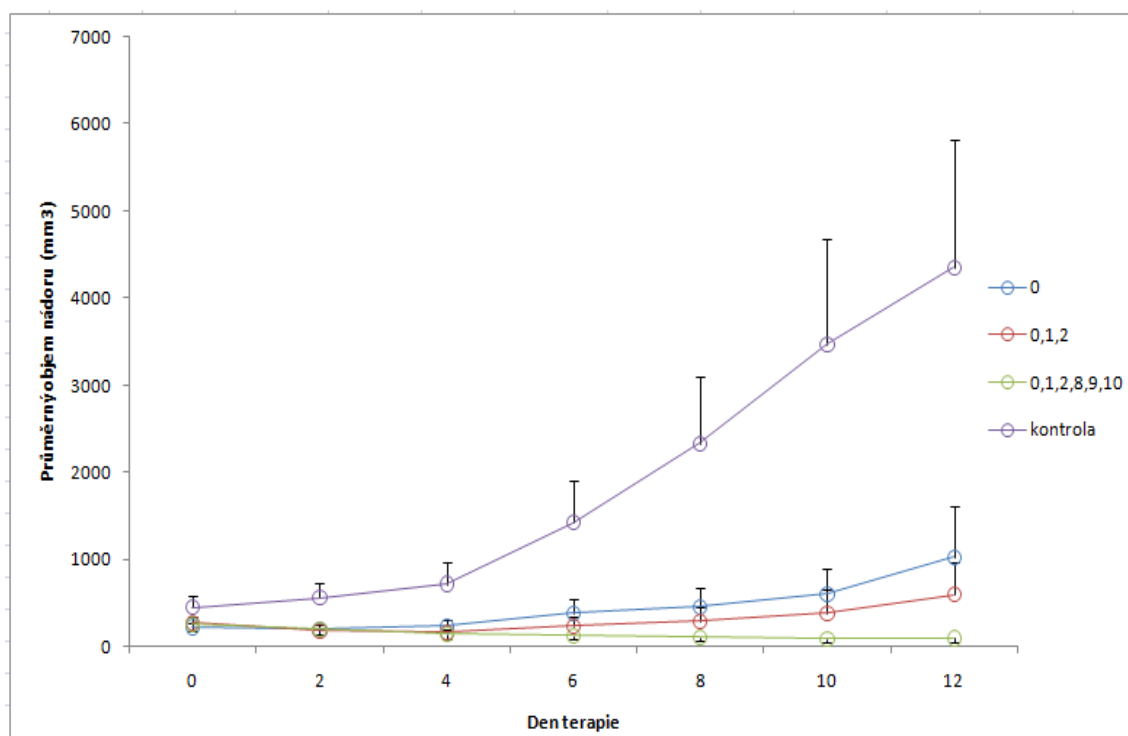
11.2 Pokus č. 2: Intratumorální terapie založená na redukováném počtu terapeutických dávek

Cílem bylo zjistit, zda má vliv na snižování velikosti nádoru nejen terapeutická látka, ale i její pulzové podání. Obvykle se terapeutické látky podávají ve 4 pulzech a v tomto experimentu jsem chtěla zjistit, za postačí pouze 2 nebo 1 pulz.

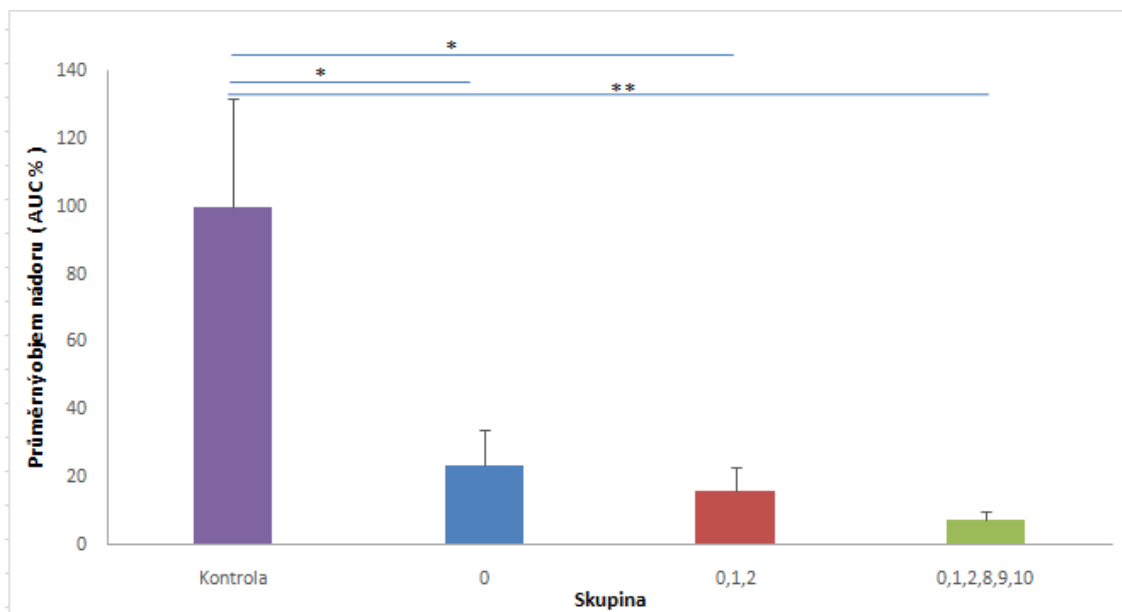
Terapie složená z 2 pulzů, (aplikace v den 0,1,2,8,9,10), vyvolala redukcí nádorového růstu 92% oproti kontrolní skupině. Experiment ukázal, že terapie s 2 pulzy způsobila největší redukcí nádorového růstu, na rozdíl od terapie založené na 1 pulzu nebo jen jedinému podání terapeutické látky. Hladina významnosti byla dosažena.

Terapie složená z 1 pulzu, čítající 3 dny, vyvolala redukcí nádorového růstu 84% oproti kontrolní skupině PBS. Redukce byla stále významná, avšak slabší než terapie s 2 pulzy. Hladina významnosti byla dosažena.

Terapie složená z jediného podání terapeutické látky v den 0, vyvolala nejslabší redukcí nádorového růstu 76%. Hladina významnosti byla dosažena (Obr. 7 a Obr. 8).



