

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

**Nádorová imunoterapie založená na synergii
agonistů TLR a ligandů stimulujících fagocytózu.
Posouzení spoluúčasti získané imunity.**

Diplomová práce

Bc. Lucie Paďouková

Školitel: RNDr. Jan Ženka, CSc.

České Budějovice 2018

Paďouková, L., 2018: Nádorová imunoterapie založená na synergii agonistů TLR a ligandů stimulujících fagocytózu. Posouzení spoluúčasti získané imunity. [Cancer immunotherapy based on the combination of TLR ligands and ligands stimulating phagocytosis. Assessing the participation of the specific immunity. Mgr. Thesis, in Czech.] - 64 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

The aim of this thesis is to improve the therapeutic effect of the immunotherapy based on the synergy of TLR agonists with phagocytosis stimulating ligands. Furthermore, this thesis is focused on the information transfer to the specific immunity, as well as it pursues the study of the specific immunity relevance during cancer immunotherapy.

Prohlášení:

Prohlašuji, že svou diplomovou 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 diplomové 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, 30. 4. 2018

.....

Bc. Lucie Paďouková

Poděkování:

V první řadě bych chtěla velice poděkovat mému školiteli RNDr. Janu Ženkovi, CSc. za vedení mé diplomové práce, jeho přínosné rady a pozitivní přístup. Také bych chtěla poděkovat Ph.D. Veronice Caisové za cenné rady a pomoc při vedení experimentů, bez kterých by tato práce nejspíš nevznikla. Velký dík si zaslouží i má rodina, která mě podporovala nejen při psaní této diplomové práce, ale i během celého mého studia.

Obsah

1. ÚVOD.....	1
2. PŘEHLED LITERATURY	2
2.1. Nádorová onemocnění.....	2
2.1.1. Benigní vs. maligní nádory.....	2
2.1.2. Chování nádorové buňky.....	2
2.1.2.1. Ztráta schopnosti kontaktní inhibice.....	2
2.1.2.2. Metabolismus nádorových buněk.....	3
2.1.2.3. Nesmrtelnost nádorových buněk.....	3
2.1.2.4. Neovaskularizace.....	3
2.1.2.5. Metastazování.....	4
2.1.2.5.1. Metastatická kaskáda.....	4
2.1.2.5.2. Pagetova „Soil and seed“ hypotéza.....	4
2.1.3. Klasifikace nádorů.....	5
2.1.3.1. Maligní melanom.....	5
2.1.3.1.1. Povrchově se šířící maligní melanom.....	5
2.1.3.1.2. Nodulární melanom.....	5
2.1.3.1.3. Lentigo maligna melanom.....	6
2.1.3.1.4. Akrolentiginózní melanom.....	6
2.1.3.2 Pankreatický adenokarcinom.....	6
2.1.4. Genetika a dědičnost nádorů.....	6
2.1.4.1. Nádorové onkogeny a proto - onkogeny.....	7
2.1.4.2. Anti - onkogeny (tumor supresorové geny).....	7
2.1.4.3. Dědičné nádory.....	8
2.1.5. Kancerogeneze.....	8
2.1.5.1. Kancerogen.....	9
2.1.5.1.1. Chemické kancerogeny.....	9
2.1.5.1.2. Radiace.....	9
2.1.5.1.3. Radon.....	9
2.1.5.1.4. Virové kancerogeny.....	9
2.1.5.1.5. Bakteriální kancerogeny.....	10
2.2. Imunitní systém.....	10
2.2.1. Nespecifická imunita (vrozená).....	10

2.2.1.1.	PRRs (pattern recognition receptors)	10
2.2.1.1.1.	TLR (Toll – like receptory)	11
2.2.1.1.1.1.	TLR2	11
2.2.1.1.1.2.	TLR3	12
2.2.1.1.1.3.	TLR7 – 8	12
2.2.1.1.1.4.	TLR9	13
2.2.1.2.	Bariéry	13
2.2.1.3.	Fagocytóza	13
2.2.1.4.	Komplement	13
2.2.1.5.	Interferony	14
2.2.1.5.1.	Interferon gamma (IFN - γ)	14
2.2.2.	Specifická imunita (získaná)	14
2.2.2.1.	B – lymfocyty	14
2.2.2.2.	T – lymfocyty	15
2.2.2.3.	Antigen prezentující buňky (APC) a hlavní histokompatibilní komplex (MHC)	16
2.2.3.	Nádor a imunita	16
2.2.3.1.	Obrana nádorů vůči imunitnímu ataku	17
2.2.3.2.	Nádorové antigeny	17
2.2.3.2.1.	Nádorově specifické antigeny (TSA)	18
2.2.3.2.2.	Antigeny sdružené s nádory (TAA)	18
2.2.3.3.	Nádorová terapie	18
2.2.3.3.1.	Nádorová imunoterapie	18
2.2.3.3.1.1.	Nádorová imunoterapie týmu Dr. Ženky	19
3.	CÍLE PRÁCE	21
4.	MATERIÁL A METODY	22
4.1.	Chemikálie	22
4.2.	Laboratorní zvířata	22
5.1.	Buněčné linie	23
4.3.	Příprava nádorových buněk pro transplantaci	23
4.4.	Transplantace nádorů	23
4.5.	Měření objemu nádorů	23
4.6.	Statistické vyhodnocení dat	24
4.7.	Příprava terapeutických látek	24

4.7.1. Příprava R – 848.HCl.....	24
4.7.2. Příprava manan – BAM a dalších kombinací léčby.....	24
4.7.3. Příprava perorálního beta glukanu	24
4.8. Experimenty	25
4.8.1. Účinek terapeutické směsi R - 848, poly (I:C), LTA a mananu kotveného BAM (pulzní intratumorální aplikace) s intraperitoneálním přidáním této směsi na redukci růstu melanomu u myši C57BL/6.....	25
4.8.2. Pozorování účinku CpG, tří TLR agonistů, mananu kotveného BAM a jejich kombinací na redukci růstu melanomu u myši C57BL/6	25
4.8.3. Účinek R – 848, poly (I:C), LTA a Fc – fragmentu kotveného BAM (pulzní aplikace) na redukci růstu melanomu u myši C57BL/6	26
4.8.4. Studium vlivu přidání perorálně aplikovaného beta glukanu k terapii založené na použití R – 848, poly (I:C), LTA a mananu kotveného BAM na růst pankreatického adenokarcinomu u myši C57BL/6	26
4.8.5. Stanovení IFN – γ pomocí průtokové cytometrie (intracelulární stanovení) v reakci splenocytů na nádorový antigen u myši C57BL/6.....	27
4.8.6. Stanovení IFN – γ metodou ELISA (extracelulární stanovení) v reakci splenocytů na nádorový antigen u myši C57BL/6.....	29
4.8.7. Posouzení vlivu anti PD – 1 na účinnost terapie směsí R – 848, poly (I:C), LTA a mananu – BAM. Myší model pankreatického adenokarcinomu.....	32
4.8.8. Účinek R – 848, poly (I:C), LTA, mananu kotveného BAM, protilátky anti CD40 a jejich kombinace na redukci růstu pankreatického adenokarcinomu u myši C57BL/6	32
5. VÝSLEDKY	34
5.1. Účinek terapeutické směsi R - 848, poly (I:C), LTA a mananu kotveného BAM (pulzní aplikace) s perorálním přidáním této směsi na redukci růstu melanomu u myši C57BL/6.	34
5.2. Pozorování účinku CpG, tří TLR agonistů, mananu kotveného BAM a jejich kombinací na redukci růstu melanomu u myši C57BL/6.	35
5.3. Účinek R – 848, poly (I:C), LTA a Fc – fragmentu kotveného BAM (pulzní aplikace) na redukci růstu melanomu u myši C57BL/6.	37
5.4. Studium vlivu přidání perorálně aplikovaného beta glukanu k terapii založené na použití R – 848, poly (I:C), LTA a mananu kotveného BAM na růst pankreatického adenokarcinomu u myši C57BL/6	39
5.5. Stanovení IFN – γ pomocí průtokové cytometrie (intracelulární stanovení) v reakci splenocytů na nádorový antigen u myši C57BL/6.....	41
5.6. Stanovení IFN – γ metodou ELISA (extracelulární stanovení) v reakci splenocytů na nádorový antigen u myši C57BL/6.....	43

5.7. Posouzení vlivu anti PD-1 na účinnost terapie směsí R – 848, poly (I:C), LTA a mananu - BAM. Myší model pankreatického adenokarcinomu.....	44
5.8. Účinek R – 848, poly (I:C), LTA, mananu kotveného BAM, protilátky anti CD40 a jejich kombinace na redukci růstu pankreatického adenokarcinomu u myši C57BL/6.	46
6. DISKUZE.....	49
7. ZÁVĚR.....	54
8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	55
9. LITERATURA.....	57

1. ÚVOD

Nádorová onemocnění jsou jednou z největších komplikací dnešní medicíny. Ačkoliv bylo dosaženo velkých pokroků na poli léčby rakoviny, statistika stále hovoří jasně. Rakovina je druhou nejčastější příčinou úmrtí a až čtvrtina úmrtí je způsobena nádorovými onemocněními (Dusek a kol., 2010, Siegel a kol., 2016). Například v roce 2015 v České republice onemocnělo rakovinou přes 94 tisíc lidí a zemřelo na ni přes 27 tisíc Čechů (Ústav zdravotnických informací a statistiky České republiky, 2016). To znamená, že v České republice umřel na zhoubný novotvar jeden člověk každých 20 minut.

Rakovina se častěji vyskytuje u mužů, než u žen. Z již zmiňovaných 94 tisíc nemocných bylo v roce 2015 přes 48 tis. mužů a přes 46 tis. žen (Ústav zdravotnických informací a statistiky České republiky, 2016). Mimo to zhoubné nádory častěji nalézáme ve vyšším věku. Například 87% všech nových případů rakoviny v USA je nalezeno u lidí starších padesáti let (American Cancer Society, 2017).

Za rok 2016 je ve světě nejčastěji diagnostikovaným typem rakoviny u mužů rakovina prostaty a u žen rakovina prsu. Na druhé příčce se, nezávisle na pohlaví, drží rakovina plic a trachey a na třetí rakovina tlustého střeva a rekta (Siegel a kol., 2016).

Nádorová onemocnění se vyskytují ve všech zemích světa. Jejich četnost výskytu i zastoupení jednotlivých typů rakoviny se liší dle míry vyspělosti ekonomiky jednotlivých států (Torre a kol., 2015). Například Torre a kol. ve své publikaci uvádí, že za rok 2012 dosáhla světová incidence rakoviny 14,1 milionů nových případů. Z těchto 14,1 milionů bylo 8 milionů nových případů rakoviny nalezeno v ekonomicky vyspělých státech (Torre a kol., 2015).

Léčba zhoubných nádorů se neustále zdokonaluje, ale všeobecně zatím platí, že včasná diagnóza a exstirpace nádorové tkáně jsou klíčové (McKinnell, 2006). V posledních letech se velmi rozvíjí novější přístupy k léčbě. Mezi tyto postupy řadíme i imunoterapii, která je předmětem i této diplomové práce.

V mé bakalářské práci jsem se zabývala zdokonalením nádorové imunoterapie cílené na stimulaci zejména nespecifické imunity. Mimo to zde ale byly uvedeny i domněnky o uplatnění specifické imunity při této imunoterapii. V návaznosti na mou bakalářskou práci se v mé diplomové práci věnuji objasnění přínosu specifické imunity při likvidaci nádorové masy a průkazu její přítomnosti při tomto typu imunoterapie.

2. PŘEHLED LITERATURY

2.1. Nádorová onemocnění

Nádorová onemocnění, jsou skupinou onemocnění charakterizovaných nadměrným růstem buněk a jejich nekontrolovatelným množением (American Cancer Society, 2017). Může se vyskytnout téměř v jakékoliv tkáni lidského těla a může se projevat různými symptomy. Díky tomu jsou nádorová onemocnění považována spíše za skupinu nemocí (McKinnell, 2006).

2.1.1. Benigní vs. maligní nádory

Pro **benigní nádory** je charakteristický pomalý růst a neschopnost prorůstat okolními tkáněmi. Jsou tvořeny dobře diferencovanými buňkami (podobné buňkám zdravé tkáně). Většinou nemají žádný klinický význam a díky tomu setrvávají v organismu bez povšimnutí (Abercrombie a Ambrose, 1962). Pro naše tělo je riskantní jejich růst. Mohou utlačovat okolní struktury a omezovat jejich funkci. Díky této vlastnosti jsou benigní nádory většinou nalezeny (McKinnell, 2006).

Maligní nádory se vyznačují nekontrolovatelným růstem, schopností invadovat okolní tkáně, narušovat jejich strukturu a prostupovat mezi buňky zdravých tkání. Zhoubné nádory se také vyznačují schopností metastazovat (více v kapitole 2.1.2.5. Metastazování). Desorganizace a neovaskularizace jsou jejich dalšími typickými znaky (Abercrombie a Ambrose, 1962). Většina nádorů je monoklonálních, tzn., že vznikají z jedné původní buňky.

2.1.2. Chování nádorové buňky

Jak již bylo řečeno, maligně transformované buňky mají mnoho specifických mechanismů odlišných od buněk normálních. Patří mezi ně následující.

2.1.2.1. Ztráta schopnosti kontaktní inhibice

U zdravých buněk je vyvinut mechanismus kontaktní inhibice. Jedná se o mechanismus, který se uplatňuje při růstu buněk. Buňky rostou, dokud se nezačnou sebe navzájem dotýkat, poté je jejich růst zastaven (Ingber, 2008). Maligní buňky ale tuto schopnost kontaktní inhibice ztratili a přerůstají přes sebe i v několika vrstvách, na rozdíl od buněk zdravých (Ribatti, 2017). Fyziologicky se v organismu tento mechanismus uplatňuje například i při embryogenezi (Stramer a Mayor, 2017).

2.1.2.2. Metabolismus nádorových buněk

Odlišný je také metabolismus nádorových buněk. Pro něj je charakteristická zvýšená syntéza látek a to zejména enzymů potřebných pro buněčný cyklus, syntézu DNA a mitózu. U nádorů převažuje zejména typ glykolýzy, kdy je glukóza přeměňována na kyselinu mléčnou a vyloučena. Díky tomuto mechanismu narůstá v organismu spotřeba glukózy, která je nutná k výrobě energie ve formě ATP. Tento fakt byl nalezen O. H. Warburgem a byl pojmenován jako tzv. Warburgův efekt. Je vysvětlován třemi různými způsoby. Zaprvé, že rakovinné buňky mají dysfunkci v mitochondriích. Zadruhé, že existuje určitá adaptace nádorů k nízkému množství kyslíku uvnitř jejich tkáně. A za třetí, že existují geny, které dokáží utlumit mitochondriální funkce (Gallagher a kol., 2017).

2.1.2.3. Nesmrtelnost nádorových buněk

Zdravé lidské buňky prochází pouze omezeným počtem dělení. Tomuto procesu se říká senescentní krize. Senescentní krize je způsobena zkrácením chromozomálních telomer (snížená aktivita enzymu telomerázy). Nádorové buňky ale takový proces nemají a jsou tak schopny neomezeného počtu dělení. Dají se proto nazvat jako „nesmrtelné“ (Wei a Sedivy, 1999).

