

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Přírodovědecká fakulta**

# **Adenosin a nádorová imunoterapie**

Bakalářská práce

**Andrea Frejlachová**

Školitel: RNDr. Jan Ženka, CSc.

České Budějovice 2018

Frejlachová A., 2018: Adenosin a nádorová imunoterapie. [Adenosine and cancer immunotherapy. Bc. Thesis, in Czech] - 60 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

#### **Annotation:**

The aim of this bachelor thesis was to study the immunosuppressive effects of adenosine and the use this knowledges in cancer immunotherapy. The impact of enzymatic removal of adenosine on efficacy of cancer immunotherapy was examined using murine pancreatic model Panc02.

#### **Prohlášení:**

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

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

V Českých Budějovicích, 11. 04. 2018 .....

Andrea Frejlachová

**Poděkování:**

Děkuji svému školiteli RNDr. Janu Ženkovi, CSc. za věnovaný čas, ochotu a odborné vedení při zpracování mé bakalářské práce. Ráda bych poděkovala i své rodině za podporu během studia.

## Obsah

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>PŘEHLED LITERATURY</b> .....	<b>2</b>
2.1	Nádorová onemocnění .....	2
2.1.1	Biologie nádorových buněk .....	2
2.1.2	Klasifikace nádorových onemocnění .....	3
2.1.3	Šíření nádoru .....	3
2.1.4	Pankreatický karcinom .....	4
2.1.5	Léčba nádorových onemocnění .....	5
2.2	Imunitní systém .....	6
2.2.1	Nespecifická (vrozená) imunita .....	7
2.2.2	Specifická (získaná) imunita .....	7
2.2.3	Protinádorová imunita .....	8
2.3	Adoptivní imunoterapie .....	14
2.4	Nádorová imunoterapie založená na stimulaci specifické imunity .....	15
2.5	Nádorová imunoterapie založená na stimulaci nespecifické imunity .....	15
2.5.1	Pattern recognition receptors (PRRs) .....	16
2.5.2	Naše imunoterapie založená na kombinaci TLR agonistů a ligandů fagocytárních receptorů .....	16
2.6	Adenosin .....	19
2.6.1	Adenosinové receptory .....	19
2.6.2	Adenosin a jeho tvorba v nádorech .....	21
2.6.3	Adenosin a vrozená (nespecifická) imunita .....	25
2.6.4	Adenosin a získaná (specifická) imunita .....	26
2.6.5	Adenosin a nádorová imunoterapie .....	27
<b>3</b>	<b>CÍLE PRÁCE</b> .....	<b>31</b>
<b>4</b>	<b>MATERIÁL A METODY</b> .....	<b>32</b>

4.1	Chemikálie .....	32
4.2	Laboratorní zvířata.....	32
4.3	Nádorové buněčné linie .....	32
4.4	Příprava buněk Panc02 .....	33
4.5	Transplantace buněk Panc02.....	33
4.6	Měření velikosti nádorů .....	33
4.7	Příprava terapeutických látek.....	34
4.7.1	Syntéza manan-BAM .....	34
4.7.2	Příprava ADA-BAM, PNP-BAM, anti-CD40-BAM .....	34
4.7.3	Příprava imunoterapeutik .....	34
4.8	Statistické vyhodnocení dat .....	34
<b>5</b>	<b>EXPERIMENTY .....</b>	<b>35</b>
5.1	Terapie pankreatického adenokarcinomu pomocí enzymů ADA a PNP.....	35
5.2	Terapie pankreatického adenokarcinomu pomocí kotvení anti-CD40 .....	36
<b>6</b>	<b>VÝSLEDKY.....</b>	<b>37</b>
6.1	Terapie pankreatického adenokarcinomu pomocí enzymů ADA a PNP.....	37
6.2	Terapie pankreatického adenokarcinomu pomocí kotvení anti-CD40 .....	40
<b>7</b>	<b>DISKUSE .....</b>	<b>43</b>
<b>8</b>	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>46</b>
<b>9</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....</b>	<b>47</b>
<b>10</b>	<b>CITOVANÁ LITERATURA .....</b>	<b>50</b>

# 1 ÚVOD

Podle Národního onkologického registru ČR bylo v roce 2015 nahlášeno celkem 94 462 nových případů zhoubných novotvarů a 26 852 osob na nádorová onemocnění zemřelo. Po kardiovaskulárních onemocnění jsou nádorová onemocnění v České Republice druhou nejčastější příčinou úmrtí.

90–95 % všech nádorových onemocnění se přisuzuje životnímu prostředí a životnímu stylu jedince a pouze 5–10 % případů nádorových onemocnění je dáno geneticky. Mezi hlavní rizikové faktory zhoubných novotvarů se řadí kouření, alkohol, sluneční záření, infekce, obezita, nezdravá strava, nedostatečná pohybová aktivita, znečištěné životní prostředí a stres (Anald a kol., 2008).

K léčbě nádorových onemocnění se v dnešní době nejčastěji využívá kromě chirurgie chemoterapie a radioterapie. Bohužel oba tyto způsoby léčby jsou velmi nespecifické, a kromě zhoubných buněk poškozují i zdravé buňky. Vzrůstá tedy snaha najít způsob léčby, který by byl specifický pouze pro nádorové buňky. Velmi vhodnou volbou se zdá být imunoterapie, která využívá přirozených imunitních mechanismů a směřuje léčiva přímo do místa nádoru.

Proto je i tato bakalářská práce zaměřena na imunoterapii nádorových onemocnění a hledá vhodné prostředky, které by mohly přispět k vývoji terapeutik.

## **2 PŘEHLED LITERATURY**

### **2.1 Nádorová onemocnění**

Nádorové onemocnění, také rakovina či zhoubný novotvar lze charakterizovat jako abnormální tkáň vyznačující se nekontrolovatelným růstem. Rakovinové buňky se vyvíjí v určité části těla, nezanikají a opětovně se dělí (Sudhakar, 2009).

Příčinou růstových odchylek jsou změny genotypu, ke kterým došlo postupně v průběhu nádorové transformace somatické buňky. Současně je zastáván názor, že všechny nádorové buňky pocházejí z jedné transformované buňky, se kterou mají společný alespoň jeden znak. Další vlastnosti těchto buněk jsou výsledkem vývoje nádoru (Rejthar a Vojtěšek, 2002).

#### **2.1.1 Biologie nádorových buněk**

Ve všech somatických buňkách jednoho organismu se nachází stejný genom. Výjimku tvoří pouze lymfocyty, u kterých dochází ke ztrátě některých genových úseků při somatické rekombinaci genů. V dospělém organismu dochází k buněčné homeostáze. Na té se podílí proliferace buněk, programovaná buněčná smrt a terminální diferenciace buněk. Tyto tři základní děje jsou geneticky podmíněné (Petera a kol., 2005).

Při nádorové transformaci somatické buňky dochází k narušení této rovnováhy. Navzdory velké různorodosti fenotypických projevů lze najít charakteristické znaky, kterými se nádorové buňky liší od buněk zdravých (Petera a kol., 2005).

Jedná se o neomezený replikační potenciál, soběstačnost v potřebě růstových faktorů, neschopnost aktivace apoptózy (programovaná buněčná smrt), necitlivost vůči růst regulujícím signálům, angiogeneze (novotvorba krevních cév), invazivita a metastazování (prorůstání do zdravé tkáně a tvorba sekundárních ložisek) u maligních nádorů (Hanahan a Weinberg, 2000).

## 2.1.2 Klasifikace nádorových onemocnění

Podle vztahu nádoru k okolní tkáni a podle biologického a klinického chování lze rozlišit nádory benigní, maligní, nádory potencionálně maligní a semimaligní. **Nádory benigní (nezhoubné)** rostou expanzivně, většinou pomalu a jsou ohraničené. Nemetastazují, dají se snadno chirurgicky odstranit a na své okolí působí pouze mechanickým tlakem. Jedince mohou i přes svou relativní neškodnost ohrožovat nepříznivou lokalizací (centrální nervová soustava) nebo endokrinní aktivitou (toxické nádory štítné žlázy). **Maligní (zhoubné) nádory** rostou vůči okolní tkáni agresivně a mají schopnost metastazovat. Oproti okolní tkáni bývají nepřesně ohraničené a jsou chirurgicky obtížněji odstranitelné. Poslední skupinou jsou **potencionálně maligní a semimaligní nádory**, u kterých nelze přesně určit pomocí běžných diagnostických metod malignitu či benignitu (Rejthar a Vojtěšek, 2002).

Dále lze klasifikovat nádorová onemocnění podle tkáně, ze které vznikají. Rozlišují se nádory mezenchymové, epitelové, neuroendokrinní, smíšené, nádory z krvetvorné tkáně kostní dřeně, lymfomy, choriokarcinomy a mezoteliomy (Vorlíček a kol., 2006).

Nádory se rozlišují i podle anatomické lokalizace, tedy místa, kde nádor u pacienta vznikl (Vorlíček a kol., 2006).

## 2.1.3 Šíření nádoru

Buněčné migrace jsou jednou z důležitých součástí buněčných procesů, jako je embryogeneze, nebo imunitní odpověď (Kovaříková a kol., 2004). Šíření nádorových buněk je ale spojeno s vytvářením dceřiných nádorů, zvaných metastáz. Metastázy se mohou nacházet v tkáních, orgánech, tělních dutinách či lymfatických uzlinách. Jejich přítomnost souvisí s nepříznivou prognózou (Adam a Vorlíček, 2004).

Podle způsobu šíření se rozdělují tři druhy metastáz. **Hematogenní metastázy** vznikají při šíření nádorových buněk krevním řečištěm, často tak zakládají vzdálená druhotná ložiska. Typickým příkladem je šíření karcinomu tlustého střeva do jater. Nádorové buňky šířící se lymfatickými cestami zakládají **lymfogenní metastázy** a dále se vlivem vyústění lymfatických cév do krevního řečiště rozšiřují hematogenní cestou. **Implantační metastázy** se vyskytují v serózních a obdobně preformovaných dutinách (kloubní prostory,



perikard). Zvláštní typ implantačních metastáz, kdy došlo k šíření vývodu v prostředí epitelu dutých orgánů (močové cesty, děložní dutina), se označuje jako metastázy porogenní (Rejthar a Vojtěšek, 2002; Adam a Vorlíček, 2004).

## 2.1.4 Pankreatický karcinom

Rakovina slinivky břišní je onemocnění s velmi špatnou prognózou. Symptomy se u většiny pacientů objeví až v pokročilém stádiu nádoru, kdy jsou přítomny i metastázy (Luo a kol., 2012). Nádor prorůstá do okolních tkání, následně metastazuje do regionálních a nitrobřišních uzlin a později do jater i plic. Chirurgická léčba je považována za jedinou potencionálně léčivou metodu a po operaci obvykle následuje chemoterapie (Kamisawa a kol., 2016; Petruželka a Konopásek, 2003).

Pouze 15–20 % pacientů od stanovení diagnózy přežije 5 let, průměrně jsou to ale jen 2 roky. Typickou histologickou vlastností pankreatického karcinomu je obrovské stroma obklopující nádorové buňky, které se dává do souvislosti s podporou růstu a progresu nádorové tkáně. Stroma tvoří dokonce až 90 % objemu nádoru. (Luo a kol., 2012).

Genetickou změnou je způsobeno 5–10 % rakovin pankreatu. Nejrizikovějším faktorem pankreatického karcinomu je kouření, následuje obezita a chronická pankreatitida, která se v Evropě přisuzuje nadměrné konzumaci alkoholu (Ducreux a kol., 2015).

Rakovina pankreatu může vzniknout z endokrinního nebo exokrinního parenchymu žlázy. **Endokrinní nádory** pankreatu jsou poměrně vzácné. V naprosté většině případů se jedná o **exokrinní nádor**, který může vznikat z duktálního epitelu, acinózních buněk nebo pojivové tkáně. Obvykle se nádor vyskytuje v hlavě pankreatu, méně často v těle pankreatu a výjimečně v ocasu. Pouze 2 % nádorů v exokrinní části pankreatu jsou benigní a nejčastěji se jedná o maligní duktální pankreatický adenokarcinom (Ducreux a kol., 2015).

### 2.1.4.1 Myší pankreatický karcinom Panc02 studovaný v této práci

Panc02 představuje myší model duktálního adenokarcinomu pankreatu. Patří mezi nejagresivnější nádory vůbec (Priebe a kol., 1992).

### 2.1.5 Léčba nádorových onemocnění

Nejstarším a stále nejběžnějším léčebným postupem je **chirurgická léčba** (Sudhakar, 2009). Kurativní chirurgická léčba spočívá v odstranění části nebo celé hmoty nádoru spolu s odstraněním spádových lymfatických uzlin, kde mohou být přítomny metastázy. Na rozdíl od maligních nádorových onemocnění, kdy se po operaci aplikuje radioterapie nebo chemoterapie je u benigních nádorových onemocnění chirurgická léčba zásadním a konečným řešením. Paliativní chirurgická terapie slouží ke zkvalitnění a prodloužení života pacienta (Petera a kol., 2005).

**Chemoterapie** se aplikuje systémově prostřednictvím cytostatik, což jsou látky cytotoxické povahy zabíjející všechny rychle se dělící buňky v organismu. Bohužel tak kromě buněk nádoru dochází i k poškození zdravých tkání se schopností rychlé obnovy, jako jsou např. vlasové folikuly, zárodečné buňky nebo buňky kostní dřeně (Klener, 2008; Petera a kol., 2005). Jedním z nejčastěji používaným a zároveň i nejúčinnějším chemoterapeutikem v léčbě pokročilého pankreatického karcinomu je gemcitabin. Při jeho použití bylo u pacientů prokázáno zlepšení klinických příznaků a mírné prodloužení života (Liu a kol., 2014).

**Radioterapie** využívá vlastností fotonového a elektronového záření, případně toku protonů, které vedou k nevratným změnám v DNA a tím i k destrukci nádorových buněk. Buňky jsou na radiologické záření nejcitlivější v G<sub>2</sub> a M fázi buněčného cyklu (Adam a Vorlíček, 2004). Stejně jako při chemoterapii se při radioterapii nelze vyvarovat poškození zdravé okolní tkáně, proto se tato metoda využívá spíše k doplnění chemoterapie nebo chirurgické léčby (Hynková a Doležalová, 2008). Citlivost na záření se u různých nádorů liší. Mezi extrémně citlivé patří lymfomy, leukemie a nádory ze zárodečných buněk. Za středně citlivé se považují karcinomy a radiorezistentní jsou hlavně gliomy a sarkomy (Adam a Vorlíček, 2004).

**Bioterapie** je léčba pomocí látek, jež jsou z chemického hlediska totožné nebo podobné látkám, které fyziologicky produkují vlastní buňky organismu. Terapeutické koncentrace těchto látek jsou mnohonásobně vyšší než hodnoty přirozeně tvořené v organismu (Adam a Vorlíček, 2004). Do bioterapie lze zařadit i **imunoterapii** využívající síly a specifčnosti imunitního systému v boji proti rakovině. Imunitní systém se musí stimulovat do té míry, aby efektorové buňky byly schopné zlikvidovat nádorové buňky

a došlo k úplnému vyléčení. Identifikace nádorově specifických antigenů na molekulární úrovni umožnila vývoj antigen-specifické imunoterapie (Palucka a Banchereau, 2012).

**Hormonální terapie** se využívá především při léčbě nádorů závislých na působení hormonů, nejčastěji se jedná o karcinom prsu a karcinom prostaty (Adam a Vorlíček, 2004). Stimulace růstu nádorových buněk endogenními hormony je závislá na přítomnosti hormonálních receptorů v buňkách nádoru. Proto je cílem hormonální léčby zamezit interakci těchto receptorů s jejich endogenními ligandy (Petera a kol., 2005). Toho lze dosáhnout zablokováním navázání těchto hormonů na jejich receptory, nebo potlačením fyziologické tvorby nežádoucích hormonů v těle (Adam a Vorlíček, 2004).

## 2.2 Imunitní systém

Jedním ze základních homeostatických mechanismů organismu je imunitní systém. Organismus chrání proti škodlivinám zevního i vnitřního původu tím, že je dokáže rozpoznat a zlikvidovat. Mezi jeho tři základní funkce patří obranyschopnost, autotolerance a imunitní dohled. Obranyschopnost se projevuje jako rozpoznání vnějších škodlivin imunitním systémem a ochrana před toxickými produkty patogenních mikroorganismů. Autotolerance umožňuje rozpoznat vlastní tkáň a udržovat vůči nim toleranci. Imunitním dohledem se rozumí rozpoznání a odstranění vnitřních škodlivin jako jsou mutované, staré nebo poškozené buňky (Hořejší a kol., 2017). Narušením homeostatické rovnováhy dochází k rozvoji zánětlivé obranné reakce (Krejsek a kol., 2016).

Imunitní mechanismy se rozlišují na dvě kategorie, které spolu vzájemně spolupracují. První kategorií je nespecifická, neadaptivní nebo také vrozená imunita. Druhou kategorií tvoří antigenně specifická, adaptivní či získaná imunita. Součástí obou těchto kategorií jsou zároveň složky humorální zastoupené sérovými proteiny a sekretovanými molekulami, a složky buněčné, které jsou zastoupeny různými typy buněk (Hořejší a kol., 2017). Při eliminaci nádorových onemocnění nemá humorální složka adaptivní imunity tak významnou roli, jako buněčná složka imunity (Klener a Klener jr., 2013).

### 2.2.1 Nespecifická (vrozená) imunita

Nespecifická imunita je na rozdíl od imunity specifické evolučně starší a nevyvinula se u ní imunologická paměť. Odpověď na přítomnost patogenu přichází velmi rychle, řádově v minutách. Humorální složku nespecifické imunity zastává komplement, interferony, laktiny a další sérové bílkoviny. Buněčnou nespecifickou složku imunity představují fagocytující buňky (dendritické buňky, neutrofilny, eozinofily, makrofágy a bazofily) a přirozeně cytotoxické buňky (NK buňky – *natural killers*) (Hořejší a kol., 2017). Nejvýznamnější funkcí vrozené imunity je zřejmě vyvolání zánětu (Krejsek a kol., 2016).