Obr. 7: Intratumorální terapie založená na redukováném počtu terapeutických dávek.

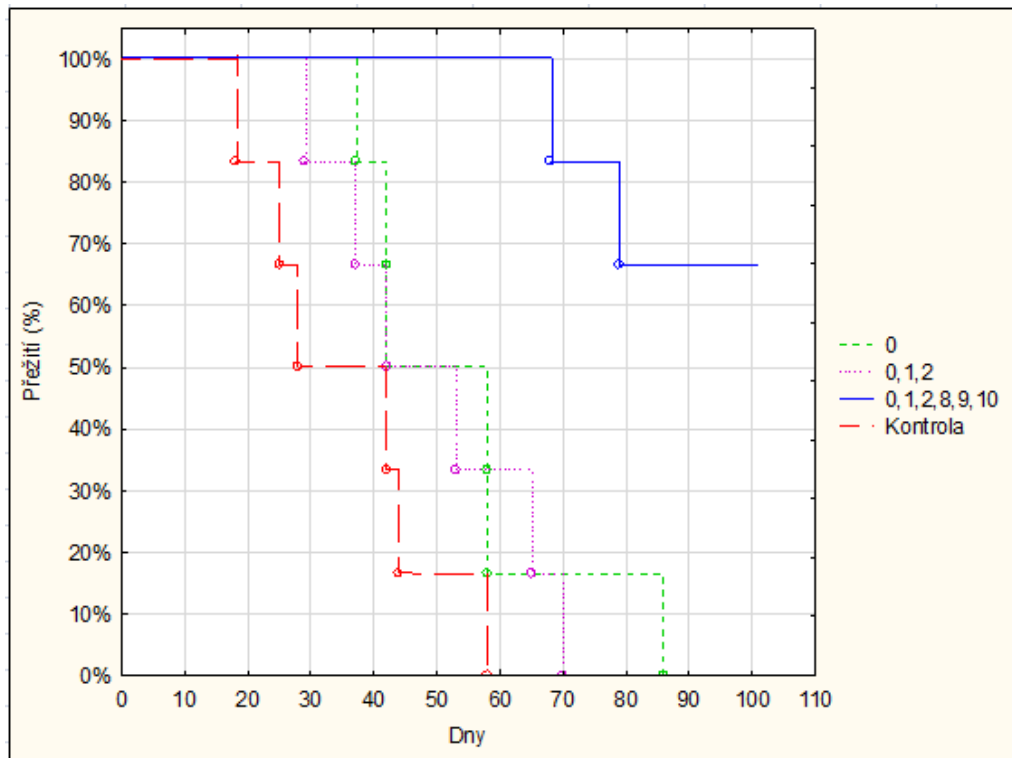


Obr. 8: Intratumorální terapie založená na redukováném počtu terapeutických dávek – vyhodnocení ploch pod křivkou (AUC), *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$ vztaženo ke kontrolní skupině PBS.

V prvním pokusu, kde jsem zkoumala vliv terapeutických látek, probíhala terapie ve 4 pulzech.

Pro srovnání, v prvním experimentu vyvolala 4 pulzní terapie 78% redukci nádorového růstu a v druhém experimentu 2 pulzní terapie vyvolala 92% redukci nádorového růstu. Dá se tedy usoudit, že při léčbě melanomu by mohly stačit pouze 2 pulzy, místo 4 pulzů. 1 pulzní terapie měla sice rovněž značnou redukci nádorového růstu (84%), ale jak vyplývá z následujícího, nevedla k úplnému vyléčení žádné myši.

Po ukončení léčby bylo sledováno přežití myši. Z pohledu přežití 100 dní byla nejúspěšnější skupina s dvěma pulzy, kde přežily 4/6 myši. Bylo tedy toto přežití dokonce vyšší než u 4 pulzní terapie. U kontroly, terapie o jedné injekci i o 1 pulzu 100 dní nepřežila myš žádná (Obr. 9)



Obr. 9: Intratumorální terapie založená na redukovaném počtu terapeutických dávek – analýzy přežití.

12 Diskuze

Nádorová imunoterapie, využívající tělu vlastních obranných mechanismů k zničení nádorových buněk, patří k šetrnějším metodám léčby, než je nyní nejpoužívanější chemoterapie a radioterapie.

RNDr. Jan Ženka, CSc. a jeho tým se snaží najít řešení léčby nádorů pomocí stimulace vrozené imunity. V mé bakalářské práci se, stejně jako předchozí práce pod vedením RNDr. Jana Ženky, CSc., snažím přispět k této problematice.

Imunoterapie, kterou používáme, je založená na stimulaci vrozené imunity. Po útoku buněk vrozené imunity se uvolní antigeny, které jsou prezentovány antigen prezentujícími buňkami získané imunitě. Ta už se postará o zbytek.

Buňky vrozené imunity rozpoznávají svůj cíl pomocí PAMPs, které se vyskytují na cizorodých částicích (viry, bakterie). Ovšem na nádorech se nevyskytují. Proto napomáháme vrozené imunitě tím, že na nádorové buňky sami kotvíme PAMPs, aby byly pro vrozenou imunitu viditelnější. (Waldmanová a kol, 2016).

V imunoterapii se inaktivované bakterie, nebo jejich části, užívají od 19. století. William Coleypoužil k léčbě neoperovatelného sarkomu směs inaktivních bakterií (*Streptococcus pyogenes* a *Serratia marcescens*) (Coley, 1891), s čímž dosáhl kolem 10% úspěšnosti s vyléčením. Od té doby se při imunoterapii využívají extrakty patogenních mikroorganismů (Coley, 1910).

O několik let později byly otestovány i jiné bakterie, které jsou vhodné k léčbě nádorů. Jednou z používaných bakterií je i *Listeria monocytogenes*, které vykazovala silnou nespecifickou imunitní odpověď při sekreci prozánětlivých cytokínů (IL-12) (Flo a kol, 2000).