2.1.2.4. Neovaskularizace

Živiny a kyslík prostupují difuzí do nádorové tkáně pouze do hloubky několika milimetrů. Pro nádorový růst je proto zcela nezbytná angiogeneze (neovaskularizace). Angiogeneze je proces tvorby nových cév z již stávajících (Ronca a kol., 2017). Tento jev je typický pro embryonální vývoj, ale je uplatňován i při nádorovém růstu. Tvorba nových cév je řízena blokací antiangiogenických faktorů a sekrecí různých angiogenických faktorů produkovaných nádorem a okolními buňkami (Fidler, 2002). Mezi ně patří zejména (FGF - 2) fibroblastový růstový faktor – 2 a (VEGF) vaskulární endoteliální faktor (Preziosi, 2003). Angiogeneze probíhá třemi hlavními cestami:

- a) angiogeneze pučením - tvorba cév migrací a proliferací aktivovaných epiteliálních buněk,
- b) angiogeneze vchlipováním – kapilární stěny se rozšíří do lumen a rozdělí se na dvě,
- c) „co - option“ angiogeneze – „přivlastnění“ jiné cévy (Ronca a kol., 2017).

2.1.2.5. *Metastazování*

Metastazování je proces, kdy nádorové buňky vycestují z místa primárního nádoru do odlehlých míst a tam vytvoří nádor sekundární (Massagué a kol., 2017). Většina pacientů umírá hlavně na sekundární nádory, proto je také rakovina chápána jako systémová nemoc a musí být léčena systémovou terapií (Mc Kinnell, 2006).

2.1.2.5.1. **Metastatická kaskáda**

Metastatická kaskáda zahrnuje několik kroků vedoucích k rozšíření primárního nádoru. Patří sem tyto kroky:

- 1) **invaze** nádorových buněk přes okolní tkáň,
- 2) **intravazace** – prostup nádorových buněk do cév (krevních i lymfatických),
- 3) **obrana** nádorových buněk vůči imunitnímu systému nutná k jejich přežití v cévách,
- 4) **extravazace** – prostup nádorových buněk z cév do okolních tkání,
- 5) **implantace** nádorových buněk v nové tkáni,
- 6) **množení** nádorových buněk a tvorba vzdáleného ložiska – **metastázy** (Massagué a kol., 2017, Fidler, 2002)

2.1.2.5.2. **Pagetova „Soil and seed“ hypotéza**

Tato hypotéza se opírá o specifický mechanismus metastazování. Jedná se o mechanismus, kdy určité typy nádorů mají tendenci metastazovat do specifických tkání. Například karcinom prostaty typicky metastazuje do kostí, karcinom plic zase do mozku. Tuto predispozici poprvé objevil Stephen Paget již v roce 1889 (Whitson a Oro, 2017).

Vzdálená místa těla (orgány, tkáň) jsou označovány jako půda („soil“) pro budoucí sekundární nádory. Semena („seed“) jsou potom primární nádory, které jsou pomocí cév roznášeny do těchto vzdálených ložisek. Tato ložiska mají specifické vlastnosti vhodné pro metastazující nádorové buňky (Paget, 1889).

Tato teorie může být vysvětlena třemi způsoby. Zaprvé, speciálním cévním propojením primárního a sekundárního místa nádoru = přímé spojení mezi tkání/orgánem primárního nádoru a tkání/orgánem sekundárního nádoru (Whitson a Oro, 2017). Za druhé, mikroprostředí vzdáleného ložiska podobné ložisku primárnímu (Mc Kinnell, 2006). A za třetí, vylučované chemokiny, které jsou nezbytné pro vznik premetastatického výklenku (Zhong a kol., 2016).

2.1.3. Klasifikace nádorů

Nádory dělíme do jednotlivých skupin dle jejich histologického původu (převzato a upraveno Preziosi, 2003). Rozlišujeme tyto nádory (Tab. I):

Tab. I: Klasifikace nádorů dle histologické stavby (Preziosi, 2003).

TYP NÁDORU	PŮVOD NÁDORU	PŘÍKLAD
Mezenchymové nádory	Nádory z pojiva	Fibrosarkom
Epitelové nádory	Nádory z epitelu	Adenokarcinom
Neuroektodermové nádory	Nádory z neuroektodermových buněk	Maligní melanom
Germinální nádory	Nádory z germinálních buněk	Teratom
Choriokarcinom	Nádory z trofoblastu	Gestační trofoblastová nemoc
Mezoteliom	Nádory z mezotelu	Difuzní maligní mezoteliom

V této práci byly využity dva typy nádorů, maligní melanom a pankreatický adenokarcinom.

2.1.3.1. Maligní melanom

Maligní melanom je zhoubný nádor kožních pigmentových buněk, tzv. melanocytů. Četnost maligních melanomů se zvyšuje. Od roku 1975 do roku 2011 se výskyt maligních melanomů zvýšil o celých 11% (Siegel a kol., 2012). Rozlišujeme čtyři základní druhy melanomů.

2.1.3.1.1. Povrchově se šířící maligní melanom

Povrchově se šířící maligní melanom je nejčastějším typem melanomu u bělochů. Způsobuje 65 - 70% všech melanomů. Vyskytuje se u dospělých na jakékoliv části těla. Častěji se ale vyskytuje v horní části zad a na chodidlech. Nejprve roste povrchově, později prorůstá do hlubších vrstev kůže. Projevuje se jako černá, zvrásněná a vyvýšená ploška nad světlejším okolím kůže (Jerant a kol., 2000).

2.1.3.1.2. Nodulární melanom

Nodulární melanom tvoří 15 – 30% všech melanomů. Má kopulovitý tvar (vyvýšený nad okolím) s červeno – černým, nebo červeno – hnědým zbarvením. Může být zaměněn za krevní

puchýře, hemangiomy, dermální névy, nebo polypy (Yuksel a Tamer, 2017, Jerant a kol., 2000).

2.1.3.1.3. Lentigo maligna melanom

Lentigo maligna melanom, který tvoří 4 – 10% všech melanomů, vzniká z lentigo maligny (pigmentového névu) na kůži předem narušené slunečním zářením. Vyskytuje se hlavně u starších osob (zejména starších 70 let). Po mnoho let má radiální růst, až do maligního zvratu, kdy začne růst vertikálně (Jerant a kol., 2000, Wollina a kol., 2017).

2.1.3.1.4. Akrolentiginózní melanom

Zbýlých 2 – 8 % všech melanomů tvoří tzv. akrolentiginózní melanom. Tento melanom se, nezávisle na rase člověka, nejčastěji vyskytuje na periferních částech těla, jako jsou dlaně, plosky nohou, či prostor pod nehty (Jerant a kol., 2000).

2.1.3.2 Pankreatický adenokarcinom

Pankreatický adenokarcinom byl v roce 2016 čtvrtou nejčastější příčinou úmrtí na rakovinu (Siegel a kol., 2016) a je odhadováno, že v roce 2030 bude dokonce druhou nejčastější příčinou úmrtí na rakovinu (Rahib a kol., 2014). Počínající pankreatický adenokarcinom je většinou asymptomatický a proto je až 80% nádorů diagnostikováno v pozdním stádiu. Léčba je velmi náročná a většina pacientů umírá.

Mikroprostředí adenopankreatického nádoru je specifické svou desmoplázií, což označuje určitou tuhost a zvýšený tlak intersticiální tekutiny v tkáni nádoru. Toto mikroprostředí se mimo jiné vyznačuje rozsáhlou mikrovaskularitou a hypoxií (Andersen a kol., 2017).

Dále rozlišujeme pacienty s familiární rakovinou pankreatu, která je způsobena zděděnou mutací genů. Mezi tyto geny patří: BRCA – 2, PALB – 2, ATM, nebo CDKN2A (Shindo a kol., 2017).

2.1.4. Genetika a dědičnost nádorů

Jak již bylo zmíněno, rakovina vzniká následkem nahromadění mutací (3-7), tedy změny v genomu. Rozlišujeme somatické a germinální mutace. **Somatické mutace** jsou změny v jednotlivých buňkách našich těl, z nichž se může rozvinout nádor (Thomasetti a Vogelstein, 2017). Opakem jsou **mutace germinální**, které jsou dědičné po jednom z rodičů. Celá řada nádorových onemocnění je dědičná. To znamená, že některý typ nádorů

se častěji vyskytuje právě v jedné rodině. Tyto mutace jsou předmětem zájmu rychle se rozvíjejícího odvětví onkogenetiky (Knudson, 1971).

Onkogenetika se zabývá počtem a strukturou chromozomů (aneuploidií, euploidií a chromozomálními aberacemi) a jejich poruchami a mutacemi. Tyto změny jsou důvodem vzniku nádorových chorob (McKinnell, 2006).

2.1.4.1. Nádorové onkogeny a proto - onkogeny

Ve zdravém genomu se přirozeně nacházejí geny, které při působení kancerogenů mutují a transformují se v **onkogeny**. Onkogeny jsou tedy mutacemi pozměněné geny, jejichž následkem dochází k maligní transformaci buňky. Jedná se o geny s defektní strukturou, nadměrnou expresí, translokací, nebo nadměrnou tvorbou produktů (Weinberg, 1989). Onkogeny mohou pocházet z virů, nebo mohou vznikat z normálních genů, proto - onkogenů (McKinnell, 2006).

Onkogeny virů se zabudovávají do náhodného (nefyziologického) místa genomu. Mezi tyto onkogeny řadíme například virus Epstein – Baarové (EBV), nebo například lidský papilomavirus - HPV (Lawson a kol., 2018).

Proto - onkogeny jsou geny, které plní strukturální funkce - kódují růstové faktory, nebo jsou to regulační proteiny. Pracují standardně a nemají negativní vliv na buňku (Weinberg, 1989). Proto – onkogeny iniciují vstup buňky do proliferační fáze, brání apoptóze a inhibují diferenciaci (Chen a Wang, 2015).

Nyní je známo asi 40 druhů proto - onkogenů. Do této skupiny řadíme například mutace genu K – ras, který se s vysokou frekvencí vyskytuje u kolorektálního karcinomu, plicního adenokarcinomu a nádorů pankreatu (Wang a kol., 2015). Dalším příkladem může být mutace genu Her2, nebo také Her2/neu, který je hojně exprimován u 20 - 30% raných karcinomů prsu a je spojen s kratším přežitím (Qian a kol., 2017).

2.1.4.2. Anti - onkogeny (tumor supresorové geny)

Onkogeny jsou regulovány **anti - onkogeny (tumor supresorovými geny)**. Pro rozvoj maligního nádoru je důležitý poměr mezi proto – onkogeny a antionkogeny (aktivace onkogenů a inaktivace anti - onkogenů). Anti – onkogeny jsou exprimovány zdravými buňkami a regulují proliferaci a diferenciaci. Mohou bránit proliferaci buněk, indukovat diferenciaci a buněčnou apoptózu a inhibují růst nádoru. Jsou také nezbytné pro zachování

integrity genomu. Mezi anti – onkogeny patří například p53, Rb – 1, p21, nebo BRCA – 1, či BRCA – 2 (Chen a Wang, 2015).

2.1.4.3. Dědičné nádory

Zděděné predispozice pro rozvoj nádorů zvyšují pravděpodobnost určitých typů nádorů (často i rakoviny všeobecně). Takto indukovaným nádorům můžeme říkat dědičné nádory.

Mezi ně řadíme například **familiární retinoblastom (Rb)**. Tento typ retinoblastomu je relativně vzácný nádor, který je způsoben dědičnou mutací v genu RB - 1, který je lokalizován na dlouhém raménku chromozomu 13 (Metz a kol., 2017).

Dalším příkladem je i **dědičný nádor rakoviny prsu a ovarií (HBOC)**. Je způsoben deleční mutací v genu BRCA - 1 nebo BRCA – 2 (Arai a kol., 2017). Jedná se o rakovinné onemocnění, které postihuje muže i ženy (častěji ženy) a vyskytuje se hlavně v nižším věku. Mimo to i celkově zvyšuje pravděpodobnost rozvoje rakoviny (Eliade a kol., 2017).

2.1.5. Kancerogeneze

Mezi všeobecně nejpřijímanější teorií o vzniku nádorů patří teorie o zvratu normální buňky v buňku nádorovou prostřednictvím **nahromadění několika mutací**. Tento zvrát může být popsán několika kroky. Prvním krokem jsou **změny v DNA-genomu** zdravé buňky. Vznikne tak **iniciovaná buňka** (nelze ji ale žádnou z dostupných metod odlišit od buněk zdravých), která prochází **klonální expanzí** (Cabrera a kol., 2015). To je stav, kdy dochází k hojnému dělení a množení iniciované buňky za vzniku **klonu iniciovaných buněk**.

Dalším krokem je **promoce**, což je proces, kdy vznikají další změny v buněčné DNA. Výsledkem těchto změn je **časná nádorová buňka** (Isakov, 2017). Tato časná nádorová buňka prochází procesem **progrese** za vzniku **pozdní nádorové buňky**. Následuje **maligní konverze**, jejímž výsledkem je vznik **maligního nádoru** (Cabrera a kol., 2015).

Nutno ovšem podotknout, že promotory nejsou schopny vyvolat maligní zvrát zdravé buňky bez předchozí iniciace. Mezi promotory řadíme například protein kinázu C, která podporuje vstup buněk do buněčného cyklu (Isakov, 2017), nebo žlučové kyseliny, které jsou promotory pro rozvoj kolorektálního karcinomu (Gadaleta, 2017).

2.1.5.1. Kancerogen

Je známa celá řada látek vyvolávajících nádorové bujení. Takovými látkám říkáme kancerogeny. Kancerogeny rozlišujeme na chemické kancerogeny, endogenní kancerogeny, radon, radiaci, nebo virové kancerogeny (McKinnell, 2006).

2.1.5.1.1. Chemické kancerogeny

Mezi chemické kancerogeny řadíme různé anorganické kovy a nerosty (jako například arzenik, kadmium, nikl, nebo azbest), nebo organické sloučeniny (jako aflatoxin). V této skupině najdeme i látky využívané v běžném životě – pesticidy, herbicidy, antibiotika, alkohol, tabákové výrobky, nebo například i deodoranty (Feinstein a Collins, 2018).

2.1.5.1.2. Radiace

Radiační záření jsou dalším známým kancerogenem. **Ultrafialové záření** je záření o vlnové délce 200 – 400 nm a je původce hlavně kožních nádorů. Často je rozděleno do tří typů: UVA 320 - 400 nm, UVB 280 – 320 nm a UVC 200 – 280 nm (Ramasamy a kol., 2017). Zejména UVB záření má kancerogenní účinky, protože je přímo absorbováno do DNA, ale i UVC záření může být kancerogenní. UVC záření je ovšem absorbováno ozonem a odumřelou kůží, proto tedy není tolik nebezpečné (McKinnell, 2006).

Ionizující záření mohou způsobovat mutace, rakovinné bujení, či nemoc z ozáření. Mezi tato záření řadíme záření α , záření β , záření γ , rentgenové záření a neutronové záření. Radikály uvolněné působením těchto záření způsobují narušení fosfodiesterových vazeb a vznik zlomů v DNA. Ionizující záření je také například využíváno k malignímu zvratu zdravých buněk pro výzkumné účely (Mirzayans a kol., 2017).

2.1.5.1.3. Radon

Radon je přirozeně se vyskytující radioaktivní plyn, který je tvořen rozpadem uranu a thoria. Nalezneme ho ve vodě, vzduchu, půdě a horninách. Jako radioaktivní plyn prostupuje do domů a veřejných budov prostřednictvím zemního plynu a podzemních vod. Radon byl popsán jako zdroj rakoviny plic, nebo například rakoviny prsu (Vopham a kol., 2017, Hassfjell a kol., 2017).

2.1.5.1.4. Virové kancerogeny

Jsou známy viry, které mohou indukovat vznik nádorů. Mezi ně řadíme virus Epstein - Baarové (EBV), který způsobuje Burkittův lymfom (Nonoyama a kol., 1973), nebo

virus hepatitidy B (HBV) způsobující hepatocelulární karcinom (Jühling a kol., 2017), či lidský papilomavirus (HPV), který indukuje rozvoj karcinomu děložního čípku (Landy a kol., 2018).