Buňky vrozené imunity dokáží rozpoznat struktury, které jsou přítomny na povrchu mikroorganismů, jsou to tzv. PAMPs (*pathogen associated molecular patterns*). Může se jednat například o lipopolysacharidy (typické pro Gram-negativní bakterie), peptidoglykany (Gram-pozitivní bakterie) nebo glukany a mannany (kvasinky a plísně) (Hořejší a kol., 2017).

Poškození vlastních buněk organismu vlivem infekce nebo přirozených fyziologických procesů je ohlášeno pomocí signálů vnitřního poškození tzv. DAMPs (*damage associated molecular patterns*). Signály PAMPs a DAMPs jsou identifikovány prostřednictvím receptorů PRRs (*pattern recognition receptors*) nacházejících se na buněčných strukturách obratlovců (Krejsek a kol., 2016; Marabelle a kol., 2014).

Na udržování integrity organismu a jeho ochranu proti infekcím mají vliv i tzv. přirozené bariéry, které jsou sice svojí povahou mimo imunitní systém, ale představují první obranné bariéry lidského těla (Krejsek a kol., 2016). Působí na úrovni mechanické (pohyb řasinek a tekutiny v močových cestách), chemické (mastné kyseliny na kůži, enzymy ve slzách, potu nebo žaludečních šťávách) a mikrobiální (přirozená bakteriální flóra v trávicím ústrojí) (Hořejší a kol., 2017).

### 2.2.2 Specifická (získaná) imunita

Pro působení buněk získané imunity je nezbytná předchozí aktivace pomocí buněk vrozené imunity. Aktivace specifických mechanismů trvá déle, obvykle 4–5 dní od zahájení imunitní odpovědi, zato se ale uplatňují velice specifické molekuly (Delves a kol. 2012).

Mezi buňky získané imunity patří T lymfocyty, B lymfocyty a plazmatické buňky. Typická je pro ně schopnost imunologické paměti. Ta při opětovném setkání s antigenem umožňuje zajistit rychlejší a silnější imunitní odpověď než při primárním setkání s antigenem. Mezi další jejich charakteristické vlastnosti patří specifita, která zajišťuje rozpoznání i nepatrných rozdílů mezi antigeny a diverzita, což je schopnost umožňující vytvoření řad struktur rozpoznávající různé antigeny (Delves a kol., 2012).

Specifická imunita je evolučně mladší a je známa až u obratlovců. Humorální složka specifické imunity je založená na protilátkách, oproti tomu buněčná složka je založená především na T lymfocytech (Hořejší a kol., 2017).

### 2.2.3 Protinádorová imunita

Nádorové buňky se od normálních somatických buněk liší více či méně. Teoreticky by proto měly být rozpoznány imunitními mechanismy a zničeny. Problém nastává v tom, že odlišnosti od normálních tělních buněk jsou buď příliš malé, takže je imunitní systém přehlídne, nebo nádorové buňky používají mechanismy, jež jim umožňují se proti imunitnímu systému bránit (Hořejší a kol., 2017).

#### 2.2.3.1 Nádorové antigeny

Základním předpokladem reakce imunitního systému s nádorovými buňkami je přítomnost nádorových antigenů, které imunitní systém rozpozná jako cizí. Za nádorově specifický povrchový antigen může být označen jakýkoli protein produkovaný v nádorových buňkách mající vlivem mutací odlišnou strukturu (Delves a kol. 2012).

Nádorové antigeny lze rozdělit do dvou skupin. **Antigeny nádorově specifické** (TSA – *tumor-specific antigens*) se na normálních buňkách nevyskytují a jsou tedy charakteristické pro nádorové buňky. Mezi takovými jsou komplexy HLA (*human leukocyte antigens*) – molekul I. třídy s imunogenními peptidy, vzniklými štěpením produktů mutovaných genů v nádorové buňce. Jsou typické pro nádory podmíněné chemickými karcinogeny. Dále komplexy HLA – molekul I. třídy s imunogenními peptidy pocházejícími z onkogenních virů a některé změněné formy glykoproteinů, které vznikají připojením

kyseliny sialové na koncové oligosacharidy povrchových glykoproteinů nádorových buněk, tím dochází k odlišení od normálních buněk (Ferenčík a kol., 2005; Hořejší a kol., 2017).

Druhou skupinou jsou **antigeny asociované s nádory** (TAA – *tumor-associated antigens*), které se vyskytují i na normálních buňkách. Odlišnost je založena na zvýšené expresi neboli počtu, ve kterém jsou přítomny na nádorových a normálních buňkách, popř. na abnormálním časovém výskytu (Klener, 2013; Hořejší a kol., 2017). Patří sem např. onkofetální antigeny přítomné na normálních embryonálních buňkách. V postnatálním období se ale ztrácejí a objevují se znovu na některých nádorových buňkách. Je to např. karcinoembryonální antigen (CEA) nebo  $\alpha$ -fetoprotein (AFP) (Ferenčík a kol., 2005). Tyto antigeny slouží jako markery využívané k diagnostice nádorových onemocnění (Hořejší a kol., 2017).

### 2.2.3.2 Buňky imunitního systému významné při nádorovém onemocnění

**T lymfocyty** se vyvíjejí v brzlíku (*thymus*) a patří mezi základní buňky získané imunity. Thymus opouštějí prekurzory pomocných T buněk (Th) mající na svém povrchu receptor  $CD4^+$  a prekurzory cytotoxických T buněk (Tc), které mají na povrchu receptor  $CD8^+$ . Po setkání s antigen prezentujícími buňkami (APC – *antigen-presenting cell*) rozeznávají antigen ve spojení s MHC molekulami (molekuly hlavního histokompatibilního komplexu – *major histocompatibility complex*) a diferencují se na zralé efektorové Th lymfocyty a Tc lymfocyty. Rozpoznání antigenu jim umožňuje T buněčný receptor (TCR – *T-cell receptor*) nacházející se na povrchu T lymfocytů (Hořejší a kol., 2017).  $CD4^+$  lymfocyty (Th) rozpoznávají antigen v komplexu s MHC II molekulami a jsou hlavními producenty cytokinů regulující další buňky.  $CD8^+$  lymfocyty (Tc), též zvané CTL rozpoznávají antigen ve spojení s MHC I molekulami a likvidují buňky napadené virem, nebo nádorové či jiné abnormální buňky. K usmrcení využívají přímého kontaktu s napadenou buňkou a vyvolávají tak apoptózu, nebo uvolňují toxiny do extracelulárního prostoru (Ferenčík a kol., 2005).

**NK buňky** se označují jako velké granulární lymfocyty (LGL – *large granular lymphocytes*). Patří mezi složky nespecifické imunity a vývojově i funkčně se podobají spíše T lymfocytům, ale na rozdíl od nich NK buňky postrádají antigenní specifitu a dozrávají spíše v kostní dřeni a v periferní krvi než v thymu (Ames a Murphy, 2014). Nádorové buňky

a některé viry se brání před rozpoznáním Tc lymfocyty tím, že na svém povrchu exprimují velmi malé množství MHC I molekul. Právě NK buňky dokáží tyto abnormální buňky rozeznat a odstranit (Hořejší a kol., 2017). Kromě obranné funkce plní NK buňky i funkci regulační prostřednictvím cytokinů, jako je např. IFN- $\gamma$ , některé interleukiny, GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony stimulating factor*) a TNF $\alpha$  (*tumor necrosis factor alfa*). Charakteristická je pro ně také molekula CD56 a CD16 (Krejsek a kol., 2016). Ze svých granulí dokáží uvolňovat cytotoxické proteiny – perforiny a granzymy. Perforiny po svém uvolnění vytvářejí na membránách cílových buněk póry, granzymy poté přes póry proniknou a navodí apoptózu (Ames a Murphy, 2004).

**Makrofágy** vznikají diferenciací z krevních monocytů. Nacházejí ve všech tkáních a v nepřítomnosti zánětu fagocytují pozůstatky vlastních buněk zahynulých apoptózou. Patří nejen mezi efektorové buňky vrozené imunity, ale také mezi APC, čímž napomáhají v aktivaci T lymfocytů. Aby makrofág dokázal patogen zničit musí při setkání s antigenem dojít k přeměně na aktivovaný makrofág disponující i dalšími schopnostmi jako např. produkcí oxidu dusnatého. K přeměně dochází pod vlivem cytokinů, hlavně IFN- $\gamma$  produkovaného Th<sub>1</sub> buňkami. Při zánětlivé reakci makrofágy produkují cytokiny, které dále stimulují T buňky k obraně. Později se cytokiny uplatňují při opětovné obnově poškozené tkáně. Významní jsou v obraně proti bakteriím, virům i parazitům (Franken a kol., 2016).

**Dendritické buňky** (DCs – *dendritic cells*) patří mezi nejúčinnější buňky prezentující antigen, jsou tedy zásadní pro rozpoznání, tvorbu imunitní odpovědi a také určení její velikosti a kvality. Zahrnují velmi heterogenní populaci buněk, které se odlišují svou funkcí, umístěním a původem (Boltjes a van Wijk, 2014). Stojí na rozhraní specifické a nespecifické imunity. Vznikají z prekurzorů v kostní dřeni a vyskytují se ve zralé a nezralé formě. V nezralé formě zastupují funkci imunitního dohledu a kolují mezi krví a lymfou. Vyskytují se ve tkáních, kde jsou v přímém kontaktu s vnějším prostředím jako v kůži (tzv. Langerhansovy buňky), v žaludku, ve střevě, sliznici ústní a nosní dutině. Zralé dendritické buňky postrádají schopnost fagocytovat a nacházejí se v sekundárních lymfatických orgánech (slezina, mandle, lymfatické uzliny, lymfatické tkáně orgánů). DCs našly své využití v léčbě autoimunitních chorob a při alogenních transplantacích. Při autoimunitním onemocnění je snaha o navození tolerance vůči vlastním tkáním, jež byly chybně napadeny imunitním systémem. Podobně je to i u alogenní

transplantace, kdy se jedná o navození tolerance vůči antigenům přenesené tkáně (Boltjes a van Wijk, 2014; Obregon a kol., 2017).

### 2.2.3.3 Imunitní editace nádorů

Imunitní editace nádorů je dynamický proces, při kterém imunitní systém a nádor vzájemně interagují, ovlivňují se a mění své vlastnosti. Probíhá ve třech fázích: eliminace, rovnováha a únik (*elimination, equilibrium, escape*), tzv. „3E“ (Calì a kol., 2017).

Ve fázi **eliminace** dochází za spolupráce specifické i nespecifické imunity k rozpoznání a likvidaci nádorových buněk (Calì a kol., 2017). Vrozenou imunitu zde zastupují NK buňky a získanou T buňky. Jsou aktivovány zánětlivými cytokiny, které produkují stromální buňky a makrofágy nacházející se v blízkosti nádoru. Sekrecí cytokinů dochází k infiltraci dalších imunitních buněk, které produkují další zánětlivé cytokiny jako IL-12 nebo IFN- $\gamma$ . Dochází tak k likvidaci buněk nádorových prostřednictvím NK buněk, které využívají perforin a Fas ligand, tím dochází k aktivaci získané imunity (Kim a kol., 2007). Nádor se mezitím stále vyvíjí a vznikají další mutace měnící jeho charakter. Mohou tak vzniknout nádorové buňky, které imunitní systém už nestihne dostatečně rychle odstranit a vstupují do následující fáze (Calì a kol., 2017).

Ve fázi **rovnováhy** sice nedochází k úplnému odstranění nádorových buněk, ale imunitní systém dokáže růst nádoru stále kontrolovat. Tento stav proto může trvat i mnoho let a nijak klinicky se neprojevuje. Pokud v této fázi dojde k transplantaci takto postiženého orgánu a posléze dochází k podávání imunosupresivních léčiv, může dojít k propuknutí rakoviny u příjemce (Kim a kol., 2007).

Vlivem oslabení imunitního systému nebo dalších mutací nádoru dochází ke třetí fázi, kterou je **únik**. Nádorové buňky se začínají nekontrolovatelně množit, imunitní systém už není schopen kontroly nádoru a objevují se i klinické příznaky rakoviny (Calì a kol., 2017).

### 2.2.3.4 Cytokiny

Jako cytokiny se označuje skupina látek polypeptidové povahy patřící mezi základní regulátory imunitního systému. Tkáňové hormony jsou produkovány především leukocyty



a jinými buňkami a působí prostřednictvím specifických receptorů na různé buňky imunitního systému i mimo něj. Lze rozlišit i tzv. membránové formy cytokinů, které jsou zakotveny v cytoplazmatické membráně pomocí transmembránových proteinů. Patří sem i některé signalizační povrchové proteiny jako např. CD80, CD86 nebo Fas ligand (Hořejší a kol., 2017; Klener a Klener jr., 2013).

Mezi cytokiny se řadí interleukiny (regulují rozličné aspekty vývoje a aktivaci leukocytů), chemokiny (mají chemotaktickou aktivitu), lymfokiny, růstové faktory, interferony (patří mezi významné složky neadaptivních antivirových obranných mechanismů a regulují imunitu), růstové faktory (transformující růstové faktory, faktory stimulující kolonie, hematopoetické růstové faktory) a death ligandy. Jejich biologické účinky jsou obvykle pleiotropní (působí na několik různých typů buněk), často redundantní (jednotlivé cytokiny mohou být nahrazeny jinými) a většinou působí i v kaskádě. Mohou působit synergicky, antagonisticky nebo indukovat výdej dalších cytokinů. Vzniká tak velmi složitá a komplikovaná cytokinová síť signálů. Účinky mohou být také parakrinní, kdy cytokiny působí na buňky v jejich těsné blízkosti či endokrinní, kdy cytokiny působící na vzdálené buňky a šíří se krevním řečištěm (Hořejší a kol., 2017; Klener a Klener jr., 2013).

**IFN- $\alpha$**  (interferon alfa) má antivirové a také významné protinádorové účinky. Ty se vysvětlují antiproliferativním působením, kdy INF- $\alpha$  zasahuje do buněčného cyklu (blokáda tranzinu G1-S), stimuluje buněčné diferenciaci a také inhibuje angiogenezi. Jeho další protinádorové účinky jsou imunomodulační, kdy INF- $\alpha$  zvyšuje aktivitu cytotoxických lymfocytů, makrofágů a NK buněk. Dokonce zvyšuje i expresi antigenů hlavního histokompatibilního komplexu (MHC I a MHC II), které jsou nutné pro zahájení cytotoxické reakce (Klener a kol., 1997). Uplatňuje se při léčbě hematologických malignit, maligního melanomu a také v kombinaci s IL-2 při léčbě karcinomu ledvin. Dříve byl používán za účelem dosažení bezpříznakového období u chronické myeloidní leukémie, nehodgkinských lymfomů, vlasatobuněčné leukémie a mnohočetného myelomu (Klener a Klener jr., 2013).

**IL-2** (interleukin-2) vzniká po setkání s antigenem v T lymfocytech. Parakrinně i endokrinně se podílí na stimulaci proliferace antigeně specifických T lymfocytů a podporuje jejich další sekreci cytokinů (IL-4, INF- $\gamma$ ). Vliv má i na proliferaci NK buněk a B buněk. Patří mezi cytokiny, se kterými jsou v klinické praxi v oblasti nádorové terapie nejhojnější zkušenosti. Rekombinantní forma IL-2 se v kombinaci s interferonem používá

k léčbě adenokarcinomu ledvin. Nadějná se zdá být i kombinace s INF- $\alpha$  v léčbě maligního melanomu (Klener a Klener jr., 2013).

**GM-CSF** (*granulocyte-macrophage colony stimulating factor*) je faktor regulující kolonie makrofágů a granulocytů. Společně s IL-3 se podílí i na diferenciaci eozinofilů. Zvyšuje produkci adhezivních molekul např. LAM (*leukocyte adhesion molecules*), které jsou nutné pro přilnutí neutrofilů k endotelu a jejich průniku do ložiska zánětu (Klener a Klener jr., 2013).

**TNF- $\alpha$**  (*tumor necrosis factor alfa* – faktor nekrotizující tumory) též zvaný kachektin, je mediátorem zánětlivé reakce. Jeho hlavním zdrojem jsou makrofágy, NK buňky, T lymfocyty, B lymfocyty, fibroblasty a buňky různých nádorů. Působí na uvolnění dalších mediátorů (leukotrienů), zvýšení teploty, indukuje expresi některých genů, působí cytotoxicky, lokálně způsobuje nekrózu nádorových buněk a poškozuje nádorové cévní zásobení (Klener a kol., 1997).

### 2.2.3.5 Strategie úniku nádorových buněk imunitnímu systému

Nádorové buňky využívají mnoho způsobů k úniku před imunitním systémem, spousta z nich se ale podobá strategii úniku infekčních mikroorganismů. Každý druh nádorových buněk má svůj odlišný způsob, jak se vyhnout kontaktu s buňkami imunity. Takovéto mechanismy posléze vytvářejí imunosupresivní a tolerogenní prostředí, čímž dochází k aktivní stimulaci mechanismů tolerance nádorových buněk, které nemohou být správně rozpoznány a odstraněny. Mezi tyto mechanismy patří např. velká variabilita, nízká exprese MHC I molekul, produkce faktorů inaktivujících T lymfocyty nebo jiné blokuující faktory a Fas ligand (Hořejší a kol., 2017).

Vysoká **variabilita** značí mutantní vznik nádorových forem, které ztratily svůj antigen (Hořejší a kol., 2017).

**Nízká exprese MHC I molekul**, nebo dokonce jejich ztráta zabraňuje rozpoznání cytotoxickými lymfocyty a nádorová buňka se pro ně stává neviditelnou (Šťastný a Říhová, 2015). Zde by mohly najít své využití NK buňky, ale i proti nim jsou nádorové buňky vyzbrojeny. Začnou exprimovat MHC Ib a NK buňky je poté nerozpoznají a považují je za svoje vlastní buňky (Haynes-Gilmore a kol., 2014).