Underhill s Ganterem navrhli použití TLR ligandů s ligandem stimulujícím fagocytózu, což vedlo k velmi silné odpovědi vrozené imunity (Underhill a Ganter, 2004). Tuto myšlenku potvrdila ve své práci Janotová a kol. (Janotová a kol, 2014). Výraznou redukci nádorového růstu vykazoval agonista TLR 4 lipopolysacharid (LPS) ve spolupráci s ligandy ukotvenými na nádorové buňce. Testování lipopolysacharidu však ukázalo, že lipopolysacharid produkuje mediátory, kteří se podílejí na septickém šoku. Zatímco člověku by k šoku stačila dávka 1 µg/kg, myši tolerují až tisíckrát vyšší dávku (Warren a kol, 2010). I přes svou účinnost nemůže být právě kvůli zmíněné toxicitě použit v léčbě. Z tohoto důvodu se hledaly jiné možnosti, jak lipopolysacharid nahradit.

Lipopolysacharid byl nahrazován monofosfyl lipidem A (MPLA) (Glaserová, 2015), imiquimodem (Jačková, 2015) nebo beta-glukanem (Husníková, 2014). Bohužel monofosforyl lipid A, imiquimod ani beta-glukan nevykázali dostatečný efekt, aby mohli být vhodnou náhradou za lipopolysacharid. Nakonec se jako vhodná náhrada, který by zároveň byla bezpečná pro člověka, ukázal resiquimod (R-848) ve spolupráci s kotveným mananem (Kumžáková, 2015).

Tým RNDr. Jana Ženky, CSc. dříve používal směs TLR agonistů zahrnující resiquimod (R-848)+POLY (I:C)+ inaktivovaná *Listeria monocytogenes* s ligandem stimulujícím fagocytózu, v tomto případě šlo o manan. V této práci optimalizovali složení směsi. Nová směs TLR agonistů zahrnuje resiquimod (R-848)+POLY(I:C)+ kyselina lipoteichoová (LTA) s mananem ukotveným na povrchu nádorových buněk pomocí biokompatibilní kotvy pro membrány (BAM) (Caisová a kol, 2018). Tato směs vyvolává zánětlivou infiltraci nádoru a výraznou signalizaci (Caisová, 2017).

Listeria monocytogenes je grampozitivní bakterie, která byla v léčbě úspěšná, proto v práci Masákové byla vyzkoušena kyselina lipoteichoová. Ta je přítomna ve stěně grampozitivních bakterií a je stejně jako *Listeria monocytogenes* agonistou TLR 2 (Masáková, 2016).

Bylo ověřeno, že kromě fungujícího složení směsi, je důležité také dodržet nejen počet pulzů (zásahů), ale i správné načasování (Caisová a kol, 2017).

V prvním pokusu jsem zkoumala terapeutický efekt samotné směsi TLR agonistů (resiquimod (R-848)+POLY(I:C)+ kyselina lipoteichoová (LTA)) s mananem, přidáním monoklonální protilátky anti-CTLA 4 do směsi i účinek samostatně pracující protilátky.

Víme, že výše zmíněná směs (R-848+POLY (I:C)+LTA+manan-BAM) má pozitivní výsledky. Funkčnost této směsi jsem potvrdila i ve své práci. Bohužel samotná směs nemá 100 % vyléčení, ani 100 % přežití myši. Proto se směs kombinuje s dalšími látkami, kterými se snažíme o ještě lepší výsledky. Ke směsi byla přidána monoklonální protilátka anti-CTLA 4, která blokuje inhibiční imunitní kontrolní bodu tím přispívá ke zvýšené aktivaci a proliferaci T lymfocytů, zejména cytotoxických T lymfocytů. Kombinace směsi s přidáním anti-CTLA 4 vedla k větší redukci nádorového růstu, než protilátka anti-CTLA 4 samotná. Předpokládáme, že je to způsobeno deplecí T regulačních lymfocytů, což vyvolala právě protilátka anti-CTLA 4 (Lyianage a kol, 2006). Experiment se směsí včetně anti-CTLA 4 ukázal zvýšenou redukci nádorového růstu a zároveň prodloužení přežití. Ve směsi bez anti-CTLA 4 přežili 3/6 myši, zatímco s anti-CTLA 4 přežilo 5/6 myši. Funkčnost této kombinace byla také prokázána v nedávno vydané práci Caisové a kol (Caisová a kol, 2018).

V druhém pokusu jsem zkoumala vliv zredukovaného počtu terapeutických dávek. V prvním pokusu jsem použila 4 pulzy po 3 injekcích, zatímco ve druhém pokusu jsem zkoumala, zda může terapie fungovat s méně pulzy. Pokus prokázal, že k léčbě nestačí pouze jedna injekce, ani jeden pulz po 3 injekcích. Naopak 2 pulzy po 3 injekcích výrazně snížily nádorový růst. I přežití myši bylo v tomto případě velmi dobré (4/6 myši).

Otázka, zda je nutné aplikovat terapeutické látky ve 4 pulzech nebo postačí pouze 2 pulzy, není zodpovězena. V prvním pokusu, kde byla použita 4 pulzní terapie, přežily 3/6 myši. V práci Caisové a kol ale přežilo 5/6 myši (Caisová, 2018). V každém případě je potřeba provést další pokusy, abychom mohli s jistotou říci, jaké dávkování je nejvhodnější k větší šanci na vyléčení.

Víme nicméně, že minimální počet terapeutických pulzů, jsou dva. Je to dáno tím, že aby se mohla zapojit získaná imunita, je třeba myš nevakcinovat vlastním nádorem (Caisová, 2018).

Závěr

- Směs TLR agonistů (R-848+POLY (I:C) +LTA) s kotvený mananem potvrdila dobrou efektivitu v léčbě melanomu B16-F10.
- Přídavek protilátky anti-CTLA 4 k této směsi vedl ke zvýšení redukce nádorového růstu i ke zlepšení přežití myši.
- Bylo zjištěno, že pro dosažení terapeutického efektu směsí R-848+POLY (I:C)+LTA+manan-BAM je třeba minimálně dvou terapeutických pulzů.
- Optimální počet terapeutických pulzů bude třeba zjistit dalšími experimenty.