2.1.5.1.5. Bakteriální kancerogeny

Je uvažován význam bakterií při rozvoji nádorů. Například bakterie *Helicobacter pylori* je pravděpodobně původce rakoviny žaludku (Wong a kol., 2004).

2.2. Imunitní systém

Imunitní systém udržuje homeostázu těla. Jeho hlavními funkcemi jsou obrana proti cizím strukturám (antigenům), apoptóza (plánovaná smrt) starých buněk, degradace buněk poškozených, nebo maligně transformovaných a tolerance buněk vlastního těla. Imunitní systém můžeme rozdělit do dvou částí a to na **nespecifickou (vrozenou)** a **specifickou (získanou) imunitu**.

V imunitním systému ale nalézáme speciální signální proteiny typické jak pro vrozenou, tak pro získanou imunitu, které nazýváme **cytokiny**. Cytokiny jsou signální proteiny produkované buňkami imunitního systému. Řadíme mezi ně interleukiny, interferony, tumor nekrotizující faktory, lymfokiny, růstové faktory, faktory stimulující kolonie, stresové proteiny, nebo chemokiny (Smyth a kol., 2004). Většina z nich bude podrobněji popsána v dalších částech této práce. Rozlišujeme sekretované a membránové (zakotvené v membráně) cytokiny, kam patří například i v této práci významný CD – 40L.

2.2.1. Nespecifická imunita (vrozená)

Vrozená imunita je evolučně starší typ obrany organismu vůči patogenům s rychlým rozvojem odpovědi. Až do nedávna byla považována za mechanismus bez imunologické paměti, na rozdíl od specifické imunity. Ačkoliv není plně znám mechanismus, bylo zjištěno, že i vrozená imunita má schopnost zesílit svou odpověď při sekundárním setkání s antigenem. Ta je nejspíše dána epigenetickými mechanismy (Kurtz, 2005).

2.2.1.1. PRRs (pattern recognition receptors)

Receptory rozpoznávající vzory (PRRs) jsou receptory, které rozpoznávají nebezpečí nebo poškození. PRRs jsou hojně exprimovány buňkami, které přichází do kontaktu se vstupujícími mikroorganismy (epiteliální buňky, buňky vrozené i získané imunity). Jedná

se o receptory, které dokáží rozpoznat PAMPs (pathogen associated molecular patterns) a DAMPs (damage associated molecular patterns) a započít zánět (McIlvain a kol., 2013).

PAMPs jsou molekulární vzory spojené s patogenitou. Jedná se o vzory nacházející se na všech patogenech, jako jsou například bakteriální exotoxiny a endotoxiny, nebo mykotoxiny. PAMPs byly využity i v této práci. Typickým zástupcem této skupiny látek je například manan. **Manan** je látka, která se vyskytuje na povrchu buněčné stěny bakterie *Candida albicans* (spolu s glukany a chitinem). N – vázaný manan je rozpoznáván dendritickými buňkami a přímo ovlivňuje produkci prozánětlivého cytokinu IL – 6 (Cambi a kol., 2008).

DAMPs jsou molekulární vzory spojené s poškozením tkáně uvolňované poškozenými buňkami. Mezi ně řadíme HMGB1 (LPS), DNA a RNA, S100 molekuly (vápník – vázající proteiny), nebo metabolity purinu (ATP, adenosin, kyselina močová). PAMPs vyvolávají septickou kaskádu, kde se účastní jak vrozená, tak získaná imunita. Poškození indukované PAMPs může způsobovat uvolnění DAMPs (Gruda a kol., 2018).

Mezi **PRRs** patří například (McIlvain a kol., 2013):

- 1) **TLRs (Toll - like receptors)** - rozpoznávají různé PAMPs (bakteriální, virové, či mykotické vzory),
- 2) **CLRs (C - type lectin receptors)** - rozpoznávají houby,
- 3) **RLRs (retinoic acid - inducible gene - like receptors)** - rozpoznávají viry,
- 4) **NLRs (Nod - like receptors)** - rozpoznávají bakterie.

2.2.1.1.1. TLR (Toll – like receptory)

TLR jsou vysoce konzervované transmembránové proteiny. Bylo rozpoznáno 13 různých homologních lidských TLR a různé TLR rozpoznávají různé bakteriální složky – např. lipopolysacharidy (LPS), flagelin, lipoproteiny, dvouvláknové virové RNA, nebo nemetylované CpG ostrůvky bakteriální a virové DNA (Yin a Cheng, 2016, McIlvain a kol., 2013).

2.2.1.1.1.1. TLR2

Mezi **TLR2** agonisty řadíme například pro tuto práci důležité LTA gram pozitivních bakterií, nebo beta glukán.

Kyselina lipoteichová (LTA) je molekula kotvená k vnější části cytoplasmatické membrány gram pozitivních bakterií (Morath a kol., 2001). Je získávána ze dvou bakterií: *Streptococcus pneumoniae* a *Staphylococcus aureus*. LTA v synergii s peptidoglykanem bakterií indukuje syntézu cytokinů v mononukleárních fagocytech. Rozpoznání LTA vrozenou imunitou (TLR2) představuje důležitý mechanismus v patogenezi systémových obtíží v průběhu infekčních onemocnění způsobených těmito gram pozitivními bakteriemi. LTA je nezbytná pro rozvoj zánětlivé odpovědi (Schröder a kol., 2003). LTA získaná z bakterie *S. aureus* neobsahuje příměsi LPS, které je pro lidský organismus toxické, lze ji proto využívat pro terapeutické účely (Morath a kol., 2001). I v této práci plní tuto funkci jako prozánětlivá složka ve složitém mikroprostředí nádorů.

Beta - 1,3 – D - glukán je imunomodulátor s protinfekčními a antimikrobními účinky. Zesiluje imunitní odpověď stimulací nespecifické imunity prostřednictvím uvolňování cytokinů a aktivace CR3 (komplement receptor 3) a tím dochází k aktivaci neutrofilů, makrofágů a NK buněk. Tyto buňky pak díky tomu, že jejich CR3 receptor je beta glukánem aktivován atakují iC3b opsonizované patogeny. Dokonce bylo prokázáno, že beta glukany zesilují odolnost organismu například vůči infekci antraxem (*Bacillus anthracis*) při podání při a po infekci (Ostroff, 2014). Beta glukany jsou skupina přírodních polysacharidů obsahujících monomery D – glukózy spojeny β – glykosidickou vazbou. Jsou důležitou součástí buněčné stěny bakterií (např. *Candida albicans*), kvasinek, řas a rostlin. Nevyskytují se ani u obratlovců, ani u bezobratlých (Cambi a kol., 2008, Stier a kol., 2014). Beta - 1,3 - D - glukán je farmaceuticky stabilní a proto je mu zejména v posledních letech věnována velká pozornost pro jeho potenciální léčebný efekt (Ostroff, 2014). Právě pro tento potenciál je využíván i v této práci.

2.2.1.1.1.2. TLR3

Signál TLR3 je aktivován dsRNA uvolněnou z nekrotických buněk během zánětu, nebo virové infekce. TLR3 aktivace indukuje sekreci interferonů a prozánětlivých cytokinů a vyvolává aktivaci imunitních buněk, které jsou přítomny během určitých mikrobiálních infekcí (Yin a Cheng, 2016). Mezi analogy TLR3 řadíme například poly (I:C) využívané v této práci. Inosino – cytidylový řetězec mimikuje dsRNA.

2.2.1.1.1.3. TLR7 – 8

Společným faktorem TLR7 a 8 je aktivace pomocí virové ssRNA (Yin a Cheng, 2016). Dalším jejich společným znakem je produkce cytokinů a stimulace imunitních buněk.

Jedním z TLR agonistů patřícím do skupiny 7 i 8 je R-848 (resiquimod), jež slouží k buněčné aktivaci. Tato aktivace ale závisí na acidifikaci a zrání endosomů. R-848 patří do skupiny imidazochinolinů (spolu s imiquimodem), které jsou již schváleny pro léčbu genitálních bradavic (Heil a kol., 2003). Jsou proto vhodným terapeutikem bez zjevných toxických účinků na lidský organismus využívaným i v této práci.

2.2.1.1.4. TLR9

TLR9 je jediným TLR, který je lokalizován nikoliv na povrchu buňky, ale v endosomálních, nebo lyzozomálních kompartmentech buněk. Proto je pro toto rozpoznání nezbytná acidifikace a zrání endosomů, čímž je tato aktivace podobná aktivaci TLR7 a 8. TLR9 rozpoznává DNA obsahující nemetylované bakteriální CpG (Heil a kol., 2003). CpG je také jedním z předmětů zkoumání této diplomové práce.

2.2.1.2. Bariéry

Často opomíjeným mechanismem vrozené imunity jsou anatomické (kůže, řasinkové buňky, slzy, sliny, atd.) a fyziologické (teplota, pH, atd.) bariéry (Turvey a Broide, 2010).

2.2.1.3. Fagocytóza

Hlavním mechanismem vrozené imunity je ale zejména fagocytóza. Fagocyty eliminují patogeny, jako jsou bakterie, houby, nebo maligní buňky. Fagocytóza se ale mimo jiné účastní i při apoptóze, nebo prezenci antigenu lymfocytům ve specifické imunitní reakci (Lim a kol., 2017). Rozlišujeme profesionální a neprofesionální fagocyty. Oba dva typy fagocytárních buněk se účastní při ataku vrozené imunity. Mezi profesionální fagocyty řadíme hlavně polymorfonukleáry (neutrofilny, monocyty, makrofágy), mezi neprofesionální fagocyty patří epitelální buňky, fibroblasty a dendritické buňky (Lim a kol., 2017).

2.2.1.4. Komplement

Dalším neopomenutelným mechanismem je komplement, který tvoří humorální složku vrozené imunity. Komplement je aktivační kaskáda sérových proteinů. Má tři cesty aktivace – klasickou, lektinovou a alternativní (Mamidi a kol., 2017).

Komplement je **klasicky** aktivován **protilátkami**, nebo pomocí **CRP** (C reaktivní protein), v **lektinové dráze** přes **MBL** (manan vázající lektin) a v **alternativní dráze** je komplement aktivován přes **CR3** (komplementový receptor 3).

Jednou z funkcí komplementového systému je i **CDC** (= na komplementu závislá cytotoxicita). Je to proces imunitního systému, při kterém dochází k usmrcení patogenů poškozením jejich membrán. Při tomto procesu se nezapojují protilátky ani buňky imunitního systému. Hlavním mechanismem je vznik membrány atakujícího komplexu, který stojí za degradací buněk (Mamidi a kol., 2017).

2.2.1.5. Interferony

Interferony hrají hlavní roli v ochraně vůči virovým infekcím. Jsou to látky inhibující proliferaci, které stimulují cytotoxickou aktivitu T buněk, NK buněk, monocytů, makrofágů a dendritických buněk (Pestka a kol., 2004). Nejznámějšími jsou interferon alfa (IFN - α), beta (IFN - β) a gamma (IFN - γ). Pro mou práci je nevýznamnějším IFN - γ .

2.2.1.5.1. Interferon gamma (IFN - γ)

IFN - γ je efektorový cytokin Th1 imunity, který reguluje prozánětlivou reakci, je klíčovým regulátorem makrofágů. Také inhibuje virovou replikaci. Je produkován NK buňkami a CD4+ Th1 buňkami. IFN - γ mimo jiné aktivuje makrofágy směrem k „M1“ fenotypu, který je charakterizován expresí velkého množství prozánětlivých cytokinů, jako jsou IL - 1, IL - 12, IL - 23, nebo TGF - α (Sica a Mantovani, 2012). Při nádorové imunoterapii tak IFN - γ v nádorech navozuje potřebné prozánětlivé Th1 mikroprostředí (Mortara a kol., 2006). IFN - γ je také nezbytný k produkci dalších cytokinů a zánětlivých faktorů potřebných pro rozvoj zánětlivé reakce, udržování Th1 mikroprostředí a inhibici T regulačních buněk (Green a kol., 2017).

2.2.2. Specifická imunita (získaná)

Specifická imunita je evolučně vyspělejší, než imunita vrozená (specifická). Organismus ji získává až při styku s antigenem a díky tomu je pro ni typická paměť. Tyto antigeny jsou rozpoznávány B a T lymfocyty, které mají na svém povrchu receptory schopné rozpoznat antigen - BCR (B buněčný receptor pro B - lymfocyty) a TCR (T buněčný receptor pro T - lymfocyty).

2.2.2.1. B - lymfocyty

Rozlišujeme dvě stádia B - lymfocytů: **plasmatické a paměťové buňky**. B - lymfocyty jsou aktivovány spoluprací s Th lymfocyty (Hořejší, 2015).

Plasmatické buňky produkují protilátky (imunoglobuliny), které působí přímo proti antigenům (extracelulárním patogenům). Rozlišujeme pět tříd protilátek – IgA, IgD, IgE, IgG a IgM. Protilátky mají **Fc - fragment**, jímž se mohou vázat na Fc - receptor buněk. Váží se na povrchové nádorové antigeny, opsonizují je a umožňují napadání fagocyty, či NK buňkami. Ke své správné funkci potřebují kostimulační signály dodané Th - lymfocyty (Hořejší, 2015).

U protilátkové imunity rozlišujeme mechanismy ADCC, či ADP. **ADCC** (= na protilátkách závislá buněčná cytotoxicita) je reakce založená na interakci protilátek (Fc fragmentu) s NK buňkami (Fc receptoru). Při ADCC dochází k lýze buněk, které mají na povrchu navázanou protilátku. Tuto lýzu provádějí NK buňky (Mamidi a kol., 2017, Hořejší, 2015). Při **ADP** (= na protilátkách závislá fagocytóza), stejně jako ADCC, protilátky zprostředkovávají efektorové funkce přes Fc fragment a jeho odpovídající Fc receptor. Na rozdíl od ADCC je ale málo znalostí o ADP. Hlavní funkcí ADP je nejspíše eliminace imunitních komplexů (protilátka – antigen) a infikovaných buněk (Ana-Sosa-Batiz a kol., 2014).

Paměťových buněk vzniká menší množství, ale v organismu setrvávají delší čas a jsou aktivovány při opětovném setkání s antigenem. Jsou zdrojem paměti pro imunitní systém.

2.2.2.2. T – lymfocyty

T – lymfocyty rozpoznávají intracelulární antigeny. Rozlišujeme dva druhy T- lymfocytů, **Tc – lymfocyty** a **Th – lymfocyty**. **Tc – lymfocyty** potřebují pro svou proliferaci a diferenciaci ve funkční CTL (cytotoxické T - lymfocyty) antigen prezentovaný APC (antigen prezentujícími buňkami). CTL rozpoznávají pomocí TCR buňky infikované virem, nebo parazity. Ale i buňky změněné, například nádorové (Hung a kol., 1998, Hořejší, 2015). **Th - lymfocyty** jsou pomocné lymfocyty využívané k aktivaci B – lymfocytů (viz. výše). Mimo jiné slouží i k produkci cytokinů (Hung a kol., 1998).

T – lymfocyty plní celou řadu dalších imunitních funkcí a také se hojně uplatňují v boji s nádory.

2.2.2.3. Antigen prezentující buňky (APC) a hlavní histokompatibilní komplex (MHC)

APC jsou fagocytární buňky – makrofágy, dendritické buňky, B – lymfocyty. Jejich hlavním principem je vystavení antigenu na svém vlastním povrchu – prezence antigenu imunokompetentním buňkám (Hořejší, 2015).