**Regulační T lymfocyty** (Tregs – *regulatory T-cells*) hrají také důležitou roli v protinádorové imunitní odpovědi. Jedná se o skupinu T buněk, které jsou významné pro udržení periferní tolerance vůči vlastním antigenům, slouží tedy jako prevence autoimunitních chorob. Dále modulují imunitní odpověď při infekci a udržují imunitní systém v homeostáze. Mimo to ale i inhibují ostatní T buňky produkcí cytokinů jako TGF- $\beta$ , IL-10 nebo IL-6, čímž může také dojít k dalšímu podpoření růstu nádoru (Šťastný a Říhová, 2015; Klasbusay, 2015). Produkcí TGF- $\beta$  Tregs dále autokrinně stimulují svůj vlastní vznik a produkce IL-10 navozuje toleranci nádorových buněk. Tregs podporují i angiogenezi nádoru a produkcí VEGF (*vascular endothelial growth factor*) ovlivňují funkci a zrání DCs (Facciabene a kol., 2012).

Mezi další mechanismy obrany nádorových buněk před imunitním systémem patří **Fas ligand**. Fas receptor (Fas) je povrchový protein, který je silně produkován v játrech, thymu, srdci a ledvinách a po vazbě na svůj Fas ligand spouští apoptózu. Fas je exprimován aktivovanými T buňkami a NK buňkami a vyskytuje se i v tzv. imunoprivilegovaných tkáních (varlata, oči) (Šťastný a Říhová, 2015). Na povrchu T buněk se nachází Fas receptor i Fas ligand. Navázáním Fas ligandu na Fas receptor jsou schopni spustit svou vlastní destrukci apoptózou. Toho dokáží ale nádorové buňky zneužít. Pokud nádor nebo jeho endotelie exprimují Fas ligand, interaguje s Fas v T buňkách a dochází k jejich likvidaci (Hořejší a kol., 2017; Motz a kol., 2014).

## 2.3 Adoptivní imunoterapie

Při adoptivní imunoterapii jsou izolovány pacientovi T lymfocyty, které se následně kultivují po několik týdnů ve specializované laboratoři spolu se specifickými nádorovými antigeny a růstovými faktory. Posléze se re-infuzně vpravují již tumor specifické T lymfocyty zpět pacientovi a dochází k imunitnímu útoku i ke vzniku imunologické paměti. Takto připravený lék nelze použít pro léčbu jakéhokoliv pacienta v populaci, ale jen pro daného pacienta, kterému byly odebrány T lymfocyty. K nevýhodám této léčby patří vyšší cena a poměrně komplikovaný proces přípravy (Perica a kol., 2015; Kalos a June, 2013).

## 2.4 Nádorová imunoterapie založená na stimulaci specifické imunity

Imunoterapie založená na stimulaci specifické imunity může využívat **dendritické buňky** (DCs), které se připraví *in vitro* derivatizací monocytů směsí cytokinů (GM-SCF, IL-4) a dále se pak kultivují *ex vivo* společně s nádorovými antigeny. Po následné maturaci se DCs zpět injikují pacientovi a migrují do lymfatických uzlin, kde dochází ke stimulaci T lymfocytů vedoucí k protinádorové imunitní odpovědi (Hořejší a kol., 2017; Radford, 2014).

Další možností je terapie pomocí **monoklonálních protilátek** (mAbs – *monoclonal antibodies*), které jsou produkovány jedním ze subtypů B lymfocytů. Protilátky se skládají ze dvou identických Fab fragmentů vázajících antigen a z jednoho Fc fragmentu. Fab zajišťuje antigenní specifitu pomocí oblastí určujících komplementaritu a Fc fragment se spojuje s Fc receptory a aktivuje efektorové imunitní buňky jako NK buňky, neutrofile, monocyty, DCs a eozinofily (Weiner a kol., 2010). Tato vazba protilátky a nádorového antigenu směřuje vhodné imunitní buňky do místa nádoru a tím dochází k významnému nárůstu fagocytózy i apoptózy nádorových buněk. Tento mechanismus působení monoklonálních protilátek se nazývá buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách (ADCC – *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*). Dále lze využívat i dalších přirozených protinádorových mechanismů protilátek, jako je např. aktivace cytotoxicity závislé na komplementu (CDC – *complement dependent cytotoxicity*), opsonizace vedoucí k ADP (*antibody-dependent phagocytosis*) a indukce adaptivní imunity. Pomocí monoklonálních protilátek lze blokovat i vazbu ligandu na receptor, kdy dochází k narušení příslušné signální dráhy. Často se využívá blokace receptoru pro VEGF nebo VEGFR (*epidermal growth factor receptor*), které zlepšují přežití pacientů s rakovinou prsu nebo tlustého střeva (Kubota a kol., 2009; Klener a Klener jr., 2013).

## 2.5 Nádorová imunoterapie založená na stimulaci nespecifické imunity

Nespecifická imunita zajišťuje první ochranou bariéru proti infekci. Jak už bylo zmíněno výše, aby došlo k rozpoznání a eliminaci cizího patogenu či vlastních pozměněných buněk, musí nejprve dojít k rozpoznání PAMPs prostřednictvím PRRs.

### 2.5.1 Pattern recognition receptors (PRRs)

Výše již bylo řečeno, že PRRs jsou receptory buněk vrozené imunity sloužící k rozpoznání signálů PAMPs či DAMPs. Následkem tohoto rozpoznání může být opsonizace, aktivace komplementu, fagocytóza, spuštění koagulační kaskády, apoptózy nebo zánětu (Janeway a Medzhitov, 2002). PRRs se rozdělují na cytoplazmatické, sekretované a membránové (Elfeil a kol., 2013).

**Cytoplazmatické PRRs** fungují jako druhá vlna obrany při napadení patogeny. Lze je rozdělit na RIG-I-like receptory (RLRs) rozeznávající hlavně virovou DNA a NOD like receptory (NLR), které rozpoznávají bakteriální komponenty (Akira a kol. 2006).

Další skupinou jsou **sekretované PRRs** uplatňující se při aktivaci komplementové kaskády. Jsou tvořeny v játrech a do těla se uvolňují při akutních infekcích (Janeway a Medzhitov, 2002). Patří sem např. C-reaktivní protein (CRP) a mannan vázající lektin (MBL – *mannan-binding lectin*) (Elfeil a kol., 2013).

Poslední **membránové PRRs** zahrnují mannózový receptor a další lektinové receptory typu C (CLRs), scavenger receptory (SR) a toll-like receptory (TLRs) (Gordon, 2002). CLRs rozpoznávají sacharidy na virech, bakteriích a houbách (Takeuchi a Akira, 2010). SR jsou schopné vázat modifikované lipoproteiny (LPL), endogenní proteiny a patogeny (Zani a kol., 2015). TLRs jsou velmi významné při odpovědi na mikrobiální organismy a jsou také vysoce exprimovány imunitními buňkami z myeloidních i lymfoidních linií, které infiltrují nádorové mikroprostředí. V lidských buňkách bylo nalezeno celkem 10 členů TLR rodiny. Jsou označovány jako TLR 1–10 a v membráně se obvykle vyskytují jako dimery (Ferenčík a kol., 2005; Marabelle a kol., 2014).

### 2.5.2 Naše imunoterapie založená na kombinaci TLR agonistů a ligandů fagocytárních receptorů

Tohoto principu vrozené imunity využíváme i v naší terapii pod vedením dr. Ženky. Největšího účinku dosahuje terapie při použití TLR agonistů spolu s ligandy fagocytárních receptorů, které jsou zakotveny přímo na nádorové buňky. TLR agonisté mají signalizační účinek, to vede k infiltraci granulocytů a k zánětlivé reakci. Ligandy fagocytárních receptorů

se postarají o nasměrování fagocytů na nádorové buňky. Dříve se jako hlavní TLR agonista používal LPS (lipopolysacharid), avšak pro jeho toxické účinky na člověka se od něho upustilo. Současně používáme pro člověka bezpečný resiquimod (R-848). Jako ligand stimuluji fagocytózu se používá manan či laminarin (Janotová a kol., 2014; Caisová a kol., 2016; Waldamnová a kol., 2016).

V této práci byl jako hlavní TLR agonista použit resiquimod (R-848). Pro ještě větší zesílení signalizace byly jako další TLR agonisté použity POLY I:C a LTA. Jako ligand stimuluji fagocytózu byl využit manan.

### 2.5.2.1 TLR agonisté použití v této práci

**Resiquimod** (R-848) je látka s nízkou molekulovou hmotností vykazující silnou protivirovou a protinádorovou aktivitu. R-848 je hlavní agonista TLR 7 receptoru u myší a receptorů TLR 7 a TLR 8 u člověka. U člověka jsou tyto dva receptory exprimovány na DCs, makrofázích, NK buňkách a B lymfocytech. Po vazbě R-848 na zmíněné TLR receptory dochází k produkci cytokinů, jako je např. IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , INF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 a IL-12 (Zhou a Sun, 2015; Dockrell a Kinghorn, 2001).

**POLY I:C** (polyinosinická-polycitidylická kyselina) je uměle vyrobená látka podobná dsRNA používaná jako agonista TLR 3. Po navázání dochází k produkci prozánětlivých cytokinů a proteinu 1, který spouští tvorbu INF typu I. Ten působí na aktivitu NK buněk a zrání DCs (Cheng a Xu, 2010).

**LTA** (lipoteichová kyselina) se vyskytuje v buněčné stěně grampozitivních bakterií a je agonistou TLR 2. Po navázání LTA na TLR 2 dochází k produkci prozánětlivých cytokinů, jako je např. TNF- $\alpha$  a IL-1 $\beta$ . Dále se aktivuje komplement a dochází i k uvolňování kyslíkových či dusíkových radikálů z neutrofilů a makrofágů (Schwandner a kol., 1999).

### 2.5.2.2 Manan – ligand stimuluji fagocytózu použitý v této práci

**Manan** je polysacharid složený z několika podjednotek D-manózu, které jsou spojené glykosidickou vazbou. Byl nalezen v buněčné stěně gramnegativních bakterií a kvasinek (Lipke a Ovalle, 1998). Manan je antigenní látka a je rozeznáván vrozenou imunitou jako

PAMPs pomocí dvou receptorů – manan vázající lektin (MBL) a manózový receptor (MR) (Janeway a Medzhitov, 2002).

**Manózový receptor (MR)** se nachází na povrchu makrofágů, DCs a některých endoteliálních buněk. Je schopen rozpoznat cizí mikroorganismy právě podle přítomnosti D-manózy na jejich buněčné stěně (Gordon, 2002).

**Manózu vázající lektin (MBL)** je protein schopný zahajovat aktivaci komplementu lektinovou cestou. To se uskutečňuje rozpoznáním opakujících se sacharidových struktur na povrchu patogenů. Funguje i jako opsonin, tím stimuluje pohlcení patogenů fagocyty (Alam a kol., 2007).

### 2.5.2.3 Kotvení mananu na nádorové buňky

Manan se na nádorové buňky kotví pomocí **BAM** (*biocompatible anchor for membrane* – biokompatibilní kotva pro membránu). Jeden konec molekuly BAM, na který se navazují terapeutické látky, je hydrofilní a nese polyethylenglykol a NHS skupinu. Druhý konec je hydrofobní s řetězcem kyseliny olejové. Ta umožňuje kotvení do membrány buněk (Kato a kol., 2004).

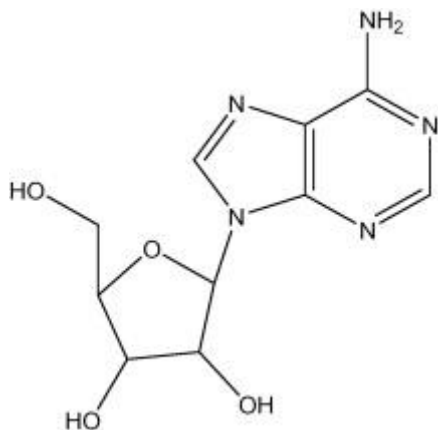
### 2.5.2.4 Anti-CD40

Molekula CD40 patří mezi členy superrodiny TNF. Exprimují ji APC, dendritické buňky, B lymfocyty a monocyty. Byla také ale nalezena na širokém spektru nádorů, např. na melanomu, karcinomu slinivky břišní, plic, ledvin, prostaty nebo vaječníků. Agonistická anti-CD40 protilátka funguje jako agonista receptoru CD40 a obnovuje funkci APC a dalších složek získané imunity (Khalil a Vonderheide, 2007).

Naší stávající terapii se stále snažíme vylepšovat. Jednou z možností byla i snaha o odstranění imunosupresivního adenosinu.

## 2.6 Adenosin

Adenosin je endogenní nukleosid složený z ribózy a adeninu (Sachdeva a Gupta, 2013). Jeho chemická struktura je znázorněna na obrázku 1.



**Obr. 1:** Chemická struktura adenosinu (Sachdeva a Gupta, 2013).

Je to významný neuromodulátor a homeostatický regulátor. V buňkách tvoří důležitou součást několika molekul a podílí se tak na buněčné regulaci. Je součástí molekul ATP (adenosintrifosfát), hlavní sloučeniny energetického metabolismu buňky. Dále se podílí na genové expresi svou přítomností v nukleových kyselinách nebo na intracelulární signalizaci, kde je součástí cAMP (cyklický adenosinmonofosfát). Adenosin sám o sobě zastává i další fyziologické funkce. Prostřednictvím adenosinových receptorů působí, podobně jako ATP, jako extracelulární signální molekula (Sachdeva a Gupta, 2013; Barsotti a Ipata, 2004).

### 2.6.1 Adenosinové receptory

Na povrchu imunitních buněk byly objeveny celkem čtyři podtypy adenosinových receptorů, které jsou asociovány s G-proteinem – adenosin A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> a A<sub>3</sub> receptory (Piirainen a kol., 2011).

A<sub>1</sub> receptor se hojně vyskytuje v různých částech centrální nervové soustavy, méně v tukové tkáni, ve svalech, játrech či zánětlivých buňkách, zejména v neutrofilech (Sachdeva a Gupta, 2013).



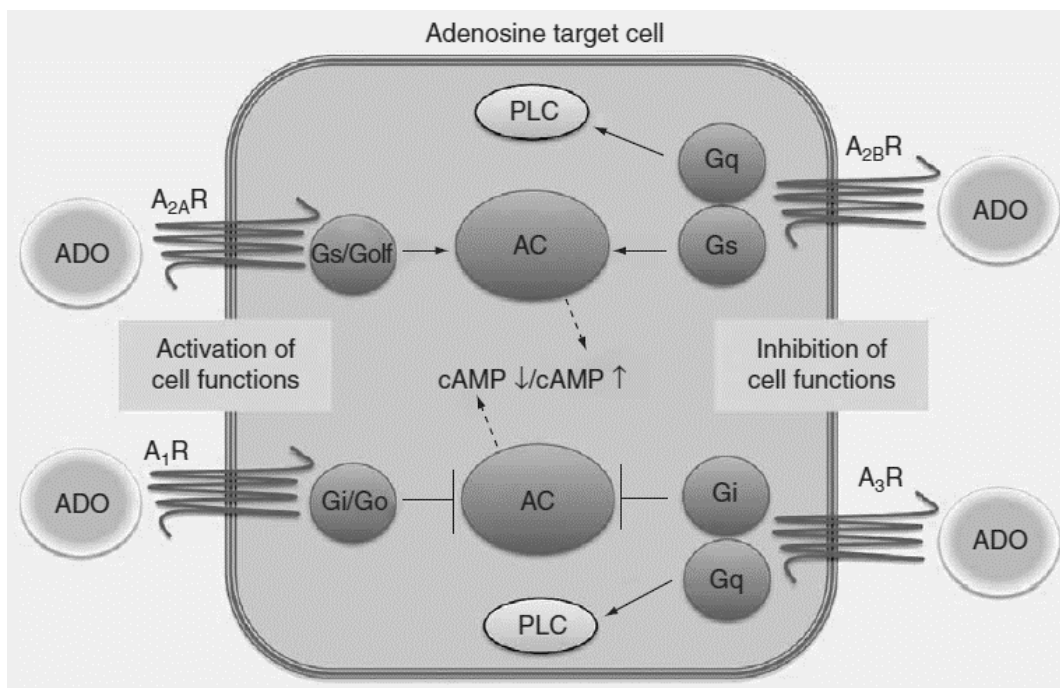
**A<sub>2A</sub>** exprimován v monocytech, žírných buňkách, granulocytech, lymfocytech, DCs, NK buňkách a T buňkách (Fredholm a kol., 2007). Jeho aktivace vede ke zvýšené tvorbě intracelulárního cAMP. Nádorem produkovaný extracelulární adenosin poté může potlačovat aktivitu T lymfocytů právě kvůli zvýšené produkci cAMP vyvolané prostřednictvím **A<sub>2A</sub>** (Gessi a kol., 2011; Ohta, 2006). Zvýšená produkce cAMP zvyšuje i produkci imunosupresivních cytokinů, např. TGF- $\beta$ , IL-10 (Leone a kol., 2015). Tento receptor je zodpovědný i za sníženou imunitní odpověď DCs (Pacheco a kol., 2005).

**A<sub>2B</sub>** receptor je velmi exprimován v gastrointestinálním traktu, močovém měchýři a v žírných buňkách. Ze všech adenosinových receptorů má právě tento receptor nejmenší afinitu k adenosinu, předpokládá se tedy, že k jeho aktivaci dochází až při velmi zvýšené hladině extracelulárního adenosinu. Oproti tomu **A<sub>1</sub>** a **A<sub>2A</sub>** receptory mají největší afinitu k adenosinu (Sachdeva a Gupta, 2013). Aktivovaný receptor **A<sub>2B</sub>** podporuje proliferaci nádorových buněk, šíření a tvorbu metastáz. Reguluje angiogenezi pomocí VEGF. Dále dokáže ovlivnit diferenciaci a funkci dendritických buněk i aktivaci makrofágů (Sun a Huang, 2016).

**A<sub>3</sub>** receptor byl nalezen hlavně v žírných buňkách, eozinofilech, neutrofilech a v ledvinách (Sachdeva a Gupta, 2013).