Literatura

1. Adam, Z., Krejčí, M., Vorlíček, J. (2011). *Obecná onkologie*. Praha: Galén. ISBN 978-80-7262-715-8.
2. Aderem, A., Underhill, D. M., (1999). Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annual review Immunology*. 17, 593-623.
3. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell*. New York: Garland Science. ISBN 0-8153-3577-6.
4. Anand, P., Kunnumakara, A. B., Sundaram, Ch., Harikumar, K. B., Tharakan, S. T., Lai, O. S., Sung, B., Aggarwal, B. B. (2008). Cancer is a Preventable Disease that Requires Major Lifestyle Changes. *Pharmaceutical Research*.25(9), 2097-2116.
5. Bajor, D. L., Mick, R., Riese, M. J., Richman, L. P., Xu, X., Torigian, D. A., Stelekati, E., Sweeney, M., Sullivan, B., Schuchter, L. M., Amaravadi, R., Wherry, E. J., Vonderheide, R. H. (2015). Abstract CT137: combination of agonistic CD40 monoclonal antibody CP-870,893 and anti-CTLA-4 antibody tremelimumab in patients with metastatic melanoma. *Cancer Research*, 75.
6. Bast, R. C., Zbar, B., Borsos, T., Rapp, H. J. (1974). BCG and cancer. *The New England Journal of Medicine*. 290,1458–69.
7. Baudino, T. (2015). Targeted cancer therapy: The next generation of cancer treatment. *Current Drug Discovery Technologies*. 12(1), 3-20.
8. Bonilla, F. A., Oettgen, H. C. (2010). Adaptive immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 125(2), 33-40.
9. Bostrom, P. J., Soloway, M. S. (2007). Secondary cancer after radiotherapy for prostate cancer: Should we be more aware of the risk? *European Urology*. 52(4), 973-982.
10. Bucci, M. K., Bevam, A., Roach, M. 3rd. (2005). Advances in radiation therapy: conventional to 3D, to IMRT, to 4D, and beyond. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 55(2), 117-34.
11. Caisová, V. (2017). *The study of cancer immunotherapy based on installation of phagocytosis stimulating ligands on the tumor cells surface and investigation of underlying mechanisms*. Disertační práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. 87 str.
12. Caisová, V., Uher, O., Nedbalová, P., Jochmanová, I., Kvardová, K., Masáková, K., Krejčová, G., Paďouková, L., Chmelař, J., Kopecký, J., Ženka, J. (2018). Effective

- cancer immunotherapy based on combination of TLR agonists with stimulation of phagocytosis. *International Immunopharmacology*. 59, 86-96.
13. Cancer [citace: 10. 12. 2017]. Dostupné z: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>
 14. Cario, E. (2008). Barrier-protective function of intestinal epithelial Toll-like receptor 2. *Mucosal Immunology*. 1, 62-6.
 15. Caruso, R., Warner, N., Inohara, N., Núñez, G. (2014). NOD1 and NOD2: signaling, host defense, and inflammatory disease. *Immunity*. 41(6), 898-908.
 16. Cascino, I., Papoff, G., De Maria, R., Testi, R., Ruberti, G. (1996). Fas/Apo-1 (CD95) receptor lacking the intracytoplasmic signaling domain protects tumor cells from Fas-mediated apoptosis. *The Journal of Immunology*. 156, 13-17.
 17. Cawley, T. N., Ballou, C. E. (1972). Identification of two *Saccharomyces cerevisiae* cell wall mannan chemotypes. *Journal of Bacteriology*. 111, 690-94.
 18. Cohen, M., Jessup, J., Felix, E. (1978). Metastatic cutaneous malignant melanoma. *Cancer*. 41, 2456-63.
 19. Coley, W. B. (1891). Contribution to the Knowledge of Sarcoma. *Annals of Surgery*. 14, 199-220.
 20. Coley, W. B. (1893). The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas: with a report of ten original cases. *The American Journal of the Medical Sciences*. 105, 487-510.
 21. 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.
 22. Cook, D. N., Pisetsky, D. S., Schwartz, D. A. (2004). Toll-like receptors in the pathogenesis of human disease. *Nature Immunology*. 5(10), 975-79.
 23. Crespo, H., Reina, R., Glaria, I., Ramírez, H., de Andrés, X., Jáuregui, P., Luján, L., Martínez-Pomeres, L., Amorena, B., de Andrés, D. F. (2011). Identification of the ovine mannose receptor and its possible role in Visna/Maedi virus infection. *Veterinary Research*. 42(1), 28.
 24. Cruse, J. M., Lewis, R. B. (2003). *Atlas of immunology*. Boca Raton: CRC Press. ISBN 0-8493-1567-0.
 25. Danciu, C., Falamas, A., Dehelean, C., Soica, C., Radeke, H., Barbu-Tudoran, L., Bojin, F., Cinta Pinzaru, S., Munteanu, M. F. (2013). A characterization of four B16

- murine melanoma cell sublines molecular fingerprint and proliferation behavior. *Cancer Cell International*. 13(1), 75-85.
26. Delneste, Y., Beauvillain, C., Jeannin, P. (2007). Innate immunity: structure and function of TLRs. *Medecine science (Paris)*. 23(1), 67-73.
27. Dienstbier, Z., Skala, E. (2014). *Co bychom měli vědět o rakovině*. Praha: Liga proti rakovině Praha. ISBN 978-80-260-7710-7.
28. Dzivenu, O. K., Phil, D., O'Donnell-Tormey, J. (2003). Cancer and the immune system: The Vital Connection. *Cancer Research Institute*. 1-45.
29. Facciabene, A., Motz, G. T., Coukos, G. (2012). T-regulatory cells: key players in tumor immune escape and angiogenesis. *Cancer Research*. 72, 2162-217.
30. Ferenčík, M., Rovenský, J., Mařha, V. (2000). *Dictionary of immunology*. Bratislava: Slovak Academic Press. ISBN 8088908-63-9.
31. Ferenčík, M., Rovenský, J., Mařha, V. (2005). *Imunitní systém: informace pro každého*. Praha: Grada. ISBN 8024711966.
32. Fife, B. T., Pauken, K. E. (2011). The role of the PD-1 pathway in autoimmunity and peripheral tolerance. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1217, 45–59.
33. Figdor, C. G., van Kooyk, Y., Adema, G. J. (2002). C-type lectin receptors on dendritic cells and langerhans cells. *Nature Reviews Immunology*. 2, 77-84.
34. 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
35. Francisco, L. M., Sage, P. T., Sharpe, A. H. (2011). The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunological reviews*. 236(1), 219-242.
36. Francisco, L. M., Salinas, V. H., Brown, K. E., Vanguri, V. K., Freeman, G. J., Kuchroo, V. K., Sharpe, A. H. (2009). PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *The Journal of Experimental Medicine*. 206, 3015-3029.
37. Franks, L. M., Teich, N. M. (1997). *Introduction to the cellular and molecular biology of cancer*. New York: Oxford University press. ISBN: 0-19-854854-0.
38. Fu, H., Karlsson, J., Bylund, J., Movitz, C., Karlsson, A. & Dahlgren, C. (2006). Ligand recognition and activation of formyl peptide receptors in neutrophils. *Journal of Leukocyte Biology*. 79, 247-256.