MHC je systém, jakým je antigen vystaven na povrchu imunitních buněk. Rozlišujeme MHC I. třídy a MHC II. třídy. Biologická funkce MHC I. třídy je prezence lineárního peptidického antigenu CTL. MHC II. třídy naopak prezentují lineární peptidický antigen Th – lymfocytům (Hung a kol., 1998, Stüve a Vernino, 2017).

2.2.3. Nádor a imunita

Imunitní systém má velký význam v obraně vůči nádorům. Vykonává tzv. imunologický dohled, nebo také imunitní dozor. Teorie imunitního dozoru je založená na takovém principu, že ve tkáních běžně vznikají transformované buňky, ale náš imunitní systém je průběžně eliminuje (Ribatti, 2017).

V boji s nádorem se zapojují všechny hlavní mechanismy imunity. A to mechanismy typické jak pro nespecifickou imunitu (aktivované makrofágy, granulocyty, NK buňky), tak pro specifickou imunitu (Hořejší, 2015).

Hlavní funkcí **makrofágů** je fagocytóza zbytků odumřelých buněk a buněk nádorových. Rozlišujeme dva typy makrofágů – M1 a M2. IFN – γ indukuje vznik M1 makrofágů. Tyto makrofágy fagocytují odumřelé buňky, buňky nádorové a navozují prozánětlivé prostředí (zejména také produkcí IL – 12, který stimuluje NK buňky a T – lymfocyty). Proto jsou v nádorovém prostředí žádoucí (Marvel a Gabrilovich, 2015), na rozdíl od M2 makrofágů, které mají spíše tlumivý účinek na protinádorovou imunitu. M2 makrofágy napomáhají regeneraci a hojení poškozených tkání. Na vzniku M2 makrofágů se podílejí hlavně IL – 4 a IL – 13 (Hořejší, 2015). Podobný tlumivý účinek jako M2 makrofágy mají i **MDSC** (myeloid-derived suppressor cells), které se liší od původních myeloidních buněk (makrofágy, dendritické buňky, neutrofilny) (Marvel a Gabrilovich, 2015).

NK buňky jsou tzv. přirození zabíječi. Jsou schopny bez předchozí stimulace rychle ničit nádorové buňky (rozpoznají je podle nízké hladiny MHC I. na povrchu) a virem infikované buňky (Freund, 2017).

Nástroje **specifické imunity** byly popsány výše. Patří mezi ně protilátky aktivující fagocytózu, komplement a buněčnou cytotoxicitu, Tc – lymfocyty a Th1 – lymfocyty (Hořejší, 2015).

Nádorová imunologie má také význam při diagnostice nádorů a imunodeficiencí. Imunodeficiencie (např. AIDS) mají ale také spojitost s tvorbou nádorů a terapie nádorů naopak mohou způsobovat imunodeficiencie (Ribatti, 2017).

2.2.3.1. Obrana nádorů vůči imunitnímu ataku

Nádory využívají přirozené vlastnosti imunity bránit příliš silné imunitní odpovědi, která byla evolučně vyvinuta jako ochrana před autoimunitními reakcemi. Jedním ze způsobů, jakým nádory unikají imunitnímu ataku, je založen na inhibičních receptorech umístěných na povrchu T – lymfocytů (Hořejší, 2015). Jedná se o molekuly **PD – 1** a **CTLA - 4**, které se váží na ligandy. V případě PD – 1 jsou to ligandy PD – L1 a PD – L2, v případě CTLA - 4 jsou to ligandy CD80 a CD86. Tyto ligandy nalezneme fyziologicky na površích APC, nádorových buněk a dalších (Matoušková, 2015).

Další z mechanismů tlumících protinádorovou imunitu jsou buňky inhibující zánět. Radíme mezi ně již zmiňované **M2 makrofágy**, **MDSC**, nebo **Treg** (T regulační lymfocyty).

Treg buňky jsou schopny inhibovat účinek ostatních T – lymfocytů a některých dalších imunitních buněk. Nevíce známy jsou CD4+ Treg – lymfocyty, které tvoří asi 5% ze všech T – lymfocytů. Jejich hlavní funkcí je obrana před autoimunitními reakcemi, navíc modulují imunitu při zánětlivých procesech. Tato funkce působí ovšem pronádorově (Klabusay, 2015).

2.2.3.2. Nádorové antigeny

Nádorové antigeny jsou prostředkem k rozpoznání nádorových buněk imunitním systémem. Jsou tak využívány k diagnostice nádorů. Tyto antigeny jsou nádor specifické, vyskytují se tedy pouze na nádorových buňkách. Jsou to molekuly změněné genetickými mutacemi - zkrácení proteinů, jejich nesprávné poskládání, či abnormální post - translační modifikace (Reuschenbacha kol., 2009). Nádorové antigeny jsou vylučovány do nádoru a prezentovány imunitním systémem, což vede k maturaci specifických efektorových buněk (Meeusen a kol., 2017). Rozlišujeme dva typy nádorových antigenů: nádorově specifické antigeny a antigeny sdružené s nádory.

2.2.3.2.1. Nádorově specifické antigeny (TSA)

Nádorově specifické antigeny (TSA) se nalézají pouze na nádorových buňkách a na normálních buňkách se nevyskytují (Hořejší, 2015). Byly objeveny v první polovině dvacátého století. Myší nádory indukované kancerogeny byly vyléčeny chirurgickou resekcí. Po opětovném setkání se stejnými nádorovými buňkami, imunitní systém myši tyto buňky rozpoznal a zničil. Jiné nádorové buňky ovšem rozpoznány a zničeny nebyly (Gross, 1943).

2.2.3.2.2. Antigeny sdružené s nádory (TAA)

Antigeny sdružené s nádory (TAA) se nacházejí jak na nádorových, tak na zdravých buňkách. Jedná se o autologní buněčné antigeny. Jsou využívány jako diagnostické markery (Hořejší, 2015). Jedním z nejvíce prostudovaných antigenů je například tumor supresorový protein p53 (Zhang a kol., 2003).

2.2.3.3. Nádorová terapie

Nádorová terapie je velmi starý obor. V dnešní době převládá zejména kombinace chirurgické terapie a chemoterapie, či radioterapie. Mimo tyto typy léčby rozlišujeme i imunoterapii, která dominuje na poli výzkumu. Je předmětem i této diplomové práce.

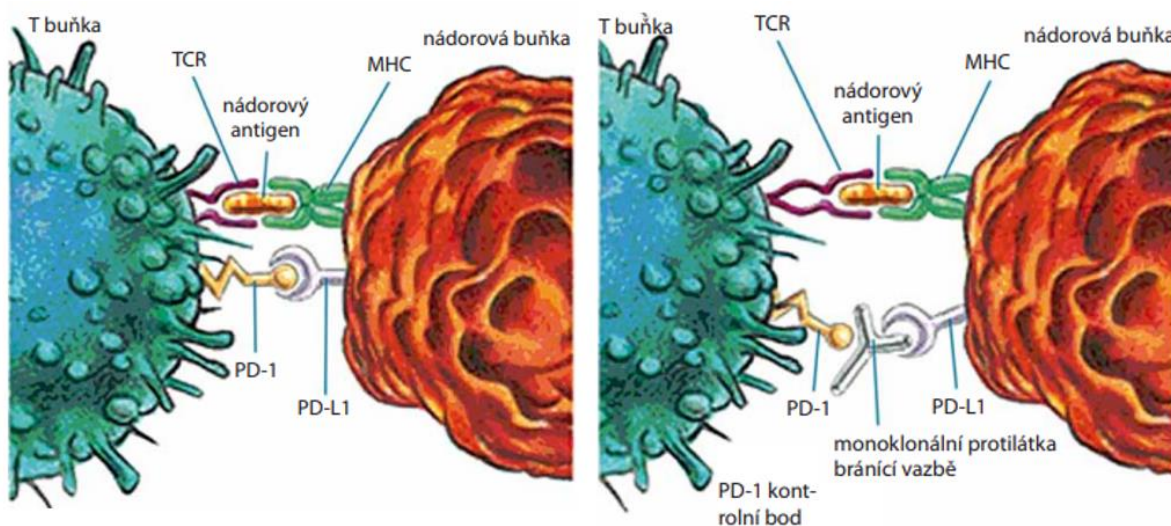
2.2.3.3.1. Nádorová imunoterapie

Prvním významným historickým počinem na poli nádorové imunoterapie byl objev Dr. W. B. Coleyho z roku 1891. Ten infikoval pacienta se sarkomem kosti toxinem z bakterií *Serratia marcescens* a *Streptococcus pyogenes* (tzv. „Coleyovy toxiny“). Tato infekce vedla k nekróze nádorové tkáně a pacient se dostal na dalších osm let do remise (Kramer a kol., 2018).

Nádorová imunoterapie ale zaznamenává i v posledních dekádách značný rozvoj. Jednomu z posledních významných objevů na tomto poli se věnuje i tato práce. Jsou jím tzv. checkpointní molekuly PD – 1, CTLA – 4 a monoklonální protilátky z nich odvozené (Matoušková, 2015), nebo přímé stimulanty protinádorové imunity, jako je monoklonální protilátka anti CD40.

Anti PD – 1 (anti-programmed cell death 1) je monoklonální protilátka schválená k imunoterapii např. karcinomu močového měchýře, nebo maligního melanomu. Je prodávána pod obchodním názvem Pembrolizumab. Jedná se o mechanismus, kdy je touto monoklonální protilátkou blokována vazba PD – 1 (na T buňce) a odpovídajícího receptoru

na antigenu (nádorové buňce) PD – L1. PD – L1 blokuje efektorovou funkci T – lymfocytu. Po přidání anti PD – 1 dochází k obnově funkce této efektorové buňky vyblokováním ligandu nádorové buňky, jak lze pozorovat na Obr. 1 (Matoušková, 2015).



Obr. 1: Vlevo - mechanismus úniku nádorové buňky před imunitní buňkou - blokace efektorové funkce T – lymfocytu. Vpravo - blokace tohoto úniku pomocí monoklonální protilátky anti PD – 1 a umožnění efektorové funkce T – lymfocytu (převzato a upraveno Matoušková, 2015).

Anti CD40 je také monoklonální protilátka, která působí na dráhu CD – 40 a CD – 40L (CD40 ligand). CD40L se běžně vyskytuje na Th – lymfocytech a umožňuje vazbu na APC (makrofágy, dendritické buňky a B – lymfocyty), které mají CD40 receptor. Anti CD40 monoklonální protilátka mimikuje přirozený CD40L a tak funguje jako přímý stimulant protinádorové imunity. Bylo dokázáno, že mimo jiné účinky, anti CD40 monoklonální protilátka také nepřímo stimuluje NK buňky k produkci IL – 12 a IFN - γ (Turner a kol., 2001).

2.2.3.3.1.1. *Nádorová imunoterapie týmu Dr. Ženky*

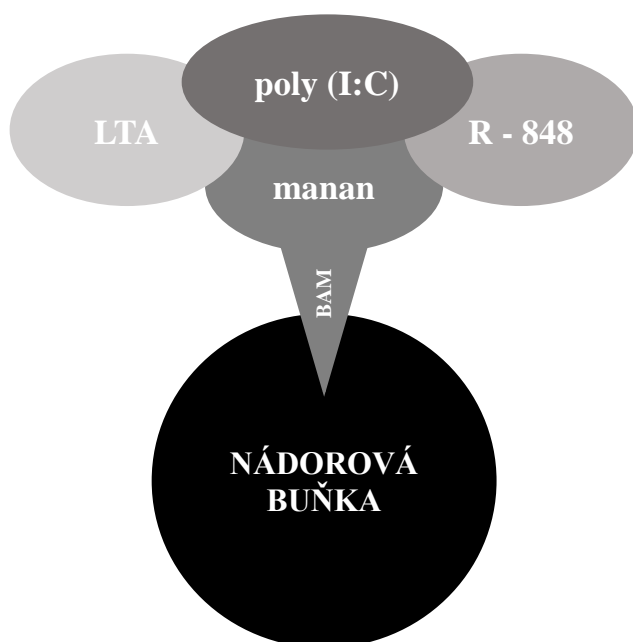
Už dlouhou řadu let se tým doktora Ženky zabývá nádorovou imunoterapií založenou na aktivaci vrozené imunity. Imunoterapie založená na nespecifické imunitě spočívá v rozpoznání **PAMPs** pomocí PRRs. Tyto vzory patogenity jsou uměle implantovány i na nádorové buňky. V této imunoterapii je zdrojem těchto vzorů **manan kotvený BAM**, tímto týmem již dlouhou dobu využívaný a ověřený. Kotvení do fosfolipidové dvojvrstvy je nezbytné pro správné fungování těchto terapeutik, které by byly bez vhodné kotvy

na nádorovou buňku neúčinné. Manan – BAM v této terapii funguje jako **ligand podporující fagocytózu**.

Další součástí této imunoterapie jsou **TLR agonisté**. Mezi tyto TLR agonisty řadíme **R - 848** (TLR7-8, v případě myši jen TLR7), **poly (I:C)** (TLR3), **LTA** (TLR2), **CpG** (TLR9) a **beta glukán** (TLR2). Jednotlivé účinky na imunitní systém byly zmíněny v předchozích kapitolách.

Dalším bodem této imunoterapie je využití tzv. checkpointní molekuly **anti PD – 1** pro zvýšení protinádorové imunitní odpovědi (také vysvětleno v předchozích kapitolách). Také je zde využit přímý stimulant protinádorové imunity, **anti CD40**, který přinesl velmi překvapivé výsledky, či **Fc – fragment protilátek** významný pro aktivaci a stimulaci dalších imunitních buněk.

Soubor všech těchto terapeutik tvoří ucelený systém terapie vyvinutý týmem Dr. Ženky, který je neustále rozvíjen. Základním léčebným prvkem je kombinace R – 848, poly (I:C), LTA a manan – BAM, jak je zobrazeno na Obr. 2. K této terapeutické směsi jsou dále přidávány další, již zmíněné látky za účelem zvýšení účinnosti terapie.



Obr. 2: Struktura základní terapeutické směsi.

3. CÍLE PRÁCE

- 1) Studium vylepšení stávající terapie založené na synergii agonistů TLR a ligandů stimulujících fagocytózu při léčbě melanomu B16-F10.
- 2) Vyhodnocení přenosu informace na získanou imunitu měřením reakce splenocytů na setkání s nádorovým antigenem detekcí vnitrobuněčné produkce IFN-gamma pomocí průtokové cytometrie a pomocí ELISA stanovení.
- 3) Posouzení významu získané imunity při nádorové imunoterapii založené na synergii agonistů TLR a ligandů stimulujících fagocytózu v *in vivo* experimentech stimulací jejího účinku.