Množství adenosinu určuje, jaký receptor bude aktivován. Například na neutrofilních granulocytech byly objeveny všechny typy adenosinových receptorů. K aktivaci **A<sub>1</sub>** a **A<sub>3</sub>** dochází při už malé koncentraci adenosinu na počátku imunitní odpovědi, což vede k chemotaxi a fagocytóze neutrofilů. Neustále zvyšující se hladina adenosinu zapříčiní aktivaci **A<sub>2A</sub>** a **A<sub>2B</sub>** receptorů, které spustí produkci zánětlivých mediátorů a neutrofilů uvolní granula (Barletta a kol., 2012).

Na obrázku 2 je znázorněno schéma adenosinových receptorů a jejich signalizace na imunitních buňkách.



**Obr. 2:** Adenosinové receptory a signalizace na imunitních buňkách. AC – adenylátcykláza, ADO – adenosin, PLC – fosfolipáza C, Gq/Gs, Gs/Golf, Gi/Go, Gi/Gq – G proteiny, cAMP – cyklický adenosinmonofosfát, A<sub>2A</sub>R, A<sub>2B</sub>R, A<sub>3</sub>R, A<sub>1</sub>R – adenosinové receptory (Muller-Haegele a kol., 2014).

A<sub>1</sub> a A<sub>3</sub> receptory snižují intracelulární hladiny cAMP. Oproti tomu A<sub>2A</sub> a A<sub>2B</sub> hladiny cAMP zvyšují (Young a kol., 2014). To probíhá inhibicí nebo aktivací enzymu adenylátcyklázy. Signalizace na imunitních buňkách se uskutečňuje přes vápenaté kanály a fosfolipázu C (Muller-Haegele a kol., 2014).

## 2.6.2 Adenosin a jeho tvorba v nádorech

Adenosin vzniká v buňkách při zvýšené spotřebě energie, nejčastěji z rozpadu ATP v buňkách při hypoxii (Gessi a kol., 2011). Dále vzniká i při zánětu či při apoptóze (Whiteside, 2017).

Právě pro nádorové mikroprostředí je charakteristická hypoxie, která nastává při nedostatečném zásobení tkáně kyslíkem a způsobuje neschopnost buňky pokrýt své energetické potřeby (Ohta, 2016).

V této situaci dochází k inhibici oxidativní fosforylace a nádorové buňky se snaží přizpůsobit aktivací glykolýzy, kdy se glukóza metabolizuje na laktát. K tomu dochází aktivací hypoxických genů, které jsou řízeny transkripčním faktorem HIF-1 (*hypoxia inducible factor 1*). Ten následně aktivuje PDK-1 (*pyruvate dehydrogenase kinase 1*) a glykolytické enzymy. Dále vzniká ROS (*reactive oxygen species*) a dochází k poškození mitochondrií, čímž je podporována proliferace buněk. Bylo prokázáno, že rakovinové buňky využívají glykolytického mechanismu i při dostatku kyslíku. Tento jev se nazývá **Warburgův efekt** (Upadhyay a kol., 2013).

HIF-1 se mimo jiné zvyšuje i expresi CD39 a CD73, tím podporuje další tvorbu imunopresivního adenosinu (Synnestvedt a kol., 2002). Zvyšuje i expresi adenosinového receptoru A<sub>2B</sub> a sníženou expresí adenosinových transportérů ENT 1 a ENT 2 (*equilibrative nucleoside transporter*) podporuje hromadění a působení adenosinu (Kong a kol., 2006; Eltzhig a kol., 2005).

Produkcí laktátu dochází k okyselení prostředí a nádorové buňky jsou tak chráněny před atakem imunitního systému. Takový způsob získávání energie ale není energeticky výhodný (Upadhyay a kol., 2013). Glykolýza poskytuje 18násobně nižší produkci ATP než mitochondriální oxidativní fosforylace. Nádorové buňky tuto skutečnost musí kompenzovat zvýšeným počtem glukózových přenašečů, zejména GLUT-1. Jsou proto charakteristické velkým přísunem glukózy (Hanahan a Weinberg, 2011).

### **2.6.2.1 Metabolismus adenosinu**

Adenosin je v extracelulárním prostoru generován při rozpadu ATP (adenosintrifosfát) prostřednictvím ektoenzymů apyrázy (CD39) a 5'-nukleotidázy (CD73).

ATP je nejprve defosforylováno na ADP (adenosindifosfát) a poté na AMP (adenosinmonofosfát) prostřednictvím CD39. Následně defosforylizací AMP za pomoci CD73 vzniká adenosin (Whiteside, 2017).

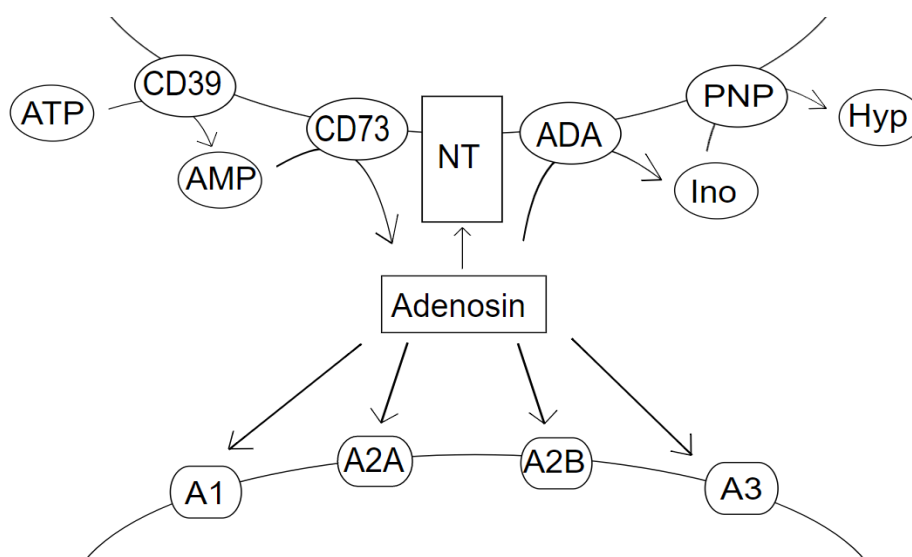
Koncentrace adenosinu je v extracelulárním prostoru kontrolována mechanismy zpětného vychytávání. Tyto specifické nukleosidové transportéry poté uvnitř buňky adenosin fosforylují na AMP pomocí adenosin kinázy nebo adenosin degradují adenosin-deaminázou

(ADA) na inosin (Gessi a kol., 2011). Inosin může být dále odbourán na hypoxantin a dále až na kyselinu močovou (Barsotti a Ipata, 2004).

Hladiny extracelulárního adenosinu jsou za homeostatických podmínek udržovány v rozmezí od 10 do 200 nM, při hypoxickém či stresovém prostředí mohou být zvýšeny na 10–100  $\mu$ M (Sun a Huang, 2016).

Adenosin lze detekovat i intracelulárně. Jeho tvorba probíhá hydrolyzou AMP 5-nukleotidázou nebo hydrolyzou S-adenosyl-homocysteinu (Gessi a kol., 2011).

Metabolismus extracelulárního adenosinu je pro větší přehlednost znázorněn na obrázku 3.



**Obr. 3:** Schéma metabolismu extracelulárního adenosinu. ATP – adenosintrifosfát, CD39 a CD73 – ektonukleotidázy, AMP – adenosinmonofosfát, A1, A2A, A2B, A3 – specifické adenosinové receptory, NT – nukleosidové transportéry, ADA – adenosindeamináza, Ino – inosin, PNP – fosforyláza purinových nukleosidů, Hyp – hypoxantin (zdroj: vlastní).

### 2.6.2.2 CD73 a CD39

Enzymy CD39 a CD73 uplatňující se při rozpadu ATP zde mají velmi důležitou roli. Signalizace extracelulárním ATP vyvolává prozánětlivou imunitní odpověď, oproti tomu signalizace adenosinem je protizánětlivá (Antonioli a kol., 2013). Rovnováha zánětlivého a protizánětlivého prostředí je nezbytná pro udržení zdravé tkáně. V patologických situacích,

jako je rakovina, je tato rovnováha narušena ve prospěch adenosinu a směřuje k ještě větší progresi. CD39 a CD73 jsou tedy klíčové pro rovnováhu ATP–adenosin (Whiteside, 2017).

**CD39** je exprimován ve slezině, thymu, plicích a placentě. V těchto orgánech je také asociován s imunitními buňkami jako jsou NK buňky, DCs, monocyty, makrofágy, neutrofile a Tregs. Zvýšená exprese CD39 byla prokázána u několika druhů pevných nádorů, jako je např. karcinom pankreatu či karcinom kolorekta (Antonioli a kol., 2013; Hu a kol., 2017).

**CD73** bylo nalezeno v mnoha tkáních jako je tlusté střevo, mozek, ledviny, játra, plíce a srdce. Dále také na leukocytech v periferní krvi, slezině, lymfatických uzlinách, thymu a kostní dřeni. K jeho zvýšené expresi dochází v přítomnosti některých cytokinů (TGF- $\beta$ , INF, TNF- $\alpha$ , IL- $\beta$ ) (Antonioli a kol., 2013; Colgan a kol., 2006). Zvýšená hladina CD73 byla nalezena u pacientů s rakovinou prostaty a vaječníků (Leclerc a kol., 2016; Turcotte a kol., 2015). U rakoviny prsu je spojena i s nádorovou vaskularizací, metastazováním a kratší dobou přežití (Zhang, 2010). Zvýšená exprese CD73 způsobuje dokonce i rezistenci vůči antracyklinovým chemoterapeutikům (Loi a kol., 2013).

### **2.6.2.3 ADA a PNP**

ADA je ektoenzym, který se váže na buněčný povrch prostřednictvím CD26, nebo pomocí A<sub>1</sub> a A<sub>2B</sub> adenosinových receptorů. Jeho nedostatek je u postižených jedinců spojen s těžkou imunodeficiencí a s absencí funkčních T a B lymfocytů (Pacheco a kol., 2005). Ve sledu reakcí při metabolismu purinů na enzym ADA navazuje enzym PNP (fosforyláza purinových nukleosidů), který je také spjat s nedostatkem T buněk u postižených jedinců. Deficit ADA je však závažnější (Grunebaum a kol., 2012).

### **2.6.2.4 Inosin**

Inosin vzniká při rozkladu adenosinu pomocí ADA. Podobně jako adenosin, disponuje inosin schopností vázat se na A<sub>2A</sub> receptor na T buňkách a aktivovat zvýšenou produkci cAMP a potlačit funkce imunitního systému. V porovnání s adenosinem, který má krátký poločas rozpadu, je inosin stabilní metabolit. To umožňuje déletrvajícím obsazení A<sub>2A</sub>

receptoru, což vede k produkci a akumulaci cAMP. Inosin tedy navozuje protizánětlivé účinky ještě dlouhou dobu po degradaci adenosinu (Whiteside, 2017).

### **2.6.3 Adenosin a vrozená (nespecifická) imunita**

Jak již výše bylo řečeno, nespecifickou buněčnou složku imunity představují fagocytující buňky (dendritické buňky, neutrofilů, eosinofilů, bazofilů a makrofágů) a přirozeně cytotoxické buňky (NK buňky). Pro nádorové mikroprostředí jsou významné především makrofágů, neutrofilů, dendritické buňky a NK buňky.

#### **2.6.3.1 Vliv adenosinu na fagocyty**

Akumulace extracelulárního adenosinu výrazně snižuje funkci fagocytujících buněk.

V makrofázích adenosin inhibuje fagocytózu, produkci některých cytokinů (TNF- $\alpha$ , IL-12), superoxidů a oxidu dusnatého (Haskó a kol., 1996; Haskó a kol., 2000). Dále zvyšuje produkci IL-6 a IL-10 (Young a kol., 2014).

U neutrofilů snižuje degranulaci, adhezi k buňkám endotelu a produkci superoxidů a oxidu dusnatého (Cronstein a kol., 1990; Firestein a kol., 1995; Bouma a kol., 1997).

Adenosin v nezralých lidských DCs vyvolává zvýšenou chemotaxi, což je způsobeno expresí A<sub>1</sub> receptoru. Zralé DCs tento receptor ztrácí a exprimují receptor A<sub>2A</sub>, jehož aktivace snižuje produkci IL-12 a zvyšuje produkci IL-6, IL-10, TGF- $\beta$  a VEGF (Schnurr, 2003; Novitskiy a kol., 2008).

#### **2.6.3.2 Vliv adenosinu na NK buňky**

Účinek adenosinu na NK buňky není přesně definován. Aktivace A<sub>2A</sub> receptoru adenosinem způsobuje u myši potlačení cytotoxicity i produkce INF- $\gamma$ . Oproti tomu aktivace myšního receptoru A<sub>3</sub> zvyšuje aktivaci NK buněk. Receptory na lidských NK buňkách ale ještě nebyly prozkoumány (Hoskin a kol., 2008).

## **2.6.4 Adenosin a získaná (specifická) imunita**

Výše již bylo uvedeno, že mezi buňky získané imunity patří T lymfocyty, B lymfocyty a plazmatické buňky. V nádorovém prostředí jsou důležité především T a B buňky.

### **2.6.4.1 Vliv adenosinu na T buňky**

Vysoká hladina cAMP vznikající v důsledku aktivace  $A_{2A}$  receptoru na T buňkách způsobuje utlumení funkce těchto buněk v různých stádiích jejich maturace, aktivace, migrace či efektorové funkce (Whiteside, 2017; Zhang, 2010). Dochází ke snížení jejich cytotoxicity i ke snížené produkci cytokinů  $INF-\gamma$ , IL-2 a  $TNF-\alpha$  (Ohta a kol., 2009; Young a kol., 2014).

Bylo také prokázáno, že aktivace  $A_{2A}$  receptoru na Tregs, vede k jejich proliferaci a zvyšuje jejich imunosupresivní schopnosti. Bylo i zjištěno, že lidské Tregs nadměrně exprimují CD39 i CD73 a vznikající adenosin se poté váže na  $A_{2A}$  receptor efektorových T buněk. Tregs jsou typické i nízkou expresí ADA (Mandapathil a kol., 2010). Ring a kolektiv nedávno označily ATP jako molekulu, která přímo aktivuje Tregs (Ring a kol., 2010).

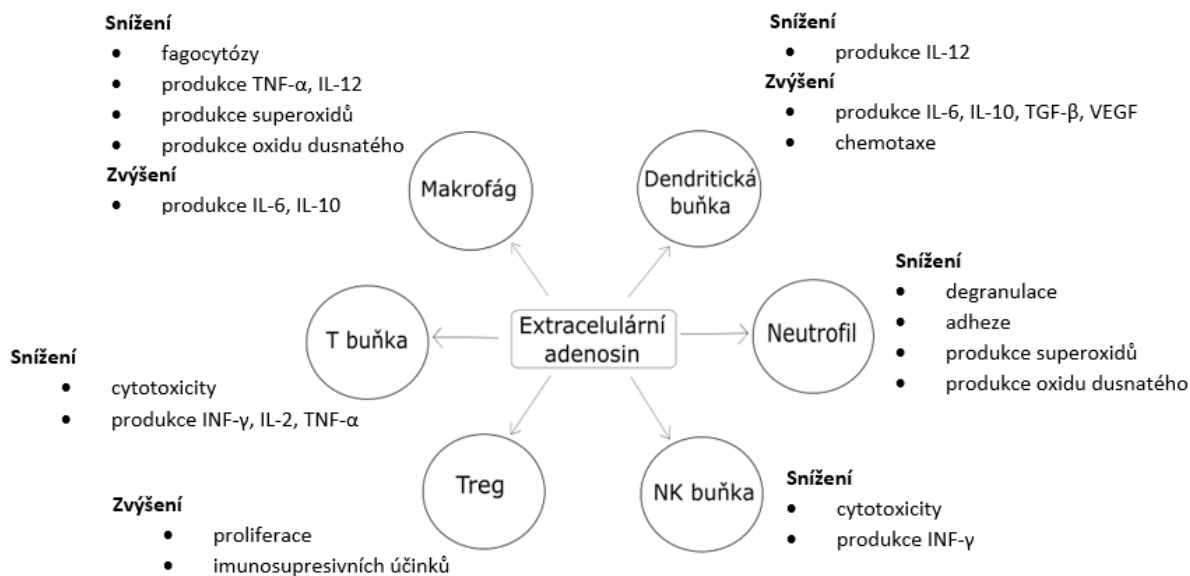
### **2.6.4.2 Vliv adenosinu na B buňky**

U paměťových B buněk bylo nalezeno mnohem více genu pro signalizaci adenosinem, včetně genu pro receptor  $A_{2A}$ , než u naivních B buněk, které jsou prekurzory buněk paměťových. B buňky obecně exprimují ektonukleotidázy CD73 i CD39, ale jeden ze subtypů paměťových buněk exprimuje zvýšené množství CD73. Paměťové B buňky tak mohou regulovat naivní B buňky i další imunitní buňky (Tomayko a kol., 2008).

Malá subpopulace B lymfocytů, tzv. B regulační lymfocyty (Bregs), kontrolují funkci  $CD4^+$  T lymfocytů pomocí produkce IL-10,  $TGF-\beta$ , nebo zvýšenou expanzí Tregs. Bregs stejně jako Tregs exprimují CD73 i CD39 a velmi málo ADA. Právě tyto regulační schopnosti Bregs jsou zvýšené v nádorovém mikroprostředí a mohou potlačovat funkci

T lymfocytů i ostatních imunitních buněk exprimujících adenosinové receptory (Saze a kol., 2013).

Na obrázku 4 je souhrn účinků adenosinu na buňky specifické a nespecifické imunity.