39. Gabay, C., Kushner, I. (1999). Acute - Phase Proteins and Other Systemic Responses to Inflammation. *The New England Journal of Medicine*. 340, 448-454.
40. Gerber, D. E. (2008). Targeted therapies: A new generation of cancer treatments. *American Family Physician*. 77(3), 311-319.
41. Gilboa, E. (2007). DC-based cancer vaccines. *Journal of Clinical Investigation*. 117, 1195-1203.
42. Ginsburg, I. (2002). Role of lipoteichoic acid and infection and inflammation. *The Lancet Infectious Diseases*. 2(3), 171–179.
43. Glaserová, S. (2015). *Studium klinicky aplikovatelné nádorové imunoterapie a jejich mechanismů*. Diplomová práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. 66 s.
44. Gupta, G. P., Massagué, J. (2006). Cancer metastasis: building a framework. *Cell*. 127(4), 679-695.
45. Hammerich, L., Binder, A., Brody, J. D. (2015). In situ vaccination: Cancer immunotherapy both personalized and off-the-shelf. *Molecular Oncology*. 9, 1996-1981.
46. Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., Lipford, G., Wagner, H., Bauer, S. (2004). Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science*. 303(5663), 1526-9.
47. Hicklin D.J., Marincola F. M., Ferrone S. (1999). HLA class I antigen downregulation in human cancers: T-cell immunotherapy revives an old story. *Molecular Medicine Today*. 15, 178-86.
48. Hodi, S. F., O'Day, S. J., McDermott, D. F., Weber, R. W., Sosman, J. A. (2010). Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. *The New England Journal of Medicine*. 363,711-72.
49. Horváthová, M. (2014). *Imunológia pre verejné zdravotníctvo a iné obory: Imunitní systém a chronické neprenosné ochorenia*. Bratislava: Slovenská zdravotnícka univerzita v Bratislave, Lekárska fakulta. ISBN 978-80-89702-08-4.
50. Hořejší, V., Bartůňková, J. (2005). *Základy imunologie*. Praha: Triton. ISBN 80-7254-686-4.
51. Hořejší, V., Bartůňková, J. (2009). *Základy imunologie*. Praha: Triton. ISBN 978-80-7387-280-9.
52. Hořejší, V., Bartůňková, J., Brdička, T., Špíšek, R. (2013). *Základy imunologie*. Praha: Triton. ISBN 978-80-7387-713-2.

53. Husníková, H. (2014). *Nádorová imunoterapie založená na použití ligandů fagocytárních receptorů, kotvených na nádorové buňky. Studium možností zesílení jejího účinku a specifity*. Diplomová práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. 83 s.
54. Huang, B., Zhao, J., Li, H., He, K., Chen, Y., Mayer, L., Unkeless, J. C., Xiong, H. (2005). Toll-like receptors on tumor cells facilitate evasion of immune surveillance. *Cancer Research*. 65, 5009-5014.
55. Chang, M. K., Binder, C. J., Torzewski, M., Witztum, J. L. (2002). C-reactive protein binds to both oxidized LDL and apoptotic cells through recognition of a common ligand: phosphorylcholine of oxidized phospholipids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 99, 13043-48.
56. Chong, A. S., Boussy, I. A., Graf, L. H., Scuderi, P. (1992). Stimulation of IFN-gamma, TNF-alpha, and TNF-beta secretion in IL-2-activated T cells: costimulatory roles for LFA-1, LFA-2, CD44, and CD45 molecules. *Cellular Immunology*. 144(1), 69-79.
57. Chuang, T. H., Ulevitch, R. J. (2000). Cloning and characterization of a sub-family of human toll-like receptors: hTLR7, hTLR8 and hTLR9. *European cytosine network*. 11(3), 372-8.
58. Chumchalová, J., Štěrbá, J., Múdrý, P. (2004). Manan vázající lektin a jeho význam v přirozené imunitě. *Česko-slovenská pediatrie*. 9, 477-81.
59. Jackson, S. P., Bartek, J. (2010). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*. 461(7267), 1071–1078.
60. Jačková, A. (2015). *Hledání agonistů TLR působících synergicky s ligandy fagocytárních receptorů v nádorové terapii*. Diplomová práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. 77 s.
61. Janotová, T., Auerová, M., Jalovecká, M., Švecová, I., Caisová, V., Bruzlová, P., Maierová, V., Kumžáková, Z., Čunátová, Š., Vlčková, Z., Rozsypalová, P., Lukáčová, K., Vácová, N., Wachtlová, M., Salát, J., Lieskovská, J., Kopecký, J., Ženka, J. (2014). The use of anchored agonists of phagocytic receptors for cancer immunotherapy: B16-F10 Murine melanoma model. *PloS ONE*. 9(1), e85222
62. Kaliper [citace: 10. 04. 2018]. Dostupné z: <http://chopn.registry.cz/index-en.php?pg=home--instruction-manual-for-ffmi-and-mamc-skinfold-measurement>