4. MATERIÁL A METODY

4.1. Chemikálie

- Anti PD – 1 (BioXCell, USA)
- Anti CD – 40 (BioXCell, USA)
- BAM = Biocompatible anchor for cell membrane, Mw 4000 (NOF Europe, Belgium)
- beta glukán (suspenze) (Transfer Point, USA)
- Concanavalin A (Sigma-Aldrich, USA)
- CpG 1826 (Miltenyi Biotec, Německo)
- ELISA kit IFN-gamma (eBioscience, USA)
- FCS = Fetal Calf Serum (Sigma-Aldrich, USA)
- Fluorescenčně značené monoklonální protilátky pro průtokovou cytometrii:
 - Anti-Mouse CD3e FITC; clone 145-2C11; 0.5 mg/ml (eBioscience, USA)
 - Anti-Mouse CD4 APC; clone GK1.5; 0.2 mg/ml (eBioscience, USA)
 - Anti-Mouse CD8a PE-Cy7; clone 53-6.7; 0.2 mg/ml (eBioscience, USA)
 - Rat IgG kappa Iso Control PE (eBioscience, USA)
- Foxp3 = Fixation/Permeabilization working solution
- LTA (*B. subtilis*) (Sigma Aldrich, USA)
- mannan (Sigma-Aldrich, USA)
- Monensin (Sigma-Aldrich, USA)
- Mouse IgG, Fc – fragment, Mw 50 000 (ThermoFisher, USA)
- Permeabilization buffer
- PBS = pufovaný fyziologický roztok (Sigma Aldrich, USA)
- Poly (I:C) (sodná sůl) (Sigma Aldrich, USA)
- resiquimod (R-848) (Tocris Bioscience, UK)
- RPMI 1640 (Sigma Aldrich, USA)
- Trypanová modř (Sigma Aldrich, USA)
- Trypsin (Sigma Aldrich, USA)

4.2. Laboratorní zvířata

V experimentech byly použity laboratorní myši C57BL/6 z chovu Charles River Laboratories. Myši byly 8 týdnů staré samice, chované v samostatně ventilovaných boxech

zvěřince Katedry medicínské biologie. Myši měli nepřetržitý přístup ke krmivu a napáječe. Byl dodržován denní režim 12/12 hodin.

4.3. Buněčné linie

Byly použity dvě nádorové buněčné linie. Melanom B16-F10 a pankreatický adenokarcinom Panc02. Melanomové buňky byly kultivovány v médiu RPMI-1640 s příměsí 10% FCS, penicilinu (100 g/ml), streptomycinu (100 µg/ml), amfotericinu B (0,25 µg/ml), L - glutaminu (2,2 mM) a merkaptoethanolu (50 µM). Medium pro kultivaci Panc02 bylo založeno na D-MEM se stejnými aditivami.

4.4. Příprava nádorových buněk pro transplantaci

Nejprve bylo z buněk odstraněno kultivační médium, které bylo nahrazeno sterilním PBS a buňky byly 3x za sebou promyty. Následně byl přidán trypsin a byla provedena trypsinizace pro uvolnění nádorových buněk ze dna kultivační nádoby. Byla využita trypsinizační směs 0,02% trypsinu a 0,25% EDTA v HBSS. Kultivační nádoba s trypsinem byla umístěna do termostatu (37°C, 5% CO₂) a inkubována asi minutu. Po vyjmutí kultivační nádoby z termostatu bylo přidáno RPMI s 10% FCS pro zastavení trypsinizace. Dále byla použita 50ti ml centrifugační zkumavka, kam byl přelit roztok a zkumavka byla dále cetrifugována (5 minut, 4°C, 150 g). Supernatant byl slit a roztok byl naředěn RPMI s 10% FCS na koncentraci potřebnou pro transplantaci. Počet buněk byl stanoven pomocí Bürkerovy komůrky. Oba dva typy buněk (melanom B16-F10 i adenopankreatický karcinom Panc02) byly připraveny na transplantaci stejným způsobem.

4.5. Transplantace nádorů

Laboratorním myším C57BL/6 byl transplantován nádor melanom B16-F10, nebo pankreatický adenokarcinom Panc02 subkutánně na pravý bok. Myším byla na pravém boku vyholena srst a byly jim injikovány buňky v množství 4x10⁵ buněk/myš.

4.6. Měření objemu nádorů

Nádory byly měřeny kaliperem obden. Byly měřeny dva rozměry. Rozměr A – délka nádoru a rozměr B – výška nádoru. Objem byl vypočten dle vzorce: $V = \frac{\pi}{6} * a * b^2$.

4.7. Statistické vyhodnocení dat

Ve všech uvedených grafech bylo využito stanovení střední chyby průměru (SEM). K analýze dat byl využit program MS Excel pro výpočty objemů nádorů, tvorba grafů, SEM. Dále byl také využit program STATISTICA 12 pro analýzu přežití (Survival Analysis Kaplan Meier) a dále testy ANOVA, post-hoc Tukey test a UnequalN test.

4.8. Příprava terapeutických látek

4.8.1. Příprava R – 848.HCl

Byla vytvořena suspenze 0,5 mg R – 848 a 1,4 µl 3,5% HCl. Je nutné nejprve vytvořit hydrochlorid resiquimodu, protože R – 848 je ve vodě málo rozpustný. Pro další rozpuštění bylo přidáno 10 µl PBS.

4.8.2. Příprava manan – BAM a dalších kombinací léčby

Aminovaný manan byl připraven redukční aminací (Torosantucci a kol., 2005) v prostředí octanu amonného a kyanoborohydridu sodného (50°C, pH 7,5). Následně byla provedena dialýza tohoto roztoku použitím dialyzační trubice MWCO 3500 (Serva, Německo) proti PBS (4°C, přes noc). Na aminoskupinu aminovaného mananu byl navázán BAM prostřednictvím skupiny NHS (N – hydroxysukcinimid), (1 hodina, pH 7,3). Nakonec byl roztok dialyzován (MWCO 3500, 4°C, přes noc) proti PBS. Manan – BAM byl upraven na koncentraci 0,2 mM v PBS a byl zamrazen. Použitý manan – BAM byl rozmražen při pokojové teplotě a použit.

K mananu – BAM byly přidány různé příměsi, jako je R – 848.HCl, poly (I:C), LTA, CpG, Fc - fragment, anti PD – 1, či anti CD40. Všechny tyto příměsi byly rozpuštěny v 0,2 mM roztoku manan – BAM na požadovanou výslednou koncentraci. Ta byla u R-848, poly (I:C), LTA, CpG a Fc 0,5 mg/ml. U protilátek anti PD-1 a anti CD40 činila 0,4 mg/ml.

4.8.3. Příprava perorálního beta glukanu

60 mg beta glukanu (Transfer point) bylo smíšeno s 1 ml vody. Tato suspenze byla myším podávána v množství 50 µl p. os.

4.9. Experimenty

4.9.1. Účinek terapeutické směsi R - 848, poly (I:C), LTA a mananu kotveného BAM (pulzní intratumorální aplikace) s intraperitoneálním přidáním této směsi na redukci růstu melanomu u myši C57BL/6

V tomto experimentu bylo použito 18 laboratorních myší (osmitýdenních samic) C57BL/6N z chovu Charles River Laboratories. Byla provedena transplantace melanomu B16-F10. 12 dní po transplantaci byly myši randomizací rozděleny do tří skupin, jak lze pozorovat v Tab. II.

Tab. II: Randomizační rozdělení myší do skupin dle použitých terapeutik a způsobu aplikace.

SKUPINA	TERAPEUTICKÁ LÁTKA	ZPŮSOB APLIKACE
A	R – 848 + poly (I:C) + LTA + manan - BAM	i.t.
B	R – 848 + poly (I:C) + LTA + manan - BAM	i.t. + i.p.
K	PBS	i.t.

Terapeutické látky byly aplikovány i.t. v pravidelných pulzech ve dny 0, 1, 2... ..8, 9, 10 a i.p. pouze 5. a 13. den. Intratumorálně bylo aplikováno 50 µl léčebné směsi (A: R – 848 + poly (I:C) + LTA + manan – BAM, B: R – 848 + poly (I:C) + LTA + manan - BAM, K: PBS) a i.p. 200 µl terapeutické směsi (R – 848 + poly (I:C) + LTA + manan – BAM). Obden byly kaliperem měřeny rozměry nádorů a vypočítány objemy až do 18. dne. Po ukončení pokusu bylo vedeno sledování myší až do stého dne. Zbývající myši byly 100. den usmrceny stržením vazy.

4.9.2. Pozorování účinku CpG, tří TLR agonistů, mananu kotveného BAM a jejich kombinací na redukci růstu melanomu u myši C57BL/6

Pro tento experiment bylo využito 36 myší – osmitýdenních samic C57BL/6N z chovu Charles River Laboratories. Následně byla provedena transplantace nádorových buněk B16-F10 na pravý bok. Dvanáct dní po transplantaci byly myši randomizačně rozděleny do skupin. Rozdělení do skupin je přehledněji uvedeno v Tab. III.

Tab. III: Rozdělení laboratorních myší do skupin dle druhu terapie.

SKUPINA	TERAPEUTICKÁ SMĚS
A	R – 848 + poly (I:C) + LTA
B	CpG
C	CpG + manan – BAM
D	R – 848 + poly (I:C) + LTA + manan – BAM
E	manan – BAM
K	PBS

Terapeutické směsi byly aplikovány i.t. v množství 50 µl (A: R – 848 + poly (I:C) + LTA, B: CpG, C: CpG + manan – BAM, D: R – 848 + poly (I:C) + LTA + manan – BAM, E: manan – BAM, K: PBS), v pravidelných pulzech ve dny: 0, 1, 2... ..8, 9, 10. Nádory byly obden měřeny (kaliperem) a byl vypočten nádorový objem až do 18. dne. Dále byl sledován úhyn myši až do stého dne, kdy byly myši usmrceny stržením vazů.

4.9.3. Účinek R – 848, poly (I:C), LTA a Fc – fragmentu kotveného BAM (pulzní aplikace) na redukci růstu melanomu u myši C57BL/6

Celkem bylo pro tento experiment použito 36 myších samic C57BL/6N osm týdnů starých pocházejících z chovu Charles River Laboratories. Dále byla provedena transplantace melanomu B16-F10 s.c. na pravý bok. 12 dní po transplantaci byly myši randomizovány do následujících skupin, jak je uvedeno v následující tabulce Tab. IV.

Tab. IV: Randomizace myši do skupin dle terapeutik.

SKUPINA	TERAPEUTIKÁ LÉČBA
A	R – 848 + poly (I:C) + LTA
B	Fc - BAM
C	R – 848 + poly (I:C) + LTA + Fc – BAM
D	R – 848 + poly (I:C) + LTA + manan - BAM
E	manan - BAM
K	PBS

Terapeutické látky (A: R – 848 + poly (I:C) + LTA, B: Fc – BAM, C: R – 848 + poly (I:C) + LTA + Fc – BAM, D: R – 848 + poly (I:C) + LTA + manan – BAM, E: manan - BAM, K: PBS) byly myším podávány v dávce 50 µl/myš v pravidelných intervalech ve dny: 0, 1, 2... ..8, 9, 10. Obden byly nádory měřeny kaliperem až do 18. den. Do stého dne byl sledován úhyn myši. Stý den byl experiment ukončen, a myši byly usmrceny stržením vazů.

4.9.4. Studium vlivu přidání perorálně aplikovaného beta glukanu k terapii založené na použití R – 848, poly (I:C), LTA a mananu kotveného BAM na růst pankreatického adenokarcinomu u myši C57BL/6

Pro tento experiment bylo použito 18 myši (osmitýdenních samic) C57BL/6, které pocházely z chovu Charles River Laboratories. Byla provedena transplantace adenopankreatického karcinomu Panc02 s.c. na pravý bok. 12. den po transplantaci byly myši randomizovány do skupin po šesti, jak je uvedeno v následující tabulce (Tab. V).

Tab. V: Rozdělení myši do skupin dle terapie.

SKUPINA	TERAPEUTICKÁ LÁTKA i.t.	TERAPEUTICKÁ LÁTKA p.os.
A	R – 848 + poly (I:C) + LTA + manan - BAM	-
B	R – 848 + poly (I:C) + LTA + manan – BAM	beta glukan
K	PBS	-

Směs terapeutických látek (R – 848 + poly (I:C) + LTA + manan – BAM) byla podávána i.t. v dávce 50 μ l/myš ve dny 0, 1, 2... ..8, 9, 10... ..16, 17, 18... ..24, 25, 26 myším ve skupinách A a B, myším ve skupině K bylo aplikováno PBS. K této léčbě byly dále skupině B p.os. přidávány 3 mg beta glukanu rozpuštěné v 50 μ l vody prvních 15 dní léčby. Velikost nádorů byla měřena obden kaliperem až do 30. dne. Do 110. dne bylo sledováno přežívání myši. 110. den byl pokus ukončen a myším byl stržen vaz.

4.9.5. Stanovení IFN – γ pomocí průtokové cytometrie (intracelulární stanovení) v reakci splenocytů na nádorový antigen u myši C57BL/6

Pro tento experiment bylo použito 30 myši C57BL/6 (osmítýdenní samice) z chovu Charles River Laboratories. Myším byl transplantován melanom B16-F10 s.c. na pravý bok. Dvanáct dní po transplantaci byly myši randomizovány do dvou skupin (A: R – 848 + poly (I:C) + LTA + manan – BAM, K: PBS), jak je uvedeno v tabulce (Tab. VI).

Tab. VI: Rozdělení myši do skupin dle terapeutických směsí.

SKUPINA	TERAPEUTICKÁ LÁTKA
A	R – 848 + poly (I:C) + LTA + manan – BAM
K	PBS

Myším byly podávány terapeutické směsi (A: R – 848 + poly (I:C) + LTA + manan - BAM, K: PBS) i.t. v množství 50 μ l ve dny: 0, 1, 2... ..8, 9, 10... 16, 17, 18... ..24, 25, 26. Ve dny 0, 7, 15, 23 a 31 bylo provedeno stanovení IFN – γ . Ve stejné dny byly změřeny rozměry melanomů a vypočítán objem nádorů.

V tomto experimentu byla stanovována hladina IFN – γ ve splenocytech (po interakci splenocytů s nádorovým antigenem UV usmrcených B16-F10) pro zjištění přenosu informace na získanou imunitu. Pro stanovení hladiny IFN – γ byly použity vždy 3 myši z léčené skupiny (R – 848 + poly (I:C) + LTA + manan – BAM) a 3 myši z kontrolní skupiny (PBS).

Melanomové buňky B16-F10 byly jeden den předem usmrceny UV zářením. Nádorové buňky v médiu RPMI byly umístěny do Petriho misek a byly umístěny asi 20 cm od UV zářivky a usmrceny (1 hodinu UV záření). Následující den byly buňky sklizeny a spočítány

(Bürkerova komůrka) a naředěny na potřebnou koncentraci. Byl použit 24 jamkový panel, kam byly nádorové buňky B16-F10 nasazeny v počtu 150 tisíc na jamku.

Z 6 myši (3 léčené a 3 kontrolní) byly sterilně odebrány sleziny. Ty byly následně převedeny přes filtr (70 μm , BD Biosciences, USA) a tato suspenze byla centrifugována (10 min/160 g/4°C). Následovala lýza erytrocytů pomocí 1 ml 0,84% NH_4Cl (37°C), které působilo 2 – 3 minuty. Lýza erytrocytů byla zastavena 10 ml média RPMI s 10% FCS.

Buňky byly znovu centrifugovány (10 min/160 g/4°C) a splenocyty spočítány (Bürkerova komůrka). Splenocyty byly v 24 jamkovém panelu smíseny s nádorovými v poměru: splenocyty 900 000 a buňky B16-F10 150 000 v celkovém objemu 1 ml. Dále byl přidán Concanavalin A v množství v koncentraci 2,5 $\mu\text{g/ml}$ do jamky pro pozitivní kontrolu. Concanavalin A jako mitogen stimuluje T – lymfocytární produkci $\text{IFN} - \gamma$. 24 jamkový panel byl inkubován 1 hodinu v termostatu (5% CO_2 , 37°C). Mimo Concanavalinu A byly použity další 4 kontroly: izotypová kontrola pro INF-gamma , nebarvená kontrola, kontrolní slezina neléčené myši a kontrola s obarvenými povrchovým znaky. Izotypová kontrola slouží k vyloučení nespecifického barvení. Kontrola ze sleziny neléčené myši znázorňuje pohled na zdravé buňky.