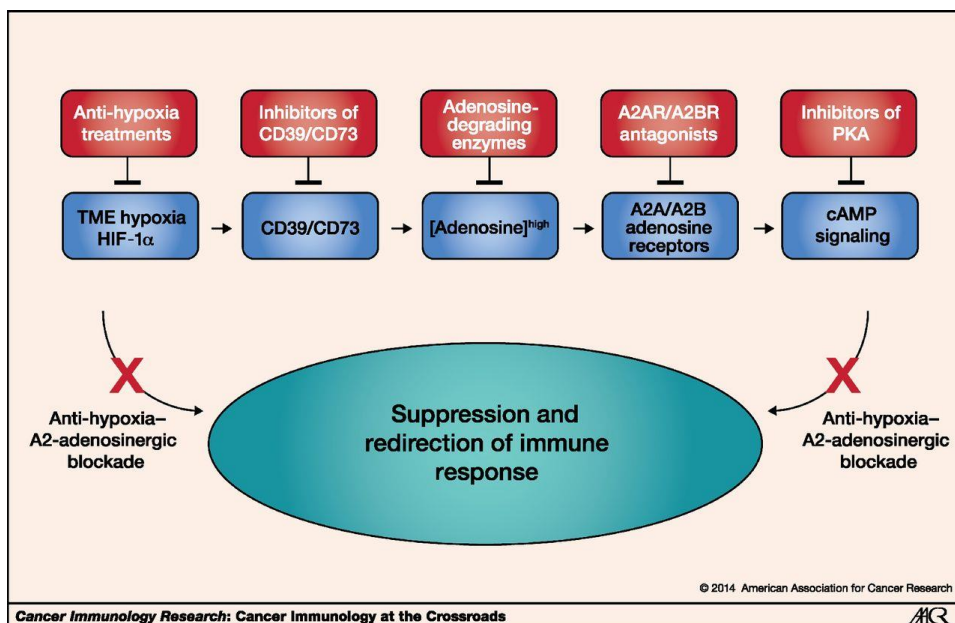
**Obr. 4:** Vliv adenosinu na buňky specifické a nespecifické imunity (zdroj: vlastní).

## 2.6.5 Adenosin a nádorová imunoterapie

Dosavadní strategie zabraňující imunosupresivním účinkům adenosinu lze rozdělit do tří kategorií. První se zaměřuje na zamezení syntézy adenosinu v tkáních, nádorech a imunitních buňkách. Druhá hovoří o zablokování či znemožnění signalizace pomocí adenosinových receptorů na povrchu buněk. Třetí navrhuje snížit účinek adenosinu uvnitř buněk (Whiteside, 2017).

Pro větší přehlednost je uveden obrázek 5 s několika možnostmi likvidace adenosinu a jeho imunosupresivních účinků. Jednotlivé způsoby budou popsány níže.





**Obr.5:** Přehled možností likvidace adenosinu a imunosuprese (Sitkovsky a kol., 2014).

### 2.6.5.1 Zamezení syntézy adenosinu

Zamezení vzniku adenosinu v tkáních, nádorech a imunitních buňkách lze dosáhnout inhibicí CD73 či CD39 (Whiteside, 2017). U myši s melanomem postrádajících CD73 byl značně oslaben růst primárního nádoru i metastáz (Yegutkin a kol., 2011). Podobně byl pozorován menší výskyt jatrních metastáz u melanomu u myši s deficitem CD39 (Sun a kol., 2010).

Molekulární inhibice CD73 pomocí farmakologických látek nebo mAb významně zpomaluje růst nádoru prsu *in vivo* u myši a inhibuje tvorbu plicních metastáz (Stagg a kol., 2010).

MEDI9447 je lidská vysoko afinitní monoklonální protilátka, která je specifická pro ektoenzym CD73. Mění nádorové mikroprostředí tím, že blokuje přeměnu neaktivní formy CD73 na aktivní enzym. Zabraňuje supresi CD4<sup>+</sup> T, zvyšuje se prezentace antigenů pomocí DCs, zlepšuje se schopnost aktivace lymfocytů a zajišťuje i vyloučení prozánětlivých cytokinů (INF- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ). V současnosti prochází klinickými studiemi fáze 1, samostatně i v kombinaci s MEDI4736, pro ověření bezpečnosti, snášenlivosti a klinické aktivity (Hay a kol., 2016).

K inhibici lze využít i nanočástice naplněné siRNA, které při aplikaci *in vitro* snížily expresi CD73 na buňkách rakoviny prsu (Jadidi-Niaragh a kol., 2016). Dále je možné inhibovat i hypoxii, a to potlačením HIF-1 v T a NK buňkách, což má za následek také sníženou expresi CD73 (Sitkovsky a kol., 2014).

Terapeuticky lze cílit pomocí monoklonálních protilátek i na CD39, které obnovily funkci CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> lymfocytů při pokusu *in vitro* na modelu melanomu. Některé studie upřednostňují cílení na CD39 před CD73. Při inhibici CD39 totiž dochází nejen k útlumu nádorových buněk, ale i k tlumení schopností imunosupresivních Tregs a Bregs (Bastid a kol., 2013).

### **2.6.5.2 Blokace adenosinových receptorů**

Adenosinové receptory jsou předmětem mnoha vědeckých výzkumů a zdají se být nadějným terapeutikem u velkého spektra onemocnění. Kromě rakoviny jsou to např. kardiovaskulární poruchy, onemocnění ledvin, Parkinsonova choroba, Alzheimerova choroba, astma nebo zánětlivá a alergická onemocnění (Sachdeva a Gupta, 2013).

Protože některé signály mohou být odlišnými adenosinovými receptory na různých buňkách zpracovány odlišně a mohou tak buď potlačovat nebo zvyšovat protinádorovou imunitní reakci, pro nádorovou terapii jsou současně využívány pouze A<sub>2A</sub> a A<sub>2B</sub> receptory. Blokace se provádí pomocí farmakologických látek nebo pomocí protilátek (Whiteside, 2017).

Myši postrádající receptor A<sub>2A</sub> vykazují úplné odmítnutí nádoru (lymfom, melanom) či významně sníženou rychlost nádorového růstu oproti myším s tímto receptorem. Současně u nich byla prokázána i lepší imunitní odpověď na lymfomové a melanomové vakcíny, zvýšení exprese nádorově specifických CD8<sup>+</sup> T lymfocytů a delší doba přežití (Waickman a kol., 2012; Sitkovsky a kol., 2008). Stejně tak Ryzhov a kolektiv zjistili, že u myší bez receptoru A<sub>2B</sub> byl prokazatelně pomalejší růst Lewisovo karcinomu plic ve srovnání s geneticky divokým typem myší. Nádory deficitních myší měly i nižší hladiny VEGF (Ryzhov a kol., 2008).

Blokace A<sub>2A</sub> adenosinového receptoru pomocí antagonisty CPI-444 a to samostatně nebo v kombinaci s protilátkou anti-PD-L1 dosahovala úspěšnosti léčby 90 % na myším

nádorovém modelu MC38. Při opětovné transplantaci nádorových buněk se u žádné myši nádor neujal, což naznačuje vytvoření imunologické paměti. CPI-444 je v klinickém testování fáze 1/1b pro léčbu pokročilých nádorů (Willingham a kol., 2016).

Dalším velmi zajímavým antagonistou  $A_{2A}$  receptoru je i kofein obsažený především v kávě. Dokáže blokovat receptor v buňkách mozku i v T buňkách. Některé norské studie z roku 1994 a 1997 uváděly nižší výskyt imunogenního maligního melanomu při konzumaci kávy u žen. Nižší protirakovinové účinky u mužů se dávají do souvislosti s produkcí testosteronu (Sitkovsky a kol., 2008). Eini a kolektiv v roce 2015 prokázaly příznivý vliv na melanom u myši, které pily 0,1 % roztok kofeinu ve vodě (Eini a kol., 2015).

### **2.6.5.3 Snížení produkce adenosinu**

Snížení produkce adenosinu je možné dosáhnout pomocí úpravy množství adenylát cyklázy a fosfodiesterázy, to jsou enzymy zodpovědné za tvorbu cAMP (Whiteside, 2017).

Další možností je degradace adenosinu pomocí ADA, protože  $A_{2A}$  receptor je zodpovědný za sníženou imunitní odpověď DCs i T lymfocytů. Následně je nutné zajistit i degradaci inosinu pomocí PNP, aby také nemohl blokovat  $A_{2A}$ . Degradace adenosinu pomocí ADA a následně inosinu pomocí PNP by tedy mohla vést ke zlepšení imunitních funkcí T lymfocytů i DCs. Přesně o tento postup jsme se pokusili obohatit naší dosavadní nádorovou imunoterapii.

### 3 CÍLE PRÁCE

- Studium působení adenosinu v nádorovém mikroprostředí a jeho inhibiční vliv na imunitu, rešerše.
- Studium možností blokace imunosupresivního působení adenosinu (resp. inosinu) při nádorové imunoterapii, rešerše.
- Ověření zlepšení imunitní odpovědi po odstranění adenosinu i inosinu pomocí enzymů ADA a PNP, experimentální práce.
- Ověření vhodnosti ukotvení anti-CD40 na nádorové buňky, experimentální práce.

## 4 MATERIÁL A METODY

### 4.1 Chemikálie

- POLY I:C, *polyinosinic: polycytidylic acid* (Sigma-Aldrich, USA)
- Resiquimod (R-848) (Tocris, UK)
- Manan (Sigma-Aldrich, USA)
- Resiquimod (R-848) (Tocris, Velká Británie)
- BAM<sub>4000</sub>, *Biocompatible anchor for cell membranes*, Mw 4000 (NOF Corporation, Japonsko)
- Anti-Mouse CD40 (BioXCell); FGK4.5/ FGK45 (BioXCell, USA)
- LTA, *Lipoteichoic acid from Bacillus subtilis* (Sigma-Aldrich, USA)
- PBS, *Phosphate buffered saline* (Sigma-Aldrich, USA)
- ADA, *Adenosine deaminase* (Sigma-Aldrich, USA)
- PNP, *Nucleoside phosphorylase* (Sigma-Aldrich, USA)
- EDTA, *ethylenediaminetetraacetic acid* (Sigma-Aldrich, USA)
- D-MEM, *Dulbecco's modified eagle medium* (Biowest, Francie)
- FCS, *Fetal calf serum* (Biowest, Francie)

### 4.2 Laboratorní zvířata

V experimentech byly použity samice inbredních kmenů myší C57BL/6N od společnosti Charles River Laboratories ve věku 8 týdnů a hmotnosti 18–20 g. Chovány byly v prostředí o konstantní teplotě 22°C a relativní vzdušné vlhkosti 65% s nastavenou 12/12 fotoperiodou. Byly uloženy v plastických klecích s dřevěnou podestýlkou, kde měly neomezený přístup ke sterilní vodě a krmným peletám.

### 4.3 Nádorové buněčné linie

V pokusech byly použity buňky pankreatického adenokarcinomu Panc02. Kultivovány byly v D-MEM s 10 % FCS obsahujícím penicilin (100 j/ml), streptomycin (100 µg/ml), amfotericin B (0,25 µg/ml), L-glutamin (2,2 mM) a merkaptoethanol (50 µM) při stálé

teplotě 37 °C, v atmosféře nasycené vodními parami a 5 % podílem CO<sub>2</sub>. Nádorové buňky věnoval prof. Lars Ivo Partecke (Greifswald, Německo).

#### **4.4 Příprava buněk Panc02**

Po slití kultivačního média byly buňky 3x propláchnuty dostatečným množstvím fyziologického roztoku (PBS). Poté bylo přidáno 0,5 ml trypsinizační směsi (0,25 % trypsin, 0,02 % EDTA v PBS) a buňky byly 2 min inkubovány v termostatu při 37 °C, aby došlo k jejich uvolnění. Proces trypsinizace byl ukončen přidáním 5 ml D-MEM s 10 % FCS. Následně byly buňky rozsuspendovány pomocí Pasteurovy pipety, spočítány a centrifugovány (10 min/150 g/4 °C). Supernatant byl slit a buňky byly naředěny na požadovaný objem přidáním D-MEM. Buňky byly spočítány v Bürkerově komůrce a byla stanovena jejich koncentrace v 1 ml média. Ta nakonec byla upravena na požadovanou koncentraci  $4 \times 10^6$  buněk v 1 ml média.

#### **4.5 Transplantace buněk Panc02**

Transplantace nádorových buněk Panc02 byla provedena subkutánně (s.c.) do předem oholeného pravého boku. Injikovány byly buňky v množství  $4 \times 10^5$  buněk Panc02 v 0,1 ml D-MEM bez séra na myš.

#### **4.6 Měření velikosti nádorů**

Nádory byly měřeny každý druhý den pomocí kaliperu. Naměřené hodnoty byly dosazeny do vzorce pro výpočet objemu nádoru.

$$V = \frac{\pi}{6} AB^2$$

Kde A je největší naměřený rozměr nádoru a B je nejmenší naměřený rozměr. Oba rozměry jsou uvedeny v milimetrech.

## **4.7 Příprava terapeutických látek**

### **4.7.1 Syntéza manan-BAM**

Po dobu pěti dnů byl roztok mananu redukován kyanoborohydridem sodným při pH 7,5 a 50° C. Následně byl roztok dialyzován proti PBS, a to pomocí dialyzační trubice MWCO 3500 (Serva–Heidelberg, Německo) přes noc při teplotě 4 °C. Molekula BAM byla na aminoskupinu mananu navázána při pH 7,3 metodou podle Kato (Kato a kol., 2004). K reakci N-hydroxysukcinimidové skupiny (NHS), navázané k BAM a aminoskupiny aminovaného mananu došlo za jednu hodinu při pokojové teplotě. Poté byla přes noc za stálého míchání provedena dialýza v dialyzační tubici MWCO 3500 proti PBS při teplotě 4 °C. Nakonec byl získán 0,2 mM roztok manan-BAM 4000 v PBS.

### **4.7.2 Příprava ADA-BAM, PNP-BAM, anti-CD40-BAM**

Tyto látky byly získány reakcí ADA, PNP, resp. anti-CD40 s ekvimolárním množstvím BAM 4000 v prostředí PBS pH 7,4 po dobu jedné hodiny při pokojové teplotě.

### **4.7.3 Příprava imunoterapeutik**

K 0,2 mM manan-BAM v PBS byl přidán resiquimod na výslednou koncentraci 0,5 mg/ml roztoku. Jelikož je resiquimod ve vodě špatně rozpustný, byl z něj nejprve připraven pomocí HCl hydrochlorid. Dále bylo přidáno POLY I:C a LTA, obojí na výslednou koncentraci 0,5 mg/ml roztoku. Roztoky použité v pokusech byly připraveny buď přidáním anti-CD40 protilátky (0,4 mg/ml roztoku), ADA-BAM (20U/ml), PNP-BAM (5U/ml), nebo anti-CD40-BAM (0,4 mg/ml)

## **4.8 Statistické vyhodnocení dat**

Získaná data byla zpracována v programech MS Excel 2016 a Statistica 12.

## 5 EXPERIMENTY

### 5.1 Terapie pankreatického adenokarcinomu pomocí enzymů ADA a PNP

Pokus byl proveden na 24 myších, které byly rozděleny do 4 skupin po 6 myších podle druhu použitého terapeutika (Tab.I). Myším bylo transplantováno  $4 \times 10^5$  buněk Panc02. Léčba byla zahájena šestnáctý den po transplantaci („den 0“) a byla podávána dvanáctkrát ve čtyřech pulzech, tzn. ve dnech 0, 1, 2, 8, 9, 10, 16, 17, 18, 24, 24, 26. Terapeutická látka byla podávána intratumorálně v množství 50  $\mu$ l. Měření probíhalo každý druhý den až do třicátého dne a vždy před aplikací terapeutika. Od 30. dne bylo sledováno úmrtí myší další tři měsíce.

**Tab. I:** Rozdělení myší do skupin podle aplikované látky v pokusu 1.

Skupina	Terapeutikum
A	R-848 + POLY I:C + LTA + anti-CD40 v 0,2 mM manan-BAM v PBS
B	R-848 + POLY I:C + LTA + anti-CD40 + ADA-BAM + PNP-BAM v 0,2 mM manan-BAM v PBS
C	anti-CD40 + ADA-BAM + PNP-BAM v PBS
D	PBS



## 5.2 Terapie pankreatického adenokarcinomu pomocí kotvení anti-CD40

Pokus byl proveden na 18 myších, které byly rozděleny do 3 skupin po 6 myších podle druhu použitého terapeutika (Tab.II). Myším bylo transplantováno  $4 \times 10^5$  buněk Panc02. Léčba byla zahájena šestnáctý den po transplantaci („den 0“) a byla podávána dvanáctkrát ve čtyřech pulzech, tzn. ve dnech 0, 1, 2, 8, 9, 10, 16, 17, 18, 24, 24, 26. Terapeutická látka byla podávána intratumorálně v množství 50  $\mu$ l. Měření probíhalo každý druhý den až do třicátého dne a vždy před aplikací terapeutické látky. Od 30. dne bylo sledováno úmrtí myší další tři měsíce.