63. Kato, K., Itoh, C., Yasukouchi, T., Nagamune, T. (2004). Rapid protein anchoring into the membranes of mammalian cells using oleyl chain and poly (ethylene glycol) derivatives. *Biotechnology Progress*. 20 (3). 897-904.
64. Kawai, T., Akira, S.(2007). Signaling to NF- κ B by Toll-like receptors. *Trends in Molecular Medicine*. 13, 460-469.
65. Kawai, T., Akira, S.(2010).The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature Immunology*. 11, 373-384.
66. Kim U., Baumler A., Carruthers C., Bielat K. (1972). Immunological escape mechanism in spontaneously metastasizing mammary tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 72, 1012-1016.
67. Klener, P., Abrahámová, J., Petruželka, L., Zaloudík, J., Mališ, J., Matějovský, Z., Fait, V. (2002). *Klinická onkologie*. Praha: Galén. ISBN 80-246-0468-x.
68. Klener, P., Klener, P. jr. (2013). *Principy protinádorové systémové léčby*. Praha: Grada, 2013. ISBN 978-80-247-4171-0.
69. Krejsek, J., Kopecký, O. (2004). *Klinická imunologie*. Pardubice: Nucleus HK. ISBN: 80-86225-50-X.
70. Krejčová, G. (2016). *Nádorová imunoterapie založená na kombinaci TLR signalizace s aktivací fagocytózy. Studium mechanismů a možností dalšího zesílení účinku*. Bakalářská práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. 54 s.
71. Kvistborg, P., Philips, D., Kelderman, S., Hageman, L., Ottensmeier, Ch., Joseph-Pietras, D., Welters, M. J. P., van der Burg, S., Kapiteijn, E., Michielin, O., Romano, E., Linnemann, C., Speiser, D., Blank, Ch., Haanen, J. B., Schumacher, T. N., (2014). Anti-CTLA-4 therapy broadens the melanoma-reactive CD8+ T cell response. *Science Translational Medicine*. 6, 1-9.
72. Kvardová, K. (2016). *Nádorová imunoterapie založená na kombinaci TLR7 signalizace a aktivace fagocytózy nádorových buněk. Studium mechanismů a zesílení účinku*. Bakalářská práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. 56 s.
73. Kumar, H., Kawai, T., Akira, S. (2011). Pathogen Recognition by the Innate Immune System. *International Reviews of Immunology*. 30 (1), 16–34.
74. 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. 86 s.

75. Lackie, J. M. (2010). *A dictionary of biomedicine*. Oxford: Oxford University Press. ISBN 9780199549351.
76. Lawrence, T. (2009). The nuclear factor NF- κ B pathway in inflammation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 1(6), a001651.
77. LeBien, T. W., Tedder, T. F. (2008). B lymphocytes: how they develop and function. *Blood*. 112, 1570-1580.
78. Le, Y., Murphy, P. M., Wang, J. M. (2002). Formyl-peptide receptors revisited. *Trends in Immunology*. 23, 541-548.
79. Le, Y., Oppenheim, J. J. & Wang, J. M. (2001). Pleiotropic roles of formyl peptide receptors. *Cytokine and Growth Factor Reviews*. 12, 91-105.
80. Lee, Y. B., Kim, E. K., Park, H. J., Cho, B. K., Park, Y. M., Kim, J. W., Yoo, N. J., Park, Y. G., Oh, S. T. (2012). Expression of Fas and Fas ligand in primary cutaneous squamous cell carcinoma in association with grade of tumor differentiation. *International Journal of Dermatology*. 52, 1092–109.
81. Lee, S., Margolin, K. (2011). Cytokines in Cancer Immunotherapy. *Cancers*.3(4), 3856-3893.
82. Li, J., Piao, Y. F., Jiang, Z., Chen, L., Sun, H. B. (2009). Silencing of signal transducer and activator of transcription 3 expression by RNA interference suppresses growth of human hepatocellular carcinoma in tumor-bearing nude mice. *World Journal of Gastroenterology*. 15, 2602–2608.
83. Lipke, P. N., Ovalle, R. (1998). Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. *Journal of Bacteriology*. 180(15), 3735-3740.
84. Litzman, J., Kuklinek, P., Rybniček O. (2001). *Alergologie a klinická imunologie*. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví v Brně. ISBN: 80-7013-345-7.
85. Liu, J., Guo Y. M., Hirokawa, M., Iwamoto, K., Ubukawa, K., Michishita, Y., Fujishima, N., Tagawa, H., Takahashi, N., Xiao, W., Yamashita, J., Ohteki, T., Sawada, K. (2012). A synthetic double-stranded RNA, poly I:C, induces a rapid apoptosis of human CD34(+) cells. *Experimental Hematology*. 40 (4). 330–341.
86. Liyanage, U. K., Goedegebuure, P. S., Moore, T. T., Viehl, C. T., Moo-Young, T. A., Larson, J. W., Frey, D. M., Ehlers, J. P., Eberlein, T. J., Linehan, D. C. (2006). Increased prevalence of regulatory T cells (Treg) is induced by pancreas adenocarcinoma. *Journal of Immunotherapy*. 29, 416-24.
87. Mačák, J., Mačáková, J. (2004). *Patologie*. Praha: Grada. ISBN 80-247-0785-3.

88. Mahla, R. S. (2013). Sweeten PAMPs: Role of Sugar Complexed PAMPs in Innate Immunity and Vaccine Biology. *Front Immunol.* 4, 248.
89. Marabelle, A., Kohrt, H., Caux, C., Levy, R. (2014). Intratumoral Immunization: A New Paradigm for Cancer Therapy. *Clinical Cancer Research.* 20, 1747-1756.
90. Markovic, S. N., Erickson, L. A., Rao, R. D., Weenig, R. H., Pockaj, B. A., Bardia, A., Vachon, C. M., Schild, S. E., McWilliams, R. R., Hand, J. L., Laman, S. D., Kottschade, L. A., Maples, W. J., Pittelkow, M. R., Pulido, J. S., Cameron, J. D., Creagan, E. T. (2007). Malignant Melanoma in the 21st Century, Part 1: Epidemiology, Risk Factors, Screening, Prevention, and Diagnosis. *Mayo Clinic Proceedings.* 82(3), 364-380.
91. Martins, F. C., de Oliveira, C. F. (2009). Chemotherapy and the future: microdialysis as a local administration technique. *European journal of gynaecological oncology.* 30(1), 5-8.
92. Masáková, K. (2016). *Nádorová imunoterapie založená na mechanismech vrozené imunity a její optimalizace.* Bakalářská práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. 48 str.
93. Masopust, J., Průša, R. (2003). *Patobiochemie buňky.* Praha: České tiskárny s.r.o. ISBN 80-239-1011-0.
94. Maverakis, E., Kim, K., Shimoda, M., Gershwin, M., Patel, F., Wilken, R., Raychaudhuri, S., Ruhaak, L. R., Lebrilla, C.B. (2015). Glycans in the immune system and The Altered Glycan Theory of Autoimmunity. *Journal of Autoimmunity.* 57 (6), 1–13.
95. Medzhitov, R., Janeway, C. A. Jr. (1997). Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Current Opinion in Immunology.* 9(1), 4-9.
96. Medzhitov, R., Janeway, C. A. Jr. (2002). Innate immune recognition. *Annual review of Immunology.* 20(1), 197-21.
97. Meyer, T., Surber, C., French, L. E., Stockfleth, E. (2013). Resiquimod, a topical drug for viral skin lesions and skin cancer. *Expert Opinion on Investigational Drugs.* 22 (1), 149–159.
98. 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, 635–43.