Následně byl přidán Monensin (inhibitor intracelulárního transportu) pro zamezení úniku intracelulárního $\text{IFN} - \gamma$. Monensin byl po výše uvedené inkubaci přidán do všech jamek v koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$. 24 jamkový panel byl opět inkubován v termostatu po dobu 5 hodin (5% CO_2 , 37°C).

Vzorky byly následně přeneseny z 24 jamkového panelu do zkumavek pro průtokový cytometr. Byl připraven tzv. mastermix monoklonálních protilátek (fluorescenčně značených) pro povrchové značení buněk.

Byly použity 3 monoklonální protilátky Anti - mouse CD3e FITC (100x ředěná, pro T - lymfocyty), Anti – mouse CD4 APC (100x ředěná, pro CD4^+ Th - lymfocyty) a Anti – mouse CD8a PeCy7 (100x ředěná, pro CD8^+ Tc - lymfocyty). Mastermix byl přidán do každého vzorku v celkovém množství 10 μl a vzorky byly inkubovány 30 minut ve tmě a chladu.

Po této inkubaci byl do zkumavek přidán FF (1% roztok FCS v PBS) a zkumavky byly centrifugovány (5 min/160 g/4°C). Promytí FF bylo opakováno ještě jednou a ze zkumavek byl odebrán supernatant a zbývající pelet byl rozsuspendován ve zbývajícím tekutině. Dále byl přidán Foxp3 Fixation and Permeabilization working solution v množství

1 ml. Vzorky byly 40 minut inkubovány v chladnu a dvakrát centrifugovány (5 min/350 g/pokožová teplota). Následně byly přidány 2 ml Permeabilization buffer, pro blokování formaldehydu obsaženého v Foxp3 Fixation and Permeabilization working solution. Také byly do zkumavek přidány 2 μ l inaktivovaného bovinního séra a vzorky byly inkubovány (15 minut/pokožová teplota/tma).

Následně byla do zkumavky přidána fluorescenčně značená protilátka proti IFN - γ (intracelulární značení). Do izotypové kontroly byla přidána kontrola IgG PE (40x ředěná). Dále byly vzorky inkubovány (30 min/pokožová teplota/tma), byly přidány 2 ml Permeabilization buffer a dvakrát centrifugovány (5 min/350 g/pokožová teplota). Takto vytvořené vzorky byly měřeny průtokovým cytometrem BD FACS Canto II (BD Bioscience, USA) a byly analyzovány v programu BD FACS Diva verze 6.1.3.

Při měření byly použity tyto parametry, uvedené v následující tabulce (Tab. VII).

Tab. VII: Nastavení průtokového cytometru.

	Blue	Red
Laser Delay	0,00	30,20
Area Scaling	0,30	1,32
Window Extention	2	
Area Scaling	0,3	

4.9.6. Stanovení IFN – γ metodou ELISA (extracelulární stanovení) v reakci splenocytů na nádorový antigen u myši C57BL/6

Pro tento experiment bylo použito 24 myší C57BL/6 (osmítýdenních samic) z chovu Charles River Laboratories. Myším byl transplantován melanom B16-F10. 12 dní po transplantaci byly myši randomizovány a rozřazeny do skupin dle terapie, jak lze pozorovat v Tab. VIII.

Tab. VIII: Rozdělení myší do skupin podle terapie.

SKUPINA	TERAPEUTICKÁ LÁTKA
A	R – 848 + poly (I:C) + LTA + manan – BAM
K	PBS

Myším byly i.t. podány terapeutické látky (A: R – 848 + poly (I:C) + LTA + manan - BAM, K: PBS) v množství 50 μ l/myš ve dny: 0, 1, 2... ..8, 9, 10... 16, 17, 18... ..24, 25, 26. Ve dny 0, 7, 15 a 23 bylo provedeno ELISA stanovení a byly změřeny objemy nádorů.

Melanomové buňky B16-F10 v RPMI byly den předem usmrceny pomocí UV zářiče (v Petriho misce byly umístěny přibližně 20 cm od zářiče na 1 hodinu). Den poté byly buňky spočítány a v množství 150 000/jamku byly přeneseny do 24 jamkového panelu. Byly použity sleziny 3 myši léčených a 3 neléčených, které byly sterilně odebrány. Dále byly převedeny přes filtr (70 μ M, BD Biosciences, USA) a tato buněčná suspenze byla centrifugována (10 min/160 g/4°C). Následovala lýza erytrocytů jedním ml 0,84% NH₄Cl (37°C), které působilo 2 – 3 minuty. Lýza erytrocytů byla zastavena 10 ml média RPMI s 10% FCS.

Buňky byly opět centrifugovány (10 min/160 g/4°C). Splenocyty byly spočítány pomocí Bürkerovy komůrky a v 24 jamkovém panelu byly smíchány s melanomovými buňkami v poměru 150 000 B16-F10 ku 900 000 splenocytům. Celkový objem činil 1 ml.

Následně byl přimíchán Concanavalin A (v koncentraci 2,5 μ g/ml) do jamky pro pozitivní kontrolu. Concanavalin A jako mitogen stimuluje T – lymfocytární produkci IFN – γ . Tento 24 jamkový panel byl inkubován přibližně 1 hodinu v termostatu (5% CO₂, 37°C). Panel byl uložen do termostatu (5% CO₂, 37°C). Panel byl ponechán v termostatu 48 hodin a supernatanty byly zamrazeny v Ependorf zkumavkách při -80°C.

Supernatanty byly rozmrazeny v pokojové teplotě a následně proběhla analýza metodou ELISA. Při samotném extracelulárním stanovení metodou ELISA byl použit supersenzitivní kit IFN - γ ELISA (eBiosciences, USA) pro detekci IFN – γ . Byl dodržován postup dodávaný spolu s kitem.

Speciální 96 jamková ELISA destička s navázanou protilátkou proti IFN – γ byla dvakrát promyta 400 μ l Wash bufferu 1x ředěného deionizovanou vodou. Následně byla desítkovým ředěním připravena řada standardů (v duplikátu), jak lze pozorovat v Tab. IX. Do všech jamek se standardem bylo přidáno 100 μ l Calibrator Diluent (CD), ten sloužil i jako blank.

Tab. IX: Umístění a koncentrace standardů v destičce (kalibrační řada).

	1	2
A	Standard 1 40 pg/ml	Standard 1 40 pg/ml
B	Standard 2 20 pg/ml	Standard 2 20 pg/ml
C	Standard 3 10 pg/ml	Standard 3 10 pg/ml
D	Standard 4 5 pg/ml	Standard 4 5 pg/ml
E	Standard 5 2,5 pg/ml	Standard 5 2,5 pg/ml
F	Standard 6 1,25 pg/ml	Standard 6 1,25 pg/ml
G	Standard 7 0,63 pg/ml	Standard 7 0,63 pg/ml
H	Blank (100 μ l CD)	Blank (100 μ l CD)

Do jamek pro vzorky byl přidán Sample diluent (SD) v množství 80 μ l a následně samotné vzorky v množství 20 μ l. Do všech jamek bylo přidáno 50 μ l Biotin Conjugate. Destička byla pokryta adhezivním filmem a umístěna na třepačku na 2 hodiny (mírné třepání, pokojová teplota). Po uplynutí dvou hodin byl adhezivní film odstraněn a jamky byly 6x promyty 400 μ l Wash bufferu 1x ředěného deionizovanou vodou. Poté bylo do všech jamek přidáno 100 μ l Streptavidin - HRP (horse raddish peroxidase) a panel byl opět zakryt adhezivním filmem. Byl inkubován 1 hodinu na třepačce (pokojová teplota).

Po sejmutí adhezivního filmu byly jamky 6x promyty (400 μ l Wash buffer 1x ředěného deionizovanou vodou). Následně bylo přidáno 100 μ l TMB Substrate solution do všech jamek a panel byl inkubován 30 minut (pokojová teplota). Po tuto dobu byl pozorován vývoj zbarvení pro včasné zastavení reakce. Ve vhodný čas byla reakce zastavena přidáním 100 μ l Stop Solution (každá jamka) a analyzována na ELISA readeru (SYNERGY H1 microplate reader; BIOTEK). Vzorky byly měřeny při vlnové délce 450 nm. Absorbance vzorků byly měřeny v duplikátu. Při vyhodnocení byl vypočten průměr naměřených absorbancí, od kterého byla odečtena hodnota absorbance naměřená u blanku.

Pro výpočet absorbancí byla stanovena kalibrační křivka z koncentrací standardů. Poté byla pomocí MS Excel vytvořena rovnice přímky, z níž byly določteny zbývající koncentrace IFN – γ všech vzorků. Byl vypočten koeficient variace (C. V.) a vzorky s vyšším C. V. než 20, byly vyřazeny. Stejně tak byly vyřazeny vzorky se zápornou hodnotou koncentrace a podle něj byly vyřazeny vzorky, které měly koeficient variance

(C. V.) vyšší než 20. Takto vypočtené koncentrace byly převedeny na 1 mm³ nádoru. Výsledná koncentrace byla stanovena v jednotkách pg/mm³.

4.9.7. Posouzení vlivu anti PD – 1 na účinnost terapie směsí R – 848, poly (I:C), LTA a mananu – BAM. Myší model pankreatického adenokarcinomu.

V tomto experimentu bylo použito 24 myších osmitýdenních samic z chovu Charles River Laboratories. Následně byla provedena transplantace pankreatického adenokarcinomu Panc02. 12. den od transplantace byly myši rozděleny do čtyř skupin, jak je znázorněno v Tab. X.

Tab. X: Randomizace myší podle typu terapie.

SKUPINA	TERAPEUTICKÁ LÁTKA
A	R – 848 + poly (I:C) + LTA + manan – BAM
B	anti PD – 1
C	R – 848 + poly (I:C) + LTA + manan – BAM + anti PD – 1
K	PBS

Směsi terapeutických léčiv (A: R – 848 + poly (I:C) + LTA + manan – BAM, B: anti PD – 1, C: R – 848 + poly (I:C) + LTA + manan – BAM + anti PD – 1, K: PBS) byly injikovány i.t. v dávce 50 µl/myš ve dny: 0, 1, 2... ..8, 9, 10... ..16, 17, 18... ..24, 25, 26. Dále byly kaliperem každý druhý den měřeny rozměry nádorů a z nich vypočten nádorový objem až do 30. dne. Následně bylo provedeno sledování přežití myší do 110. dne. Pokus byl 110. den ukončen a myši byly zabity stržením vazů.

4.9.8. Účinek R – 848, poly (I:C), LTA, mananu kotveného BAM, protilátky anti CD40 a jejich kombinace na redukci růstu pankreatického adenokarcinomu u myší C57BL/6

Pro vypracování tohoto experimentu bylo třeba 22 osmitýdenních myší z chovu Charles River Laboratories (samice, C57BL/6). Byl jim transplantován adenopankreatický karcinom Panc02 s.c. na pravý bok. Po dvanáctidenním růstu nádorů byly myši randomizačně rozděleny do skupin, dle následující tabulky (Tab. XI).

Tab. XI: Randomizace myší do skupin dle terapeutických směsí.

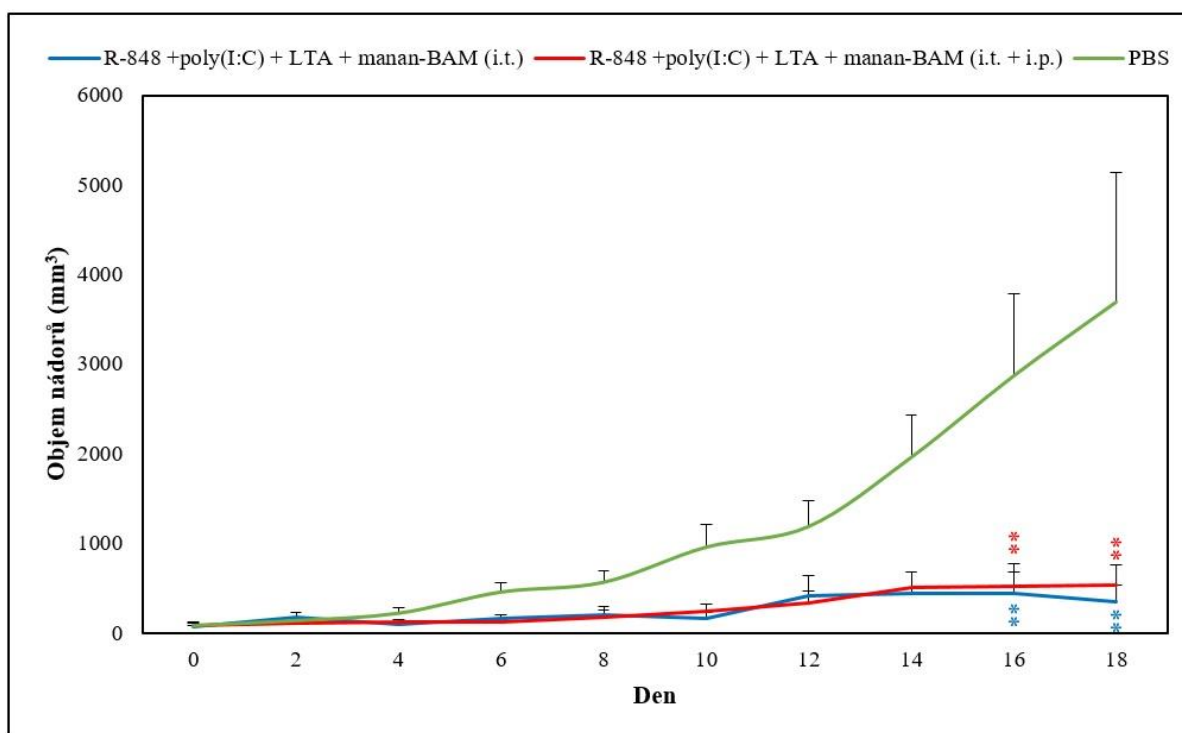
SKUPINA	TERAPEUTICKÁ LÁTKA
A	R – 848 + poly (I:C) + LTA + manan - BAM
B	anti CD40
C	R – 848 + poly (I:C) + LTA + manan – BAM + anti CD40
K	PBS

Směsi terapeutických látek (A: R – 848 + poly (I:C) + LTA + manan – BAM, B: anti CD40, C: R – 848 + poly (I:C) + LTA + manan – BAM + anti CD40, K: PBS) byly myším injikovány v dávce 50 μ l/myš ve dny: 0, 1, 2... ..8, 9, 10... ..16, 17, 18... ..24, 25, 26. Rozměry nádorů byly měřeny každý druhý den kaliperem až do 30. dne. Do 110. dne byl pozorován úhyn myši. Přeživším myším byl znovu 120. den transplantován pankreatický adenokarcinom Panc02 v množství 4×10^5 buněk/myš. Následně byla provedena transplantace melanomu B16-F10 v množství 4×10^5 164. den.