**Tab. II:** Rozdělení myší do skupin podle aplikované látky v pokusu 2.

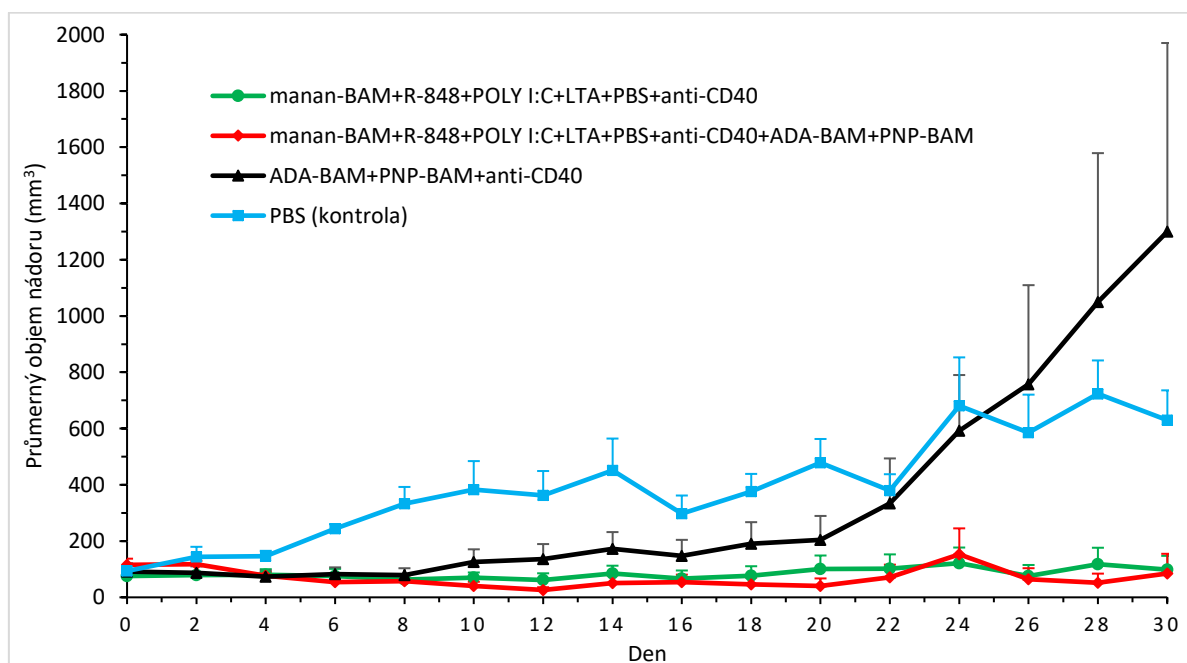
Skupina	Terapeutikum
A	R-848 + POLY I:C + LTA + anti-CD40 v 0,2 mM manan-BAM v PBS
B	R-848 + POLY I:C + LTA + anti-CD40-BAM v 0,2 mM manan-BAM v PBS
C	PBS

## 6 VÝSLEDKY

### 6.1 Terapie pankreatického adenokarcinomu pomocí enzymů ADA a PNP

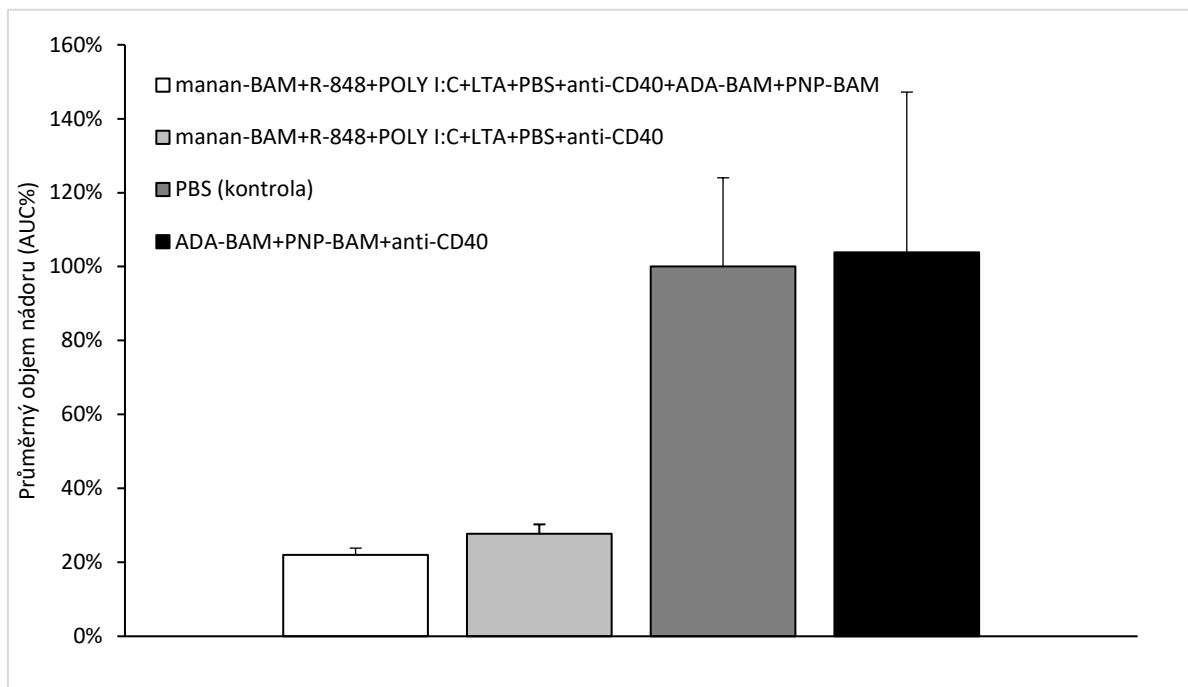
Cílem tohoto pokusu bylo odstranit z nádorů adenosin i inosin pomocí enzymů a pokusit se tak zlepšit protinádorovou imunitní odpověď.

Obr.6 znázorňuje růstovou křivku nádorů jednotlivých skupin a jejich hodnoty SEM (*standard error of the mean*). Skupiny s manan-BAM + R-848 + POLY I:C + LTA + PBS + anti-CD40 a manan-BAM + R-848 + POLY I:C + LTA + PBS + anti-CD40 + ADA-BAM + PNP-BAM prokázaly mnohem menší nárůst nádoru oproti kontrolní skupině. Tyto dvě skupiny si byly růstem nádorů ale velmi podobné, při použití enzymů tedy nebyl prokázán zásadní vliv na terapii. Skupina dostávající pouze samotné enzymy ADA-BAM, PNP-BAM a anti-CD40 do dvacátého dne také vykazovala pomalejší růst, ale nakonec byly nádory ještě větší než u kontrolní skupiny, které byl podáván pouze fyziologický roztok (PBS).



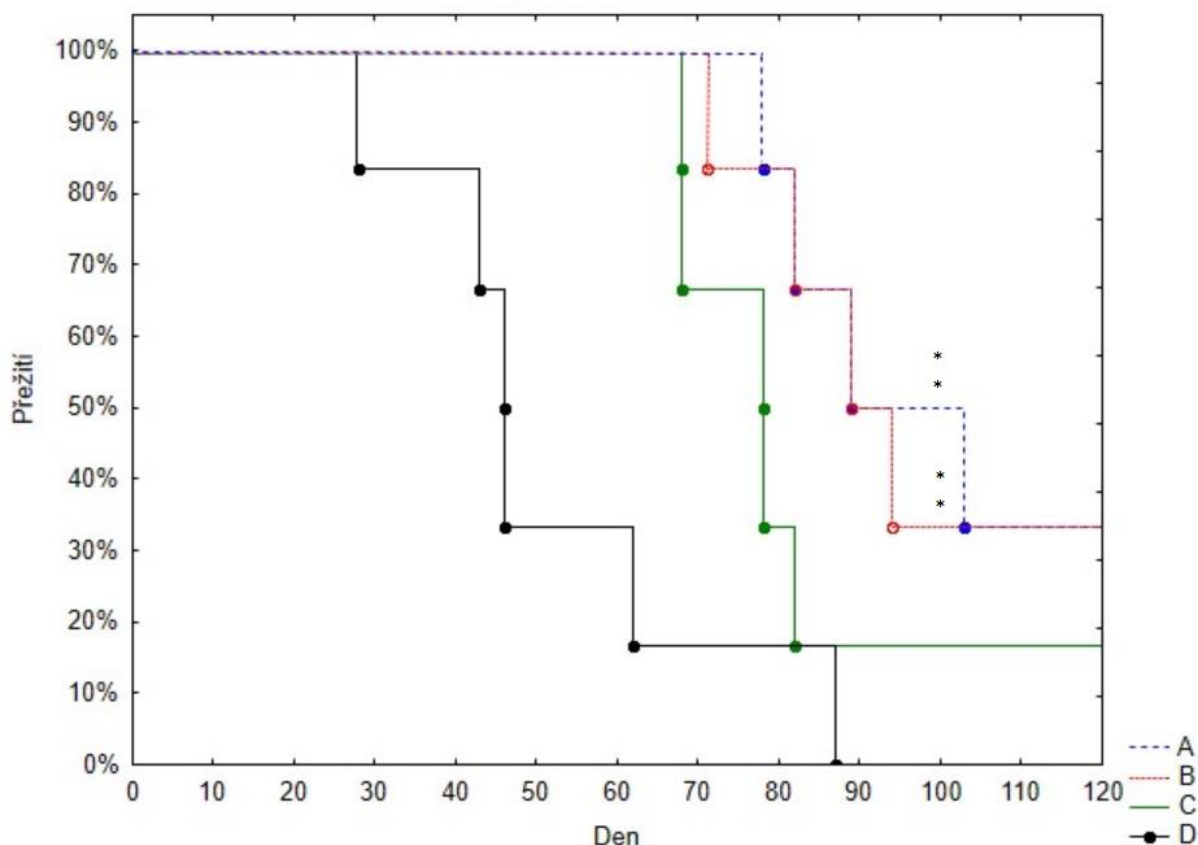
**Obr. 6:** Vliv terapie na růst nádorů za použití enzymů ADA a PNP.

Obr.7 uvádí průměrný objem nádoru (AUC %). Statistická významnost byla hodnocena pomocí testu one way ANOVA, ale nebyla prokázána.



**Obr. 7:** Průměrný objem nádorů AUC % při použití enzymů ADA a PNP.

Po ukončení terapie byla sledována doba přežití myši až do 120 dne. Zjištěné hodnoty byly vyneseny do obr. 8. Ze skupiny C se hranice 120 dnů dožila pouze jedna myš, rozdíl ve srovnání s kontrolní skupinou D není statisticky významný. Terapeutika podávána skupinám A a B vykazaly významnější vliv, jelikož 120. dne se dožily z každé skupiny 2 myši. Statisticky byla hodnocena významnost (hodnota p) pomocí Log-Rank testu vůči kontrolní skupině D.



**Obr. 8:** Vliv léčby na přežití při použití enzymů ADA a PNP.

**A** – manan-BAM + R-848 + POLY I:C + LTA + PBS + anti-CD40;

**B** – manan-BAM + R-848 + POLY I:C + LTA + PBS + anti-CD40 + ADA-BAM + PNP-BAM;

**C** – ADA-BAM + PNP-BAM + anti-CD40;

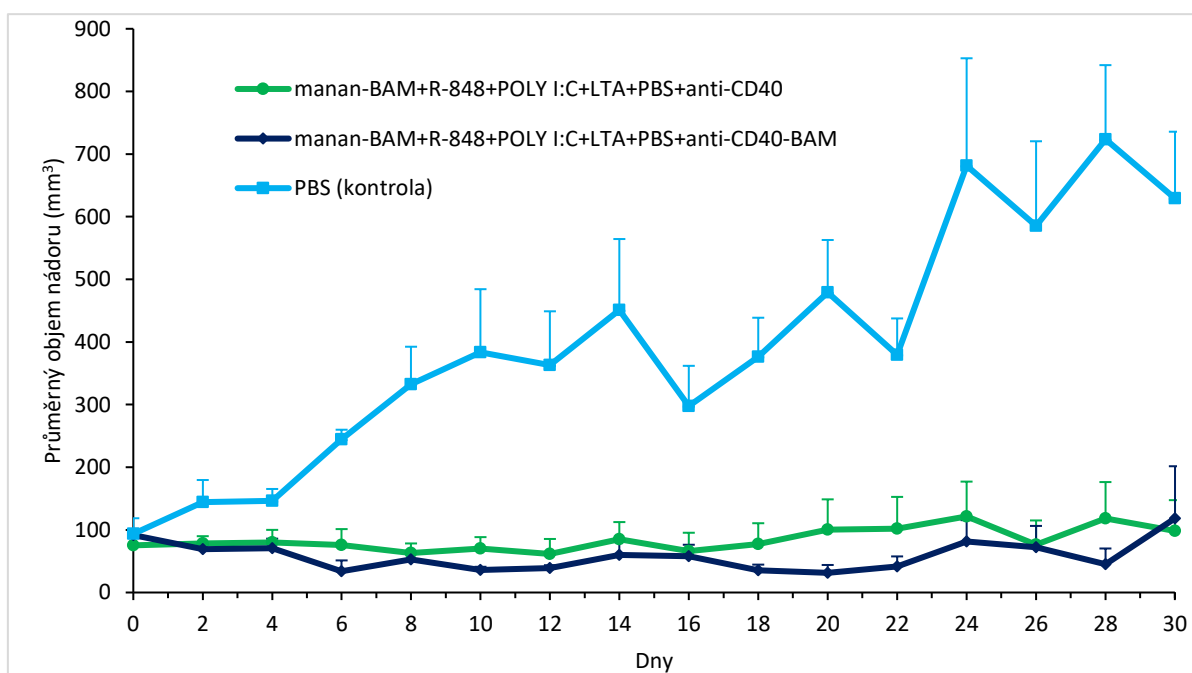
**D** – PBS.

\* \*  $p \leq 0,01$  vzhledem ke skupině D

## 6.2 Terapie pankreatického adenokarcinomu pomocí kotvení anti-CD40

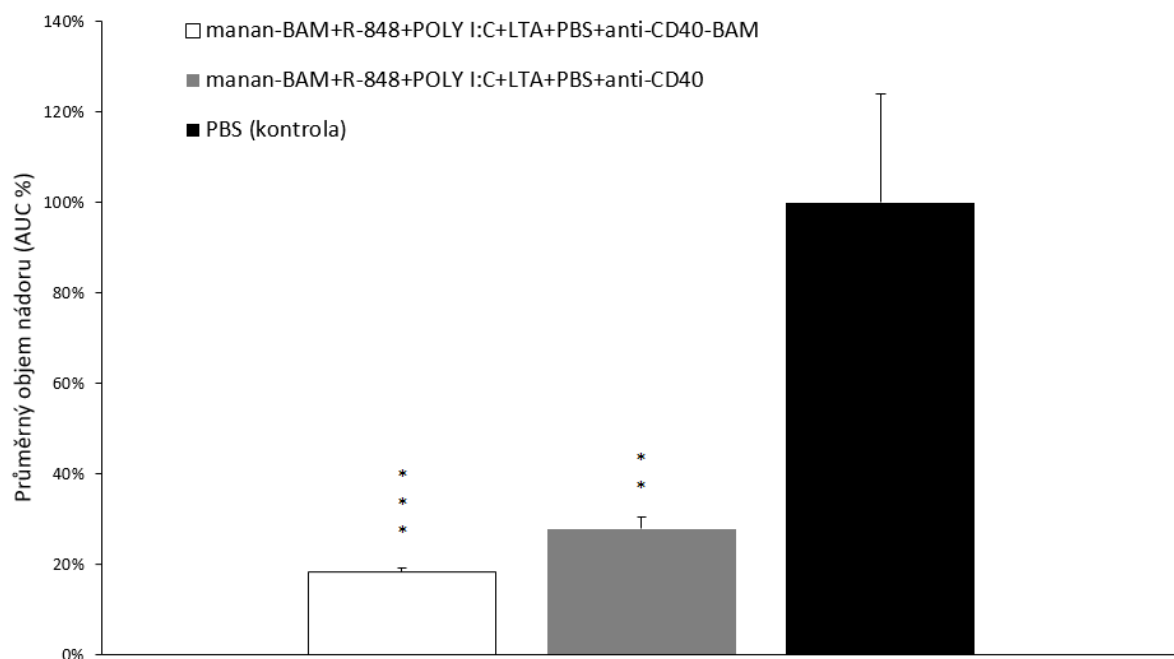
Cílem tohoto pokusu bylo zjistit, zda má smysl anti-CD40 kotvit či nikoli.

Obr. 9 znázorňuje růstovou křivku nádorů jednotlivých skupin a jejich hodnoty SEM. Skupiny léčené manan-BAM + R-848 + POLY I:C + LTA + PBS + anti-CD40 a manan-BAM + R-848 + POLY I:C + LTA + PBS + anti-CD40-BAM ukázaly výrazně pomalejší nádorový růst oproti kontrolní skupině, která dostávala pouze PBS. Skupina dostávající manan-BAM + R-848 + POLY I:C + LTA + PBS + anti-CD40-BAM měla od 6. dne do 28. dne nádory nepatrně menší, ale 30. den byl objem nádorů srovnatelný.



**Obr. 9:** Vliv terapie na růst nádorů při použití anti-CD40 a anti-CD40-BAM.

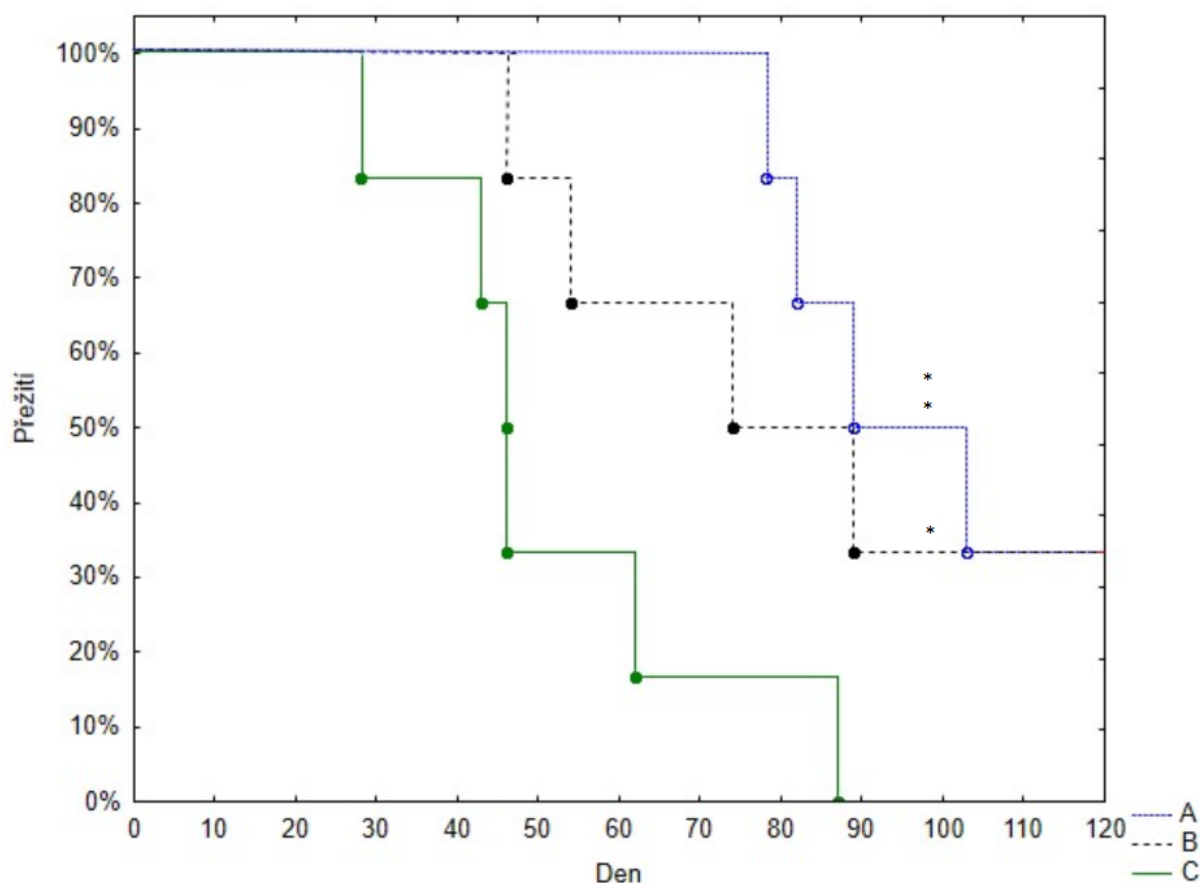
Obr. 10 uvádí průměrný objem nádoru (AUC %). Statistická významnost byla hodnocena pomocí testu one way ANOVA.