99. NOF Corporation [citace: 23.03.2018] Biocompatible PEG anchors for cell membrane <BAM>. Dostupné z: http://www.pegdrug.com/peg_product/biocompatible.html.
100. Offermanns, S., Rosenthal, W. (2011). *Encyclopedia of Molecular Pharmacology*. New York: Springer. ISBN 978-3-540-38916-3.
101. Old, L. J., Chen, Y. T. (1998). New Paths in Human Cancer Serology. *The Journal of Experimental Medicine*. 187, 1163-1167.
102. O'Neill, L. A. J., Bryant, C. R., Doyle, S. L. (2009). Therapeutic Targeting of Toll-Like Receptors for Infectious and Inflammatory Diseases and Cancer. *Pharmacological Reviews*. 61(2), 177-19.
103. Osamu, T., Akira, S. (2010). Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell*. 140, 805-820.
104. Pardoll, D. M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer*. 12, 252–264.
105. Parmiani, G., De Filippo, A., Novellino, L., Castelli, C. (2007). Unique human tumor antigens: immunobiology and use in clinical trials. *Journal of immunology*. 178(4), 1975-9.
106. Pathak, S., Palan, U. (2005). *Immunology: essential and fundamental*. Enfield: Science Publishers. ISBN 978-1-84829-033-4.
107. Pelengaris, S., Khan, M., Blasco, M. A. (2006). *The molecular biology of cancer*. Oxford: Blackwell Pub. ISBN 978-1-405-11814-9.
108. Petruželka, L. (2009). Pohled na vývoj onkologie ve 3. tisíciletí. *Klinická onkologie*. 22(5): 243-244.
109. Pérez-Torres, A., Vera-Aguilera, J., Hernaiz-Leonardo, J. C., Moreno-Aguilera, E., Monteverde-Suarez, D., Vera-Aguilera, C., Estrada-Bárcenas, D. (2013). The Synthetic Parasite-Derived Peptide GK1 Increases Survival in a Preclinical Mouse Melanoma Model. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*. 28(9), 682-69.
110. Philipps, C., McMillan, M., Flood, P. M., Murphy, D. B., Forman, J., Lancki, D., Womack, J. E., Goodenow, R. S., Schreiber, H. (1985). Identification of a unique tumor-specific antigen as a novel class I major histocompatibility molecule. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 82, 5140-5144.
111. Porgador, A., Irvine, K. R., Iwasaki, A., Barber, B. H., Restifo, N. P., Germain, R. N. (1998). Predominant Role for Directly Transfected Dendritic Cells in Antigen

- Presentation to CD8+ T Cells after Gene Gun Immunization. *The Journal of Experimental Medicine*. 188, 1075-1082.
112. Proces fagocytozy [cit. 16. 01. 2018]. Dostupné z: <http://mad-physio.blogspot.cz/2010/07/what-is-infection-physical-barriers-and.html>
 113. Qu, W. M., Miyazaki, T., Terada, M., Okada, K., Mori, S., Kanno, H., & Nose, M. (2002). A novel autoimmune pancreatitis model in MRL mice treated with polyinosinic: polycytidylic acid. *Clinical & Experimental Immunology*. 129(1), 27-34.
 114. Rigel, D. S., Carucci, J. A. (2000). Malignant melanoma: prevention, early detection, and treatment in the 21st century. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 50(4), 215-36.
 115. Rovenský, J. (2006). *Revmatologický výkladový slovník*. Praha: Grada. ISBN 80-247-1614-3.
 116. Scott, A. M., Allison, J. P., Wolchok, J. D. (2012). Monoclonal antibodies in cancer therapy. *Cancer Immunity*. 12, 1.
 117. Sharpe, A. H. (2017). Introduction to checkpoint inhibitors and cancer immunotherapy. *Immunological Reviews* [online]. 276(1), 5-8 [cit. 2018-02-20].
 118. Shimada, S., Yano, O., Inoue, H., Kuramoto, E., Fukuda, T., Yamamoto, H., Kataoka, T., Tokunaga, T. (1985). Antitumor activity of the DNA fraction from Mycobacterium bovis BCG. II. Effects on various syngeneic mouse tumors. *Journal of the National Cancer Institute*. 74, 681-8.
 119. Siegel, R. L., Miller, K. D., Jemal, A. (2015). Cancer statistics 2015. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 65(1), 5-29.
 120. Silhavy, T. J., Kahne, D., Walker, S. (2010). The Bacterial Cell Envelope. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2(5), a000414.
 121. 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.
 122. Singh, M., Overwijk, W. W. (2015). Intratumoral immunotherapy for melanoma. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 64, 911-921.
 123. Shulgin, B., Helminger, G., Kosinsky, Y., Freitas, A. A. (2016). A Generic Mechanism for Enhanced Cytokine Signaling via Cytokine-Neutralizing Antibodies. *PLOS ONE*. 11(2), e0149154.