5. VÝSLEDKY

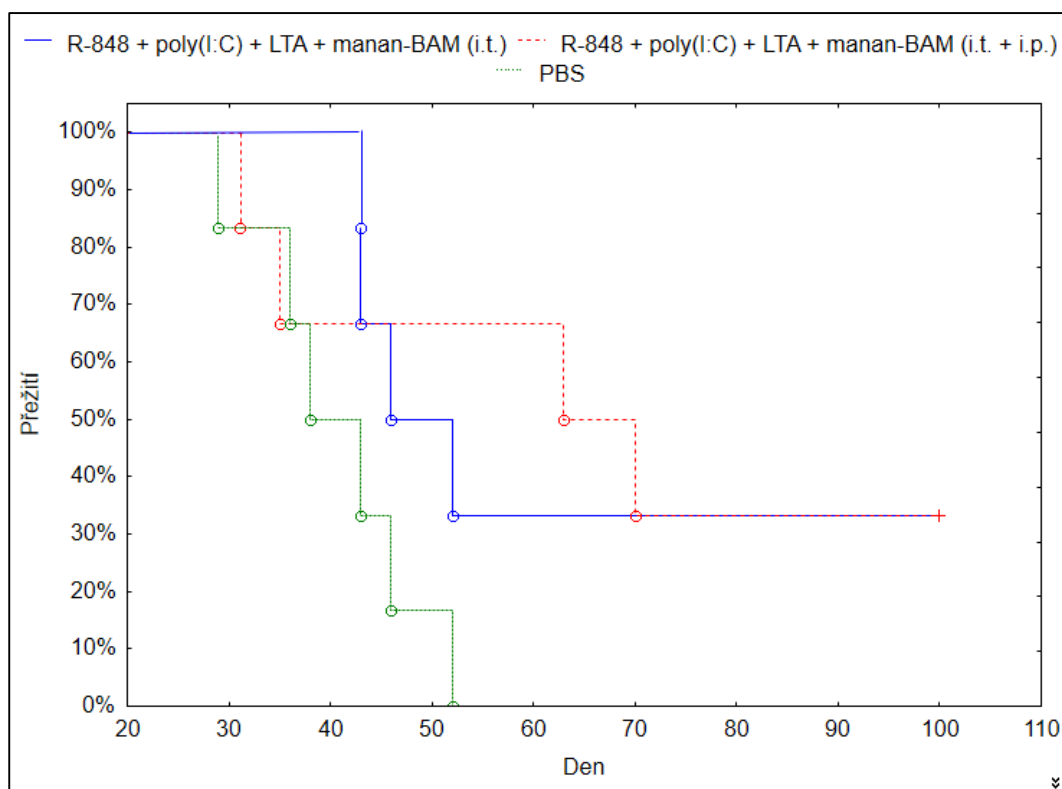
5.1. Účinek terapeutické směsi R - 848, poly (I:C), LTA a mananu kotveného BAM (pulzní aplikace) s perorálním přidáním této směsi na redukci růstu melanomu u myši C57BL/6.

Graf na Obr. 3 ukazuje vliv terapie R – 848, poly (I:C), LTA a mananu kotveného BAM podávaného pouze i.t. (modrá křivka) v porovnání se stejnou terapeutickou směsí podávanou i.p. a p.os. na redukci nádorového růstu u melanomu (červená křivka). Z tohoto grafu je patrné, že kombinovaná (lokální + systémová) terapie, tj. podání terapeutické směsi i.t. i i.p. prokazatelně nevedla ke zlepšení stávající terapie podávané pouze i.t.



Obr. 3: Porovnání terapie R – 848, poly (I:C), LTA, mananu kotveného BAM podávané pouze i.t. a podávané jak i.t., tak i.p. z hlediska redukce nádorového růstu melanomu. ** $P \leq 0,01$ vztaženo ke skupině PBS

Na Obr. 4 si můžeme povšimnout grafu přežívání (Kaplan – Meier) 100 dní. I zde lze pozorovat, že kombinovaná terapie R – 848, poly (I:C), LTA a manan – BAM podávaná i.t. i i.p. (červená křivka) nevedla k statisticky významnému zlepšení terapie podávané pouze i.t. R – 848, poly (I:C), LTA a manan – BAM (modrá křivka).

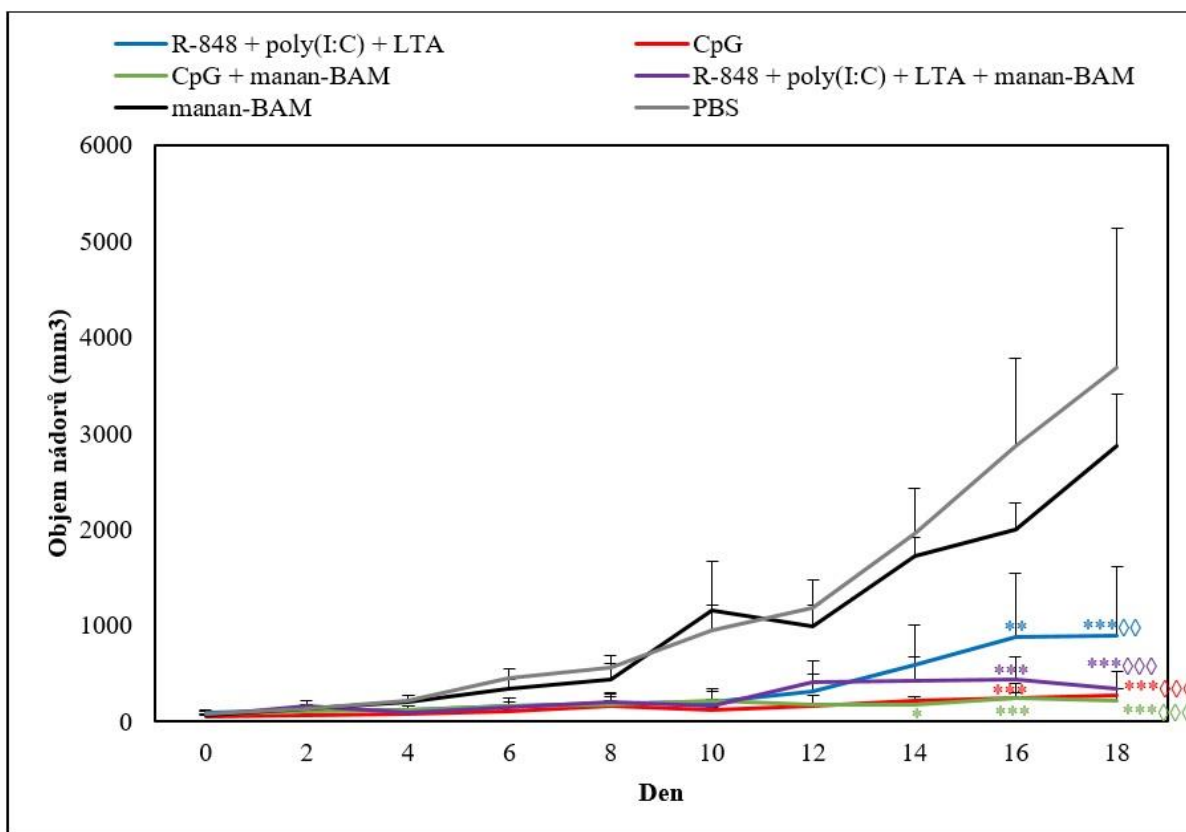


Obr. 4: Křivka přežívání (Kaplan – Meier) 100 dní.

5.2. Pozorování účinku CpG, tří TLR agonistů, mananu kotveného BAM a jejich kombinací na redukci růstu melanomu u myši C57BL/6.

CpG funguje jako náhrada tří TLR agonistů: R – 848, poly (I:C) a LTA. V grafu na Obr. 5 lze pozorovat, že účinek samotného CpG (červená křivka) na redukci nádorového růstu melanomů byl statisticky nevýznamně větší, než u tří TLR agonistů: R - 848 + poly (I:C) + LTA (modrá křivka). Ovšem CpG s mananem kotveným BAM (zelená křivka) přineslo srovnatelné výsledky, jako R – 848 + poly (I:C) + LTA s mananem kotveným BAM (fialová křivka).

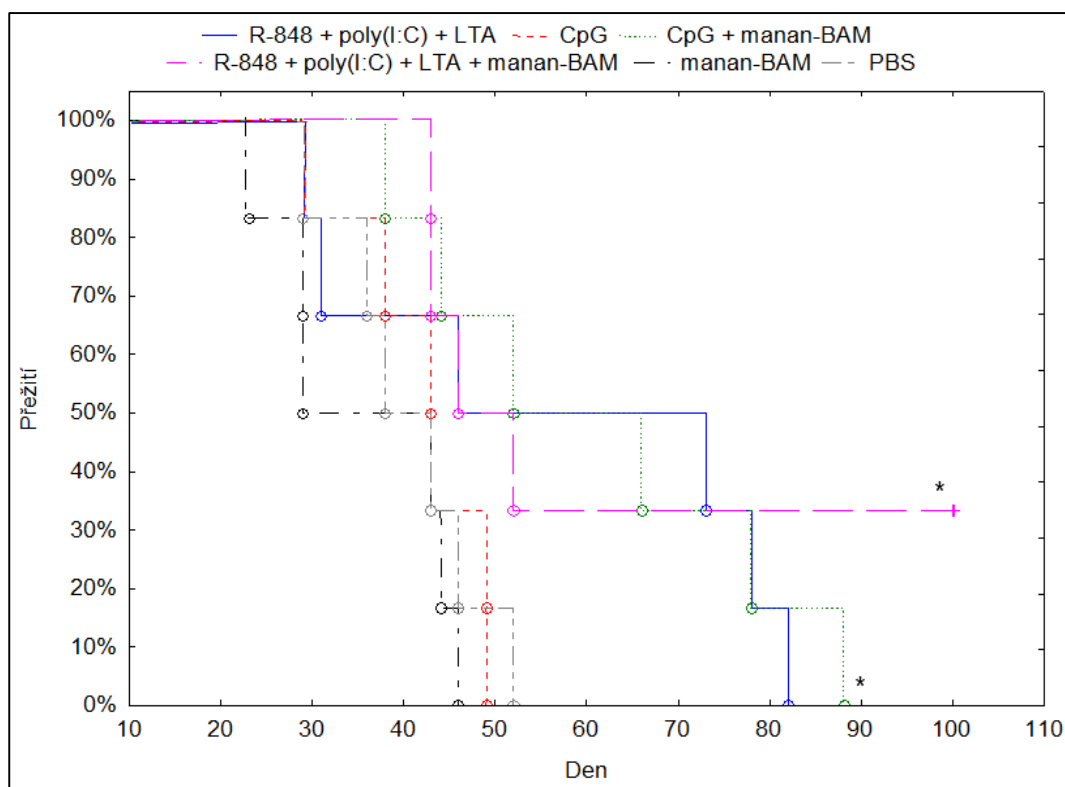
Dále můžeme v grafu (Obr. 5) pozorovat účinek mananu – BAM (černá křivka), jehož terapeutický účinek je ve srovnání s kontrolní skupinou (šedá křivka) nevýznamný.



Obr. 5: Srovnání terapie tří TLR agonistů (R – 848 + poly (I:C) + LTA) se samotným CpG a zároveň srovnání CpG + manan – BAM s R – 848 + poly (I:C) + LTA + manan – BAM. $\diamond\diamond P \leq 0,01$ vztaženo ke skupině manan-BAM, $\diamond\diamond\diamond P \leq 0,001$ vztaženo ke skupině manan-BAM, * $P \leq 0,05$ vztaženo ke skupině PBS, ** $P \leq 0,01$ vztaženo ke skupině PBS, *** $P \leq 0,001$ vztaženo ke skupině PBS

Na Obr. 6 je znázorněna křivka přežití (Kaplan – Meier) 100 dní. Ačkoliv mělo samotné CpG lepší účinek než kombinace tří TLR agonistů v redukci objemu nádorů, u přežívání je tento účinek opačný. Ve skupině léčené samotným CpG (červená křivka) se žádný jedinec nedožil 50 dne. Naopak ve skupině, kde CpG nahrazovali tři TLR agonisté R – 848 + poly (I:C) + LTA (modrá křivka) došlo k prodloužení této doby na 82 dní.

Stejně výsledky vykazuje i porovnání CpG v kombinaci s manan – BAM (zelená křivka) a R – 848 + poly (I:C) + LTA s manan – BAM (fialová křivka). Při terapii, kde byly použity tři TLR agonisté R – 848 + poly (I:C) + LTA (zelená křivka) bylo dosaženo 33% přežití do stého dne, ale ve skupině CpG s manan – BAM (zelená křivka) se žádný jedinec nedožil 88 dne, jak lze pozorovat na Obr. 6.



Obr. 6: Křivky přežití (Kaplan – Meier) 100 dní.

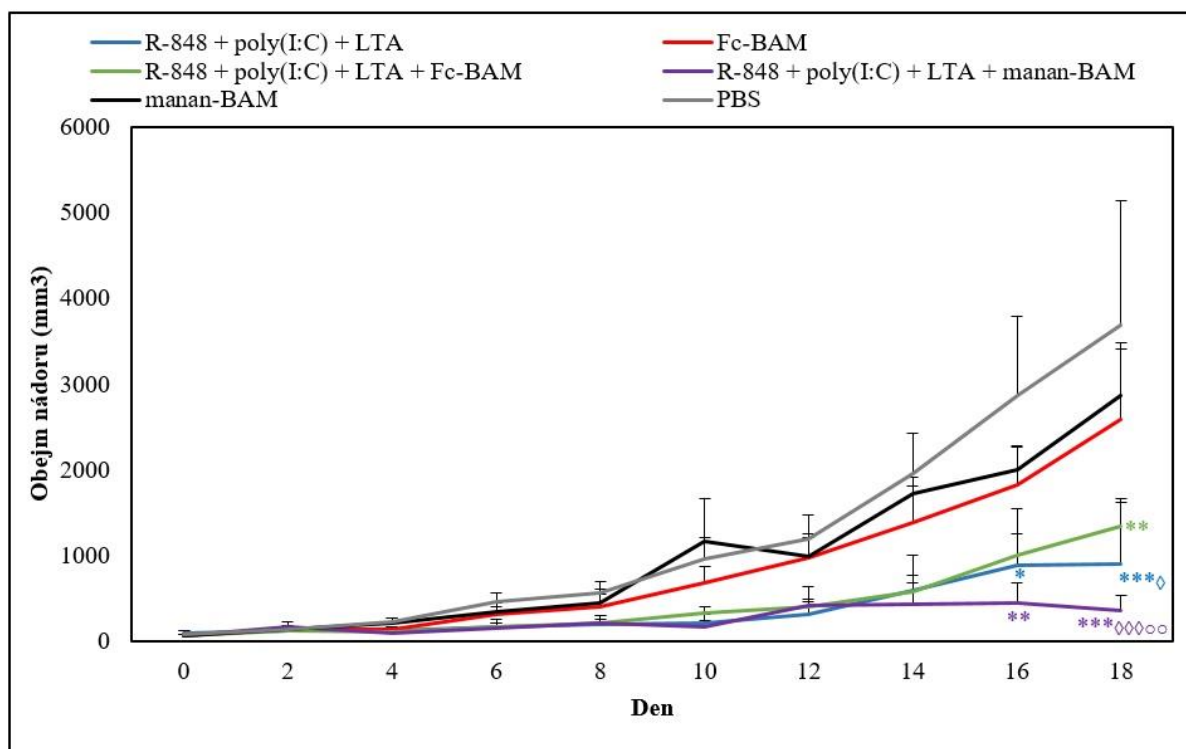
* $P \leq 0,05$ vztaženo ke skupině manan-BAM

5.3. Účinek R – 848, poly (I:C), LTA a Fc – fragmentu kotveného BAM (pulzní aplikace) na redukci růstu melanomu u myši C57BL/6.

Na Obr. 7 můžeme sledovat účinek terapie R – 848 + poly (I:C) + LTA + Fc – fragmentu kotveného BAM a jejich kombinací na redukci nádorového růstu melanomu. V tomto experimentu byl použit samotný Fc - fragment protilátek kotvený BAM, který nahrazoval manan – BAM. Účinek Fc – BAM samotného můžeme pozorovat na Obr. 7, kde si můžeme povšimnout, že stejně jako manan – BAM (černá křivka), Fc – BAM (červená křivka) nedosáhla téměř žádného terapeutického efektu.