**Obr. 10:** Průměrný objem nádorů AUC % při použití anti-CD40 či anti-CD40-BAM.

\*\*  $p \leq 0,01$  vzhledem ke skupině léčené pomocí PBS; \*\*\*  $p \leq 0,005$  vzhledem ke skupině léčené pomocí PBS.

Po ukončení terapie byla sledována doba přežití myši až do 120 dne. Zjištěné hodnoty byly vyneseny do obr. 11. U skupin A i B je vidět mnohem větší vliv na přežití i prodloužení života oproti kontrolní skupině C. Z obou skupin se 120. dne dožily dvě myši. U skupiny A došlo ještě k výraznějšímu prodloužení života, než u skupiny B. Statisticky byla hodnocena významnost (hodnota p) pomocí Log-Rank testu vůči kontrolní skupině C.



**Obr. 11:** Vliv léčby na přežití při použití anti-CD40 či anti-CD40-BAM.

**A** – manan-BAM + R-848 + POLY I:C + LTA + PBS + anti-CD40;

**B** – manan-BAM + R-848 + POLY I:C + LTA + PBS + anti-CD40-BAM;

**C** – PBS.

\*  $p \leq 0,05$  vztaženo ke skupině C; \*\*  $p \leq 0,01$  vztaženo ke skupině C.

## 7 DISKUSE

Naše terapie skládající se z manan-BAM, R-848, POLY I:C a LTA je velmi úspěšná v terapii melanomu (Masáková, 2016). Pankreatický adenokarcinom je v několika ohledech zákeřnější než melanom a jeho léčba je proto i náročnější. Je to dáno několika faktory, jako např. přítomností Tregs, MDSCs (*myeloid derivated suppressor cells* – myeloidní supresorové buňky), s tumorem asociovaných makrofágů (TAM – *tumor-associated macrophages*) či vysokou denzitou nádorové tkáně (Kunk a kol., 2016; Jandová, 2017). Z tohoto důvodu bylo prováděno několik pokusů o vylepšení terapie. Jako vhodná cesta se ukázalo přidání anti-CD40 ke směsi manan-BAM, R-848, POLY I:C a LTA, které vedlo k úplnému vyléčení 80-83 % myší. Těchto výsledků bylo dosaženo u relativně menších nádorů, které při zahájení terapie (12. den od aplikace myších buněk pankreatického adenokarcinomu Panc02) dosahovaly objemu 30-40 mm<sup>3</sup> (Ženka, ústní sdělení). V experimentální části této bakalářské práce byla terapie zahájena až 16. den po aplikaci myších buněk adenopanreatického karcinomu Panc02, kdy byly nádory mnohem větší a k úplnému vyléčení došlo u 2 ze 6 myší (33 %).

Za účelem dalšího vylepšení byly použity enzymy ADA a PNP vázané na kotvu BAM, které likvidují adenosin a inosin, což jsou imunosupresivní látky. Přidání ADA-BAM a PNP-BAM ke směsi manan-BAM, R-848, POLY I:C a LTA prokázalo v pokusu Karolíny Kvardové částečné zlepšení imunoterapie (Ženka, ústní sdělení). V prvním experimentu provedeném v této práci byla enzymová směs ADA-BAM + PNP-BAM přidávána k terapeutiku manan-BAM, R-848, POLY I:C a LTA obohaceném o anti-CD40. Nicméně tato snaha o vylepšení terapie na základě odbourávání adenosinu a inosinu nevedla k cíli. Ani na úrovni redukce nádorového růstu, ani na úrovni nádorového přežití nebylo zaznamenáno, že by přídavek enzymů terapii vylepšil. Naopak po uplynutí 120. dne byl u jedné z vyléčených myší zaznamenán nový nádor. Působení adenosinu a inosinu, které vznikají v nádorech při částečné hypoxii a nekrotizaci je jedním z mnoha imunosupresivních mechanismů a ukazuje se, že v tomto případě ovlivnění tohoto systému nebylo rozhodující. Můžeme uvažovat o tom, že vlastní terapie (manan-BAM, R-848, POLY I:C, LTA, anti-CD40) předcházela vzniku adenosinu i inosinu. Anti-CD40 vede k aktivaci makrofágů, to vede ke snižování denzity nádorů (Vonderheide a Glennie, 2013). Právě vlivem snížení



denzity se mohly vytvořit příznivější podmínky pro vstup kyslíku a adenosin se tedy nemusel tvořit.

Zajímavé je, že při samostatném použití enzymů ADA-BAM a PNP-BAM s anti-CD40 došlo u jedné z myší k úplnému vyléčení v několika málo dnech od zahájení terapie, přestože tato skupina po uplynutí 22. dne terapie měla nádory větší než kontrolní skupina. Tuto výjimku je obtížné vysvětlit. Zřejmě v tomto případě hrál adenosin větší roli, což bylo způsobené anatomickou strukturou nádoru v nepřítomnosti kyslíku.

Anti-CD40 působí jak na vrozenou, tak i na získanou složku imunity. Účinek na vrozenou imunitu se týká podpory fagocytů, zejména makrofágů. Na získanou složku imunity působí anti-CD40 tak, že zastává funkci Th lymfocytů. V pankreatickém adenokarcinomu se Th lymfocyty nenacházejí kvůli velké hustotě buněk, proto se používá anti-CD40, které napodobuje jejich roli na úrovni vrozené i získané imunity. Anti-CD40 tedy nahrazuje funkci Th lymfocytů a provádí tzv. licencing DCs pro crossprezentaci antigenu naivním CD<sup>8+</sup> buňkám, které dávají vznik CTL (Vonderheide a Glennie, 2013; Gottschalk a kol., 2015). Druhý pokus se zabýval možností kotvit anti-CD40 pomocí BAM, který umožňuje reverzibilní vazbu do membrán po dobu 1–2 hodin (Kato, 2004). Tímto způsobem navázání a následného uvolnění a následného opakování mělo hypoteticky dojít k delšímu působení anti-CD40 v nádorové tkáni. Ukázalo se ale, že mezi účinkem anti-CD40 a anti-CD40-BAM není rozdíl.

Jedním z cílů bylo i provedení rešerše popisující účinky adenosinu na imunitní systém a možnosti jeho likvidace. V boji proti adenosinu se využívá mnoho strategií, nejčastěji je to blokáce jeho receptorů a inhibice enzymu CD73 nebo CD39. Všechny tyto cesty vedou k odstranění imunosupresivních účinků adenosinu a přispívají k obnovení přirozených schopností imunitního systému. Cílení jak na samotný adenosin, tak i kombinace s jiným vhodným terapeutikem je velmi nadějným přístupem v léčbě mnoha druhů rakoviny.

Rozpadem adenosinu vzniká inosin, kterému není věnována dostatečná pozornost. I když jsou účinky adenosinu blokovány, inosin se může vázat na adenosinový receptor A<sub>2A</sub> na T buňkách, a také potlačovat funkce imunitního systému. Na základě provedené rešerše vznikla hypotéza, že odstranění adenosinu (pomocí enzymu ADA) a následně i inosinu (pomocí enzymu PNP) by mohlo naši imunoterapii podpořit. Ukázalo se, že použití enzymů k odstranění adenosinu a inosinu je jedna z cest, která za určitých okolností funguje.

Naznačuje to pokus Karolíny Kvardové, bez použití anti-CD40 i první pokus popsany v této práci, kdy při použití samotných kotvených enzymů ADA a PNP došlo k rychlému vyléčení jedné z myší. Domníváme se, že odstraňování adenosinu a inosinu by mohlo mít smysl tam, kde je jejich produkce vysoká a je vysoký podíl těchto látek na celkovém imunosupresivním působení nádorů a jejich schopnosti se bránit vůči imunitnímu ataku. Můžeme uvažovat o velkých vnitřních nádorech, ale jen další experimenty mohou potvrdit či vyvrátit tuto domněnku.

## 8 ZÁVĚR

- Byla provedena rešerše popisující imunosupresivní účinky adenosinu a inosinu na buňky imunitního systému spolu s návrhy jejich likvidace.
- Přidání směsi enzymů ADA-BAM + PNP-BAM k terapeutické směsi R-848, POLY I:C, LTA, manan-BAM + anti-CD40 při léčbě adenopankreatického karcinomu Panc02 nevedlo ke zlepšení terapeutického efektu.
- Kotvení anti-CD40 pomocí BAM neprokázalo lepší efekt terapie ve srovnání s volnou protilátkou.
- Jsou diskutovány otázky významu a použitelnosti enzymatického odstraňování adenosinu a inosinu v nádorové terapii.

## 9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AC – adenylátcykláza (*adenylate cyclase*)

ADA – adenosindeamináza

ADCC – buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách (*antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*)

ADO – adenosin

ADP – adenosindifosfát

AFP –  $\alpha$ -fetoprotein

AMP – adenosinmonofosfát

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

ATP – adenosintrifosfát

BAM – biokompatibilní kotva pro membránu (*biocompatible anchor for membrane*)

cAMP – cyklický adenosinmonofosfát

CEA – karcinoembryonální antigen (*carcinoembryonic antigen*)

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

CPR – C-reaktivní protein

DAMP – molekuly uvolněné z poškozených buněk (*damage associated molecular patterns*)

DCs – dendritické buňky (*dendritic cells*)

D-MEM – Dulbecco's modified eagle medium

DMSO – dimethyl sulfoxid (*dimethylsulfoxide*)

DNA – deoxyribonukleová kyselina (*deoxyribonucleic acid*)

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

EDTA – kyselina ethylendiamintetraoctová (*ethylenediaminetetraacetic acid*)

ENT – adenosinový transportér (*equilibrative nucleoside transporter*)

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

GLUT – glukózový přenašeč

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

HIF-1 – transkripční faktor indukovaný hypoxií (*hypoxia inducible factor 1*)

HLA – hlavní lidský histokompatibilní antigen (*human leukocyte antigen*)

IFN – interferon

IL – interleukin

LAM – adhezní molekuly leukocytů (*leukocyte adhesion molecules*)

LGL – velké granulární lymfocyty (*large granular lymphocytes*)

LPS – lipopolysacharid

LTA – lipoteichová kyselina (*lipoteichoic acid*)

MAb – monoklonální protilátka (*monoclonal antibody*)

MBL – lektin vázající manózu (*mannan-binding lectin*)

MDSC – myeloidní supresorové buňka (*myeloid derivated suppressor cell*)

MHC – hlavní histokompatibilní komplex (*major histocompatibility complex*)

MR – manózový receptor (*mannose receptor*)

NK – přirozený zabijec (*natural killer*)

NLRs – NOD-like receptory (NOD-like receptors)

PAMPs – struktury charakteristické pro patogenní mikroorganismy (*pathogen-associated molecular patterns*)

PBS – sterilní pufovaný fyziologický roztok (*phosphate buffered saline*)

PDK-1 – (*pyruvate dehydrogenase kinase 1*)

PLC – fosfolipáza C (*phospholipase C*)

PNP – fosforyláza purinových nukleosidů

POLY I:C – polyinosinická-polycitidylická kyselina (*polyinosinic: polycytidylic acid*)

PRRs – receptory rozpoznávající molekulové vzory (*pattern recognition receptors*)

R-848 – Resiquimod

RLRs – RIG-I-like receptory (*RIG-I-like receptors*)

ROS – *reactive oxygen species*

SEM – standardní chyba průměru (*standard error of the mean*)

s.c. – subkutánní aplikace injekce (*subcutaneous*)

siRNA – *small interfering ribonucleic acid*

SRs – scavengerové receptory (*scavenger receptors*)

TAA – antigeny asociované s nádory (*tumor associated antigens*)

TAM – s tumorem asociované makrofágy (*tumor-associated macrophages*)

Tc – cytotoxický T lymfocyt (*cytotoxic T-cell*)

TCR – receptor T lymfocytů pro antigen (*T-cell receptor*)

Th – pomocný T lymfocyt (*helper T-cell*)

TLRs – receptory skupiny toll (*toll-like receptors*)

TNF – tumor nekrotizující faktor (*tumor necrosis factor*)

Treg – regulační T lymfocyt (*regulatory T-cell*)

TSA – antigeny specifické pro nádory (*tumor specific antigens*)

VEGF – vaskulární endoteliální růstový faktor (*vascular endothelial growth factor*)

VEGFR – (*epidermal growth factor receptor*)

## 10 CITOVANÁ LITERATURA

Adam, Z., & Vorlíček, J. (2004). *Obecná onkologie*. Brno: Masarykova univerzita.

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

Alam, U. (2007). Immunity: The Immune Response to Infectious and Inflammatory Disease. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 80(3), 137.

Ames, E., & Murphy, W. J. (2014). Advantages and clinical applications of natural killer cells in cancer immunotherapy. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 63(1), 21-28.

Anand, P., Kunnumakara, A. B., Sundaram, C., 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,

Antonioli, L., Pacher, P., Vizi, E. S., & Haskó, G. (2013). CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends in Molecular Medicine*, 19(6), 355-367.

Barletta, K. E., Ley, K., & Mehrad, B. (2012). Regulation of Neutrophil Function by Adenosine. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 32(4), 856-864.

Barsotti, C., & Ipata, P. L. (2004). Metabolic regulation of ATP breakdown and of adenosine production in rat brain extracts. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36(11), 2214-2225.

Bastid, J., Cottalorda-Regairaz, A., Alberici, G., Bonnefoy, N., Eliaou, J. -F., & Bensussan, A. (2013). ENTPD1/CD39 is a promising therapeutic target in oncology. *Oncogene*, 32(14), 1743-1751.

Boltjes, A., & van Wijk, F. (2014). Human dendritic cell functional specialization in steady-state and inflammation. *Frontiers in Immunology*, 5, 131.

Bouma, M. G., Jeunhomme, T. M., Boyle, D. L., Dentener, M. A., Voitenok, N. N., van den Wildenberg, F. A., & Buurman, W. A. (1997). Adenosine inhibits neutrophil degranulation

in activated human whole blood: involvement of adenosine A2 and A3 receptors. *Journal of Immunology*, 158(11), 5400–8.

Caisová, V., Vieru, A., Kumžáková, Z., Glaserová, S., Husníková, H., Vácová, N., ... Ženka, J. (2016). Innate immunity based cancer immunotherapy: B16-F10 murine melanoma model. *BMC Cancer*, 16(1).

Calì, B., Molon, B., & Viola, A. (2017). Tuning cancer fate: the unremitting role of host immunity. *Open Biology*, 7(4), 170006.

Colgan, S. P., Eltzschig, H. K., Eckle, T., & Thompson, L. F. (2006). Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). *Purinergic Signalling*, 2(2), 351–360.

Cronstein, B. N., Daguma, L., Nichols, D., Hutchison, A. J., & Williams, M. (1990). The adenosine/neutrophil paradox resolved: human neutrophils possess both A1 and A2 receptors that promote chemotaxis and inhibit O<sub>2</sub> generation, respectively. *Journal Of Clinical Investigation*, 85(4), 1150-1157.

Delves, P. J., Martin, S. J., Burton, D. R., & Roitt, I. M. (2012). *Roitt's Essential Immunology*. Chichester: John Wiley & Sons.

Dockrell, D. H., & Kinghorn, G. R. (2001). Imiquimod and resiquimod as novel immunomodulators. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48(6), 751-755.

Ducreux, M., Cuhna, A. S., Caramella, C., Hollebecque, A., Burtin, P., Goéré, D., et al. (2015). Cancer of the pancreas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, 26(suppl 5), v56-v68.

Eini, H., Frishman, V., Yulzari, R., Kachko, L., Lewis, E. C., Chaimovitz, C., & Douvdevani, A. (2015). Caffeine promotes anti-tumor immune response during tumor initiation: Involvement of the adenosine A2A receptor. *Biochemical Pharmacology*, 98(1), 110-118.

Elfeil, W., Shanshan, L., Reham, A., & Yu, W. (2013). Pattern recognition receptors mini review. *Global Animal Science Journal*, 1, 1118-1127.



- Eltzschig, H. K., Abdulla, P., Hoffman, E., Hamilton, K. E., Daniels, D., Schönfeld, C., et al. (2005). HIF-1–dependent repression of equilibrative nucleoside transporter (ENT) in hypoxia. *The Journal of Experimental Medicine*, 202(11), 1493-1505.
- Facciabene, A., Motz, G. T., & Coukos, G. (2012). T Regulatory Cells: Key Players in Tumor Immune Escape and Angiogenesis. *Cancer Research*, 72(9), 2162–2171.
- Ferenčík, M., Rovenský, J., Shoenfeld, Y., & Matřha, V. (2005). *Imunitní systém: informace pro každého* (1. vyd.). Praha: Grada.
- Firestein, G. S., Bullough, D. A., Erion, M. D., Jimenez, R., Ramirez-Weinhouse, M., Barankiewicz, J. et al. (1995). Inhibition of neutrophil adhesion by adenosine and an adenosine kinase inhibitor. The role of selectins. *Journal of Immunology* 154: 326–334.
- Franken, L., Schiwon, M., and Kurts, C. (2016) Macrophages: sentinels and regulators of the immune system. *Cellular Microbiology*, 18: 475–487.
- Fredholm, B. B., Chern, Y., Franco, R., & Sitkovsky, M. (2007). Aspects of the general biology of adenosine A2A signaling. *Progress in Neurobiology*, 83(5), 263-276.
- Gessi, S., Merighi, S., Sacchetto, V., Simioni, C., & Borea, P. A. (2011). Adenosine receptors and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (Bba) - Biomembranes*, 1808(5), 1400-1412.
- Gordon, S. (2002). Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell*, 111(7), 927-930.
- Gottschalk, C., Mettke, E., & Kurts, C. (2015). The Role of Invariant Natural Killer T Cells in Dendritic Cell Licensing, Cross-Priming, and Memory CD8+ T Cell Generation. *Frontiers In Immunology*, 6, 379.
- Grunebaum, E., Papinazath, T., Somech, R., & Roifman, C. M. (2012). Different Effects Of ADA And PNP Deficiency On Thymocytes Development. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 129(2), AB138-.
- Hanahan, D. & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57-70.

- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674.
- Haskó, G., Kuhel, D. G., Salzman, A. L., & Szabó, C. (2000). ATP suppression of interleukin-12 and tumour necrosis factor- $\alpha$  release from macrophages. *British Journal of Pharmacology*, 129(5), 909-914.
- Haskó, G., Szabo, C., Nemeth, Z.H., Kvetan, V., Pastores, S.M., Vizi, E.S. (1996). Adenosine receptor agonists differentially regulate IL-10, TNF- $\alpha$ , and nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages and in endotoxemic mice. *Journal of Immunology* 157: 4634–4640.
- Hay, C. M., Sult, E., Huang, Q., Mulgrew, K., Fuhrmann, S. R., McGlinchey, K. A., et al. (2016). Targeting CD73 in the tumor microenvironment with MEDI9447. *Oncoimmunology*, 5(8), e1208875-.
- Haynes-Gilmore, N., Banach, M., Edholm, E.-S., Lord, E., & Robert, J. (2014). A critical role of non-classical MHC in tumor immune evasion in the amphibian *Xenopus* model. *Carcinogenesis*, 35(8), 1807–1813.
- Hořejší, V., Bartůňková, J., Brdička, T., & Špišek, R. (2017). *Základy imunologie* (6., aktualizované vydání). V Praze: Stanislav Juhaňák – Triton.
- Hoskin, D. W., Mader, J. S., Furlong, S. J., Conrad, D. M., & Blay, J. Inhibition of T cell and natural killer cell function by adenosine and its contribution to immune evasion by tumor cells (Review). *International Journal of Oncology*, 2008(32), 527-535.
- Hu, G., Wu, P., Cheng, P., Zhang, Z., Wang, Z., Yu, X., ... Huang, J. (2017). Tumor-infiltrating CD39+  $\gamma\delta$ Tregs are novel immunosuppressive T cells in human colorectal cancer. *Oncoimmunology*, 6(2), e1277305.
- Hynková, L., & Doleželová, H. (2008). Nežádoucí účinky radioterapie a podpůrná léčba u radioterapie nádorů hlavy a krku. *Onkologie*, 2(2), 88-90
- Cheng, Y. S., Xu, F. (2010). Anticancer function of polyinosinic-polycytidylic acid. *Cancer Biology & Therapy*; 10(12): 1219-1223.

- Jadidi-Niaragh, F., Atyabi, F., Rastegari, A., Mollarazi, E., Kiani, M., Razavi, A., et al. (2016). Downregulation of CD73 in 4T1 breast cancer cells through siRNA-loaded chitosan-lactate nanoparticles. *Tumor Biology*, 37(6), 8403-8412.
- Jandová, L. (2017). Imunoterapie melanomu a pankreatického adenokarcinomu na myším modelu (Bakalářská práce). České Budějovice.
- Janeway Jr, C. A., & Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annual review of Immunology*, 20(1), 197-216.
- Janotová, T., Jalovecká, M., Auerová, M., Švecová, I., Bruzlová, P., Maierová, V., et al. (2014). The Use of Anchored Agonists of Phagocytic Receptors for Cancer Immunotherapy: B16-F10 Murine Melanoma Model. *Plos One*, 9(1), e85222-.
- Kalos, M., & June, C. H. (2013). Adoptive T cell Transfer for Cancer Immunotherapy in the Era of Synthetic Biology. *Immunity*, 39(1), 10.
- Kamisawa, T., Wood, L. D., Itoi, T., & Takaori, K. (2016). Pancreatic cancer. *The Lancet*, 388(10039), 73-85.
- 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.
- Khalil, M., & Vonderheide, R. H. (2007). Anti-CD40 agonist antibodies: Preclinical and clinical experience. *Update on Cancer Therapeutics*, 2(2), 61-65.
- Kim, R., Emi, M., & Tanabe, K. (2007). Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology*, 121(1), 1-14.
- Klabusay, M. (2015). The Role of Regulatory T-cells in Antitumor Immune Response. *Klinická Onkologie*, 28(Suppl 4), 4S23-4S27.
- Klener, P. (1997). *Cytokiny ve vnitřním lékařství*. Praha: Grada.
- Klener, P. (2008). Omezilo zavádění tzv. cílené léčby význam protinádorové chemoterapie. *Onkologie*, 2(1), 33-37.
- Klener, P., & Klener jr., P. (2013). *Principy systémové protinádorové léčby*. Praha: Grada.

- Kong, T., Westerman, K. A., Faigle, M., Eltzschig, H. K., & Colgan, S. P. (2006). HIF-dependent induction of adenosine A2B receptor in hypoxia. *The FASEB Journal*, 20(13), 2242-2250.
- Kovaříková, P., Michalová, E., Knopfová, L., & Bouchal, P. (2014). Metody studia buněčné migrace a invazivity nádorových buněk. *Klinická Onkologie*, 27 (1), 22–27.
- Krejsek, J., Andrýs, C., & Krčmová, I. (2016). *Imunologie člověka*. Hradec Králové: Garamon.
- Kubota, T., Niwa, R., Satoh, M., Akinaga, S., Shitara, K., & Hanai, N. (2009). Engineered therapeutic antibodies with improved effector functions. *Cancer Science*, 100(9), 1566-1572.
- Kunk, P. R., Bauer, T. W., Slingluff, C. L., & Rahma, O. E. (2016). From bench to bedside a comprehensive review of pancreatic cancer immunotherapy. *Journal For Immunotherapy Of Cancer*, 4(1), 14.
- Leclerc, B. G., Charlebois, R., Chouinard, G., Allard, B., Pommey, S., Saad, F., & Stagg, J. (2016). CD73 Expression Is an Independent Prognostic Factor in Prostate Cancer. *Clinical Cancer Research*, 22(1), 158-166.
- Leone, R. D., Lo, Y. -C., & Powell, J. D. (2015). A2aR antagonists: Next generation checkpoint blockade for cancer immunotherapy. *Computational And Structural Biotechnology Journal*, 13, 265-272.
- Lipke, P. N., Ovalle, R. (1998). Cell wall architecture in yeast: New structure and new challenges. *Journal of Bacteriology*; 180(15): 3735-3740
- Liu, Z. -Q., Han, Y. -C., Zhang, X., Chu, L., Fang, J. -M., Zhao, H. -X., et al. (2014). Prognostic Value of Human Equilibrative NucleosideTransporter1 in Pancreatic Cancer Receiving Gemcitabin-Based Chemotherapy: A Meta-Analysis. *Plos One*, 9(1), e87103-.
- Loi, S., Pommey, S., Haibe-Kains, B., Beavis, P. A., Darcy, P. K., Smyth, M. J., & Stagg, J. (2013). CD73 promotes anthracycline resistance and poor prognosis in triple negative breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(27), 11091–11096.

Luo, G., Long, J., Zhang, B., Liu, C., Xu, J., Ni, Q., & Yu, X. (2012). Stroma and pancreatic ductal adenocarcinoma: An interaction loop. *Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - Reviews on Cancer*, 1826(1), 170-178.

Mandapathil, M., Hildorfer, B., Szczepanski, M. J., Czystowska, M., Szajnik, M., Ren, J., et al. (2010). Generation and Accumulation of Immunosuppressive Adenosine by Human CD4 + CD25 high FOXP3 + Regulatory T Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 285(10), 7176-7186.

Marabelle, A., Kohrt, H., Caux, C., & Levy, R. (2014). Intratumoral Immunization: A New Paradigm for Cancer Therapy. *Clinical Cancer Research*, 20(7), 1747-1756.

Masáková, K. (2016). Nádorová imunoterapie založená na mechanizmech vrozené imunity a její optimalizace (Bakalářská práce). České Budějovice.

Motz, G. T., Santoro, S. P., Wang, L.-P., Garrabrant, T., Lastra, R. R., Hagemann, I. S., ... Coukos, G. (2014). Tumor Endothelium FasL Establishes a Selective Immune Barrier Promoting Tolerance in Tumors. *Nature Medicine*, 20(6), 607–615.

Muller-Haegeler, S., Muller, L., & Whiteside, T. L. (2014). Immunoregulatory activity of adenosine and its role in human cancer progression. *Expert Review of Clinical Immunology*, 10(7), 897-914.

Novitskiy, S. V., Ryzhov, S., Zaynagetdinov, R., Goldstein, A. E., Huang, Y., Tikhomirov, O. Y., et al. (2008). Adenosine receptors in regulation of dendritic cell differentiation and function. *Blood*, 112(5), 1822-1831.

Obregon, C., Kumar, R., Pascual, M. A., Vassalli, G., & Golshayan, D. (2017). Update on Dendritic Cell-Induced Immunological and Clinical Tolerance. *Frontiers in Immunology*, 8, 1514.

Ohta, A. (2016). A Metabolic Immune Checkpoint: Adenosine in Tumor Microenvironment. *Frontiers in Immunology*, 7, 109.

Ohta, A., Gorelik, E., Prasad, S. J., Ronchese, F., Lukashev, D., Wong, M. K. K., ... Sitkovsky, M. (2006). A2A adenosine receptor protects tumors from antitumor T

cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(35), 13132–13137.

Ohta, A., Madasu, M., Kini, R., Subramanian, M., Goel, N., & Sitkovsky, M. (2009). A2A Adenosine Receptor May Allow Expansion of T Cells Lacking Effector Functions in Extracellular Adenosine-Rich Microenvironments. *The Journal of Immunology*, 183(9), 5487-5493.

Pacheco, R., Martinez-Navio, J. M., Lejeune, M., Climent, N., Oliva, H., Gatell, J. M., et al. (2005). CD26, adenosine deaminase, and adenosine receptors mediate costimulatory signals in the immunological synapse. *Proceedings of the National Academy Of Sciences*, 102(27), 9583-9588.

Palucka, K., Banchereau, J. (2012). Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nature Review Cancer*; 12(4): 265–277.

Perica, K., Varela, JC, Oelke, M., & Schneck, J. (2015). Adoptivní T-buněčná imunoterapie pro rakovinu. *Rambam Maimonides Medical Journal*, 6 (1), e0004.

Petera, J. (Ed.). (2005). *Obecná onkologie: učebnice pro lékařské fakulty*. Praha: Karolinum.

Petruželka, L., & Konopásek, B. (2003). *Klinická onkologie*. Praha: Karolinum.

Piirainen, H., Ashok, Y., Nanekar, R. T., & Jaakola, V. -P. (2011). Structural features of adenosine receptors: From crystal to function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1808(5), 1233-1244.

Priebe, T. S., Atkinson, E. N., Pan, B. F., & Nelson, J. A. (1992). Intrinsic resistance to anticancer agents in the murine pancreatic adenocarcinoma PANC02. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 29(6), 485-489.

Radford, K. J., Tullett, K. M., & Lahoud, M. H. (2014). Dendritic cells and cancer immunotherapy. *Current Opinion in Immunology*, 27, 26-32.

Rejthar, A., & Vojtěšek, B. (2002). *Obecná patologie nádorového růstu*. Praha: Grada.

Ring, S., Enk, A. H., & Mahnke, K. (2010). ATP activates regulatory T cells in vivo during contact hypersensitivity reactions. *The Journal of Immunology*, 184(7), 3408-3416.

- Ryzhov, S., Novitskiy, S. V., Carbone, D. P., Biaggioni, I., Zaynagetdinov, R., Goldstein, A. E., et al. (2008). Host A2B Adenosine receptors promote carcinoma growth. *Neoplasia*, 10(9), 987-995.
- Sachdeva, S., & Gupta, M. (2013). Adenosine and its receptors as therapeutic targets: An overview. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21(3), 245-253.
- Saze, Z., Schuler, P. J., Hong, C. -S., Cheng, D., Jackson, E. K., & Whiteside, T. L. (2013). Adenosine production by human B cells and B cell-mediated suppression of activated T cells. *Blood*, 122(1), 9-18.
- Schnurr, M. (2003). Role of adenosine receptors in regulating chemotaxis and cytokine production of plasmacytoid dendritic cells. *Blood*, 103(4), 1391-1397.
- Schwandner, R., Dziarski, R., Wesche, H., Rothe, M., & Kirschning, C. J. (1999). Peptidoglycan-and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *Journal of Biological Chemistry*, 274(25), 17406-17409.
- Sitkovsky, M. V., Hatfield, S., Abbott, R., Belikoff, B., Lukashev, D., & Ohta, A. (2014). Hostile, hypoxia-A2-adenosinergic tumor biology as the next barrier to overcome for tumor immunologists. *Cancer Immunology Research*, 2(7), 598-605.
- Sitkovsky, M. V., Kjaergaard, J., Lukashev, D., & Ohta, A. (2008). Hypoxia-adenosinergic immunosuppression: tumor protection by T regulatory cells and cancerous tissue hypoxia. *Clinical Cancer Research*, 14(19), 5947-5952.
- Stagg, J., Divisekera, U., McLaughlin, N., Sharkey, J., Pommey, S., Denoyer, D., et al. (2010). Anti-CD73 antibody therapy inhibits breast tumor growth and metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(4), 1547-1552
- Sudhakar, A. (2009). History of cancer, ancient and modern treatment methods. *Journal of Cancer Science & Therapy*, 1(2), 1.
- Sun, X., Wu, Y., Gao, W., Enyoji, K., Csizmadia, E., Müller, C. E., et al. (2010). CD39/ENTPD1 expression by CD4+Foxp3+ regulatory T cells promotes hepatic metastatic tumor growth in mice. *Gastroenterology*, 139(3), 1030-1040.

Sun, Y., & Huang, P. (2016). Adenosine A2B receptor: from cell biology to human diseases. *Frontiers in Chemistry*, 4, 37.

Synnestvedt, K., Furuta, G. T., Comerford, K. M., Louis, N., Karhausen, J., Eltzschig, H. K., et al. (2002). Ecto-5'-nucleotidase (CD73) regulation by hypoxia-inducible factor-1 mediates permeability changes in intestinal epithelia. *Journal of Clinical Investigation*, 110(7), 993-1002.

Šťastný, M., & Říhová, B. (2015). Escape strategies of tumors from immune surveillance. *Klinická Onkologie*, 28(Suppl 4), 4S28-4S37.

Takeuchi, O., & Akira, S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*, 140(6), 805-820.

Tomayko, M. M., Anderson, S. M., Brayton, C. E., Sadanand, S., Steinel, N. C., Behrens, T. W., & Shlomchik, M. J. (2008). Systematic comparison of gene expression between murine memory and naive B cells demonstrates that memory B cells have unique signaling capabilities. *The Journal of Immunology*, 181(1), 27-38.

Turcotte, M., Spring, K., Pommey, S., Chouinard, G., Cousineau, I., George, J., et al. (2015). CD73 is associated with poor prognosis in high-grade serous ovarian cancer. *Cancer Research*, 75(21), 4494-4503.

Upadhyay, M., Samal, J., Kandpal, M., Singh, O. V., & Vivekanandan, P. (2013). The Warburg effect: Insights from the past decade. *Pharmacology & Therapeutics*, 137(3), 318-330.

Vonderheide, R. H., & Glennie, M. J. (2013). Agonistic CD40 antibodies and cancer therapy. *Clinical Cancer Research*, 19(5), 1035-1043.

Vorlíček, J., Abrahámová, J., Vorlíčková, H., & kolektiv (2016). *Klinická onkologie pro sestry*. Praha: Grada.

Waickman, A. T., Alme, A., Senaldi, L., Zarek, P. E., Horton, M., & Powell, J. D. (2012). Enhancement of tumor immunotherapy by deletion of the A2A adenosine receptor. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 61(6), 917-926.



- Waldmannová, E., Caisová, V., Fáberová, J., Sváčková, P., Kovářová, M., Sváčková, D., et al. (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.
- Weiner, L. M., Surana, R., & Wang, S. (2010). Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. *Nature Reviews Immunology*, 10(5), 317-327.
- Whiteside, T. L. (2017). Targeting adenosine in cancer immunotherapy: a review of recent progress. *Expert Review Of Anticancer Therapy*, 17(6), 527-535.
- Willingham, S., Hotson, A., Ho, P., Choy, C., Laport, G., McCaffery, I., & Miller, R. (2016). Abstract PR04: CPI-444: A potent and selective inhibitor of A2AR induces antitumor responses alone and in combination with anti-PD-L1 in preclinical and clinical studies. *Cancer Immunology Research*, 4(11 Supplement), PR04-PR04.
- Yegutkin, G. G., Marttila-Ichihara, F., Karikoski, M., Niemelä, J., Laurila, J. P., Elima, K., et al. (2011). Altered purinergic signaling in CD73-deficient mice inhibits tumor progression. *European Journal of Immunology*, 41(5), 1231-1241.
- Young, A., Mittal, D., Stagg, J., & Smyth, M. J. (2014). Targeting cancer-derived adenosine: new therapeutic approaches. *Cancer Discovery*, 4(8), 879-888.
- Zani, I. A., Stephen, S. L., Mughal, N. A., Russell, D., Homer-Vanniasinkam, S., Wheatcroft, S. B., Ponnambalam, S. (2015). Scavenger receptor structure and function in health. *Cells*; 4: 178-201.
- Zhang, B. (2010). CD73: A novel target for cancer immunotherapy. *Cancer Research*, 70(16), 6407-6411.
- Zhou, Z. -xia, & Sun, L. (2015). Immune effects of R848: Evidences that suggest an essential role of TLR7/8-induced, Myd88- and NF- $\kappa$ B-dependent signaling in the antiviral immunity of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Developmental & Comparative Immunology*, 49(1), 113-120.