124. Springer, T. A. (1990). Adhesion receptors of the immune system. *Nature*. 346, 425-434.
125. Stahl, P. D., Ezekowitz, R. A. B. (1998). The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense. *Current Opinion in Immunology*.10(1), 50-55.
126. Stachová, D. (2017). *Možnosti targetingu v oblasti nádorové imunoterapie*. Bakalářská práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. 48 s.
127. Stevenson, F. K., Ottensmeier, C. H., Johnson, P., Zhu, D., Buchan, S. L., McCann, K. J., Roddick, J. S., King, A. T., McNicholl, F., Savelyeva, N., Rice, J. (2004). DNA vaccines to attack cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 101, 14646–14652.
128. Stříteský, J. (2001). *Patologie*. Olomouc: EPAVA. ISBN 978-80-86297-06-4.
129. Sudhakar, A. (2009). History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods. *Journal of cancer science & therapy*. 1(2), 1–4.
130. Šterzl, I. (2007). *Základy imunologie pro zubní a všeobecné lékaře*. Praha: Karolinum. ISBN: 9788024609720.
131. Štork, J., Arenberger, P., Pizinger, K., Semrádová, V., Vosmík, F. (2008). *Dermatovenerologie*. Praha: Galén. ISBN 9788072623716.
132. Takahashi, K., Ezekowitz, R. A. B. (2005). The role of the mannose-binding lectin in innate immunity. *Clinical Infectious Diseases*. 41 (7). 440–444.
133. Teicher, B. A. (2002). *Tumor models in cancer research*. New York: Humana Press. ISBN 978-1-60761-967-3.
134. Thomas, J. A., Badini, M. (2011). The role of innate immunity in spontaneous regression of cancer. *Indian Journal of Cancer*. 48, 246-251.
135. Thompson, M. R., Kaminski, J. J., Kurt-Jones, E. A., Fitzgerald, K. A. (2011). Pattern recognition receptors and the innate immune response to viral infection. *Viruses Journal*. 3 (6). 920–940.
136. Thompson, D., Pepys, M. B., Wood, S. P. (1999). The physiological structure of human C-reactive protein and its complex with phosphocholine. *Structure*. 7(2), 169-177.
137. Tomai, M. A., Gibson, S. J., Imbertson, L. M., Miller, R. L., Myhre, P. E., Reiter, M. J., Wagner, T. L., Tamulinas, CH. B., Beaurline, J. M., Gerster, J. F., Horton, V. L. (1995). Immunomodulation and antiviral activities of the imidazoquinoline S-28463. *Antiviral Research*. 28, 253–64.

138. Underhill, D. M., Gantner, B. (2004). Integration of Toll-like receptor and phagocytic signaling for tailored immunity. *Microbes and infection*. 6(15), 1368-1373.
139. Van der Poll, T., Keogh, C. V., Guirao, X., Buurman, W. A., Kopf, M., Lowry, S. F. (1997). Interleukin-6 gene-deficient mice show impaired defense against pneumococcal pneumonia. *The journal of infectious diseases*. 176(2), 439-44.
140. Varricchio, C. G. (2004). *A Cancer Source Book for Nurses*. 8th Edition. Jones & Bartlett Publishers. ISBN 0763732761.
141. Vorlíček, J., Abrahámová, J., Vorlíčková, H. (2006). *Klinická onkologie pro sestry*. Praha: Grada. ISBN 80-247-1716-6.
142. Vorlíček, J., Adam, Z., Šmardová, L., Vorlíčková, H. (2013). *Chemoterapie a vy: rady pro nemocné léčené chemoterapií*. Praha: Medical Tribune CZ. ISBN 978-80-87135-51-8.
143. Waldmannová, E., Caisová, V., Fáberová, J., Sváčková, P., Kovářová, M., Sváčková, D., Kumžáková, Z., Jačková, A., Vácová, N., Nedbalová, P., Horká, M., Kopecký, J., Ženka, J. (2016). The use of Zymosan A and bacteria anchored to tumor cells for effective cancer immunotherapy: B16-F10 murine melanoma model. *International immunopharmacology*. 39, 295-306.
144. Warren, H. S., Fitting, C., Hoff, E., Adib-Conquy, M., Beasley-Topliffe, L., Tesini, B., Liang, X., Valentine, C., Hellman, J., Hayden, D., Cavaillon, J. M. (2010). Resilience to bacterial infection: difference between species could be due to proteins in serum. *The Journal of Infectious Diseases*. 201(2). 223-32.
145. Weaver, C. T., Hatton, R. D., Mangan, P. R., Harrington, L. E. (2007). IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annual review of immunology*. 25, 821-52.
146. Weinberg, R. A., Hanahan, D. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*. 100(1), 57-70.
147. Weinberg, R. A., Hanahan, D. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 144(5), 646-674.
148. Weiner, L. M., Surana, R., Wang, S. (2010). Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. *Nature Reviews Immunology*. 10(5), 317-327.
149. Yamaue, H., Tanimura, H., Tsunoda, T., Iwahashi, M., Tani, M., Tamai, M., Inoue, M. (1990): Functional and phenotypic analyses of interleukin 2-activated tumorinfiltrating lymphocytes. *Biotherapy*. 2(3), 247-259.

150. 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 and Disease. *Cells*. 4(2), 178-201.
151. Zbar, B., Tanaka, T. (1971). Immunotherapy of cancer: regression of tumors after intralesional injection of living *Mycobacterium bovis*. *Science*. 172, 271–3.
152. Zhou, Y. G., Li, J., Wang, Y., Ye, L., Dai, M., Zhou, L. (2013). TLR3 activation efficiency by high or low molecular mass poly I:C. *Journal of Innate Immunity*. 19(2), 184-192.

Seznam obrázků

Obr.1: Proces fagocytózy; (převzato z: http://mad-physio.blogspot.cz/2010/07/what-is-infection-physical-barriers-and.html).....	13
Obr. 2: Signalizační dráhy Toll-like receptorů; (převzato z Luke a kol, 2009)	21
Obr. 3: Kaliper (převzato z http://chopn.registry.cz/index-en.php?pg=home--instruction-manual-for-ffmi-and-mamc-skinfold-measurement).....	27
Obr. 4: Vliv anti-CTLA 4 samotné a v kombinaci s TLR agonisty a kotveným mananem na růst melanomu B16-F10	30
Obr. 5: Vliv anti-CTLA 4 samotné a v kombinaci s TLR agonisty a kotveným mananem na růst melanomu B16-F10 – vyhodnocení ploch pod křivkou (AUC), *= p<0,05; **= p<0,01 vztaženo ke kontrolní skupině PBS.....	31
Obr. 6: Vliv anti-CTLA 4 samotné a v kombinaci s TLR agonisty a kotveným mananem na délku přežití myši s transplantovaným melanomem B16-F10.....	31
Obr. 7: Intratumorální terapie založená na redukovaném počtu terapeutických dávek.....	32
Obr. 8: Intratumorální terapie založená na redukovaném počtu terapeutických dávek – vyhodnocení ploch pod křivkou (AUC), *= p<0,05; **= p<0,01 vztaženo ke kontrolní skupině PBS.....	33
Obr. 9: Intratumorální terapie založená na redukovaném počtu terapeutických dávek – analýzy přežití.....	34

Seznam tabulek

Tab. I: Přehled Toll-like receptorů (převzato a upraveno dle Kvardová, 2016).....	21
--	----