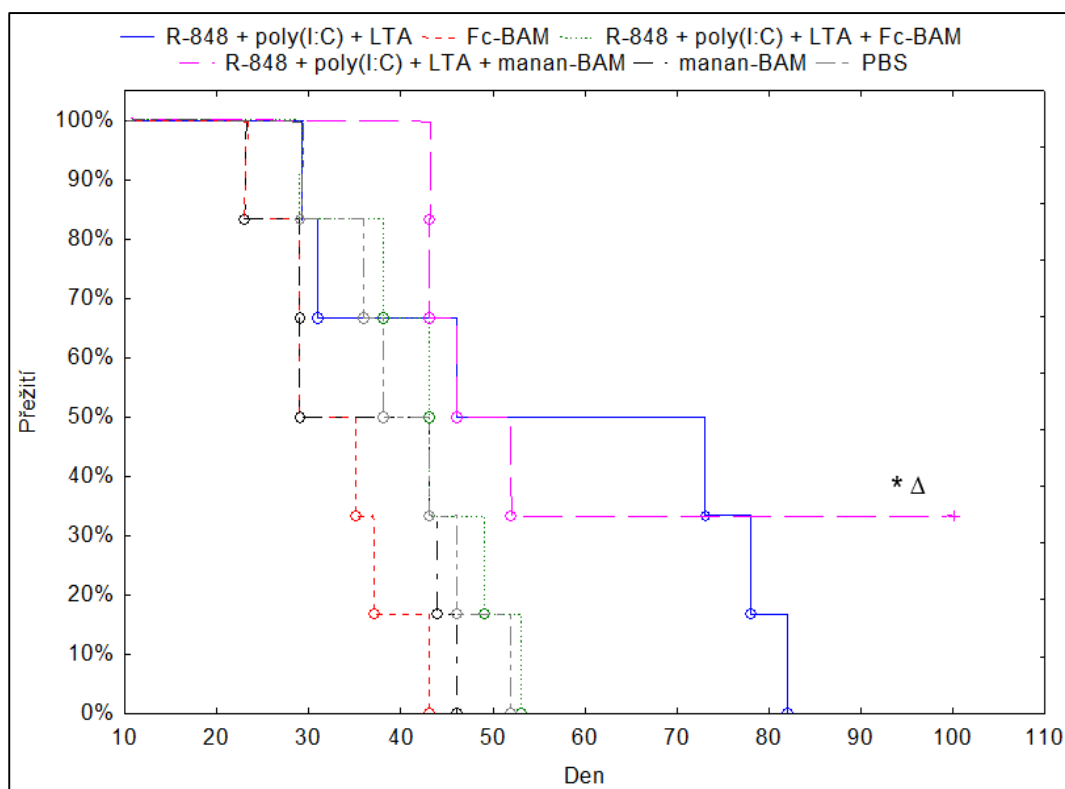
Fc – BAM v kombinaci s R – 848, poly (I:C) a LTA (zelená křivka) dosáhlo silnější redukce nádorového růstu než Fc – BAM samotné (červená křivka), ale v porovnání s terapií R – 848 + poly (I:C) + LTA + manan – BAM (fialová křivka) dosáhlo slabších výsledků, jak je patrné z grafu (Obr. 7).

Terapie kombinací tří TLR agonistů R – 848 + poly (I:C) + LTA (modrá křivka) vedla k signifikantně významné redukci nádorové hmoty v porovnání se skupinou PBS (šedá křivka) a manan – BAM (černá křivka).



Obr. 7: Vliv terapie R – 848, poly (I:C), LTA, Fc – BAM a jejich kombinací na redukci nádorového růstu melanomu. ○○ $P \leq 0,01$ vztaženo ke skupině Fc-BAM, ◇ $P \leq 0,05$ vztaženo ke skupině manan-BAM, ◇◇◇ $P \leq 0,001$ vztaženo ke skupině manan-BAM, * $P \leq 0,05$ vztaženo ke skupině PBS, ** $P \leq 0,01$ vztaženo ke skupině PBS, *** $P \leq 0,001$ vztaženo ke skupině PBS

Na Obr. 8 je znázorněna křivka přežití (Kaplan – Meier) 100 dní. Můžeme si povšimnout, že terapie pomocí Fc – BAM (červená křivka) ani kombinace se třemi TLR agonisty (modrá křivka) nedosáhla signifikantního vylepšení redukce nádorového růstu. Nejlepšího účinku dosáhla terapie R – 848 + poly (I:C) + LTA + manan - BAM (fialová křivka), která dosáhla statisticky významné redukce nádorového růstu vůči skupinám manan - BAM (černá křivka) a Fc – BAM (červená křivka).

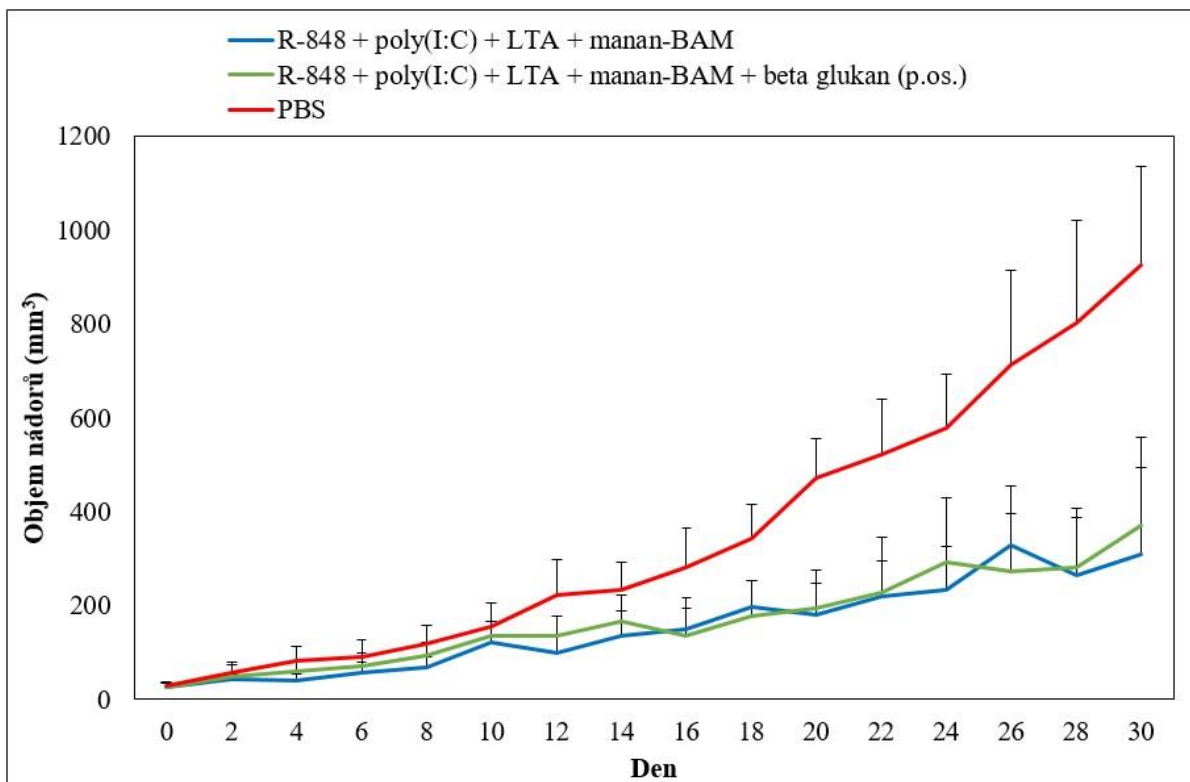


Obr. 8: Křivka přežívání (Kaplan – Meier) 100 dní.

* $P \leq 0,05$ vztaženo ke skupině Fc-BAM, $\Delta P \leq 0,05$ vztaženo ke skupině manan - BAM

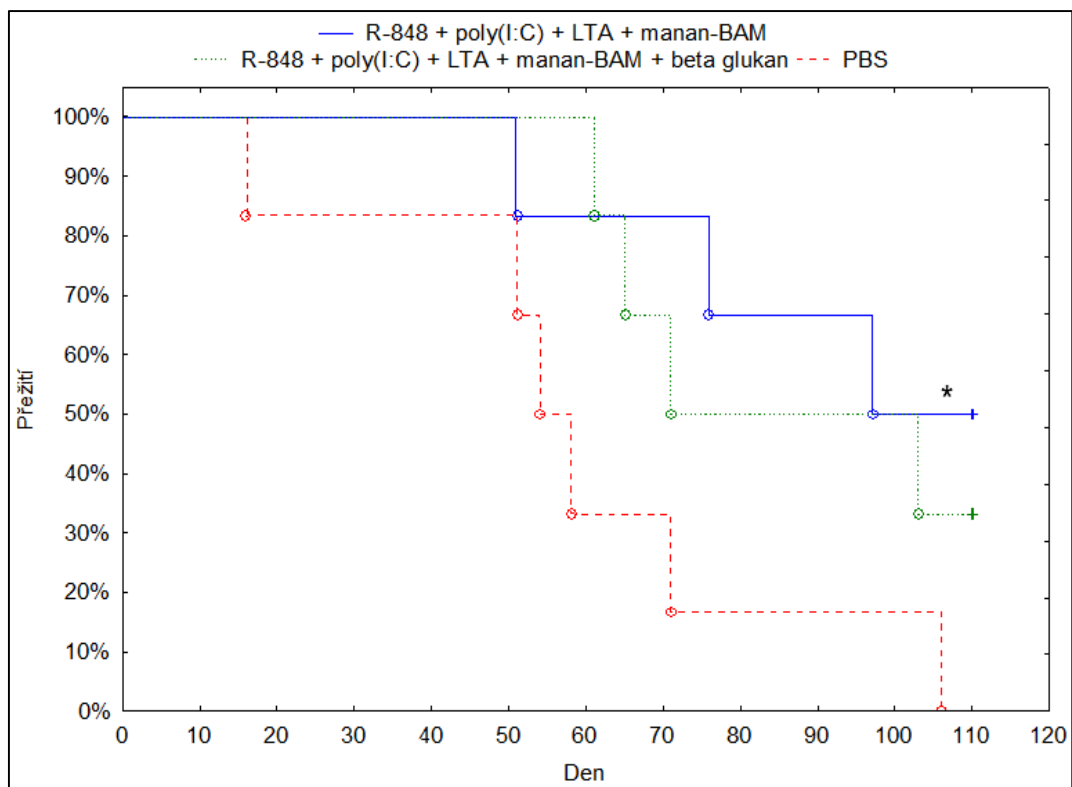
5.4. Studium vlivu přidání perorálně aplikovaného beta glukanu k terapii založené na použití R – 848, poly (I:C), LTA a mananu kotveného BAM na růst pankreatického adenokarcinomu u myši C57BL/6

Obr. 9 znázorňuje nádorovou terapii R – 848 + poly (I:C) + LTA + manan – BAM s perorálním přidáním beta glukanu (zelená křivka). Terapie s perorálním přidáním beta glukanu nepřinesla žádné významné vylepšení terapie stávající – R – 848 + poly (I:C) + LTA + manan – BAM (modrá křivka).



Obr. 9: Vliv terapie R – 848 + poly (I:C) + LTA + manan – BAM s perorálním přidáním beta glukanu na redukci nádorového růstu pankreatického adenokarcinomu.

Na Obr. 10 můžeme pozorovat křivky přežívání (Kaplan – Meier) 110 dní. Perorální přidání beta glukanu (zelená křivka) nemělo žádný signifikantní vliv na přežití. Terapie R - 848 + poly (I:C) + LTA + manan – BAM (modrá křivka) signifikantně prodlužuje přežití vůči kontrolní skupině PBS (červená křivka).



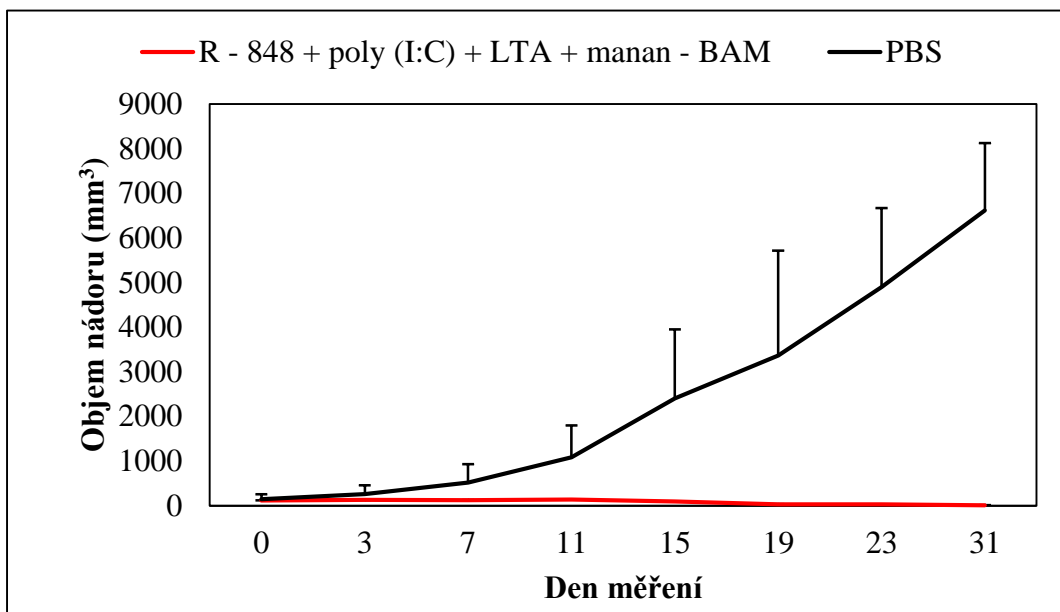
Obr. 10: Křivka přežití (Kaplan – Meier) 110 dní.

* $P \leq 0,05$ vztaženo ke skupině PBS

5.5. Stanovení IFN – γ pomocí průtokové cytometrie (intracelulární stanovení) v reakci splenocytů na nádorový antigen u myši C57BL/6.

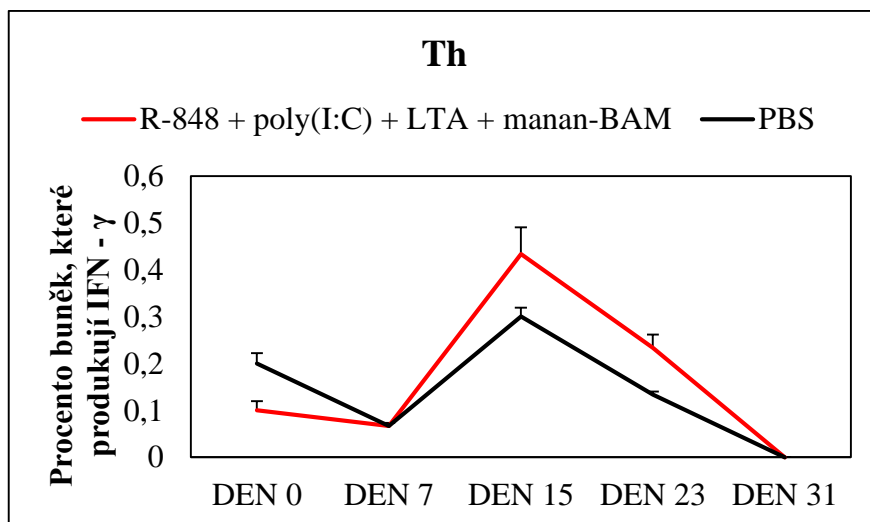
V tomto experimentu byla dekována hladina IFN – γ jako prozánětlivého markeru na průtokovém cytometru. Byla stanovována intracelulární produkce IFN – γ v procentech. Tato produkce byla rozlišena na Th a Tc produkci.

Před každým stanovením IFN – γ byl změřen objem nádorů, ten je uveden na obrázku Obr. 11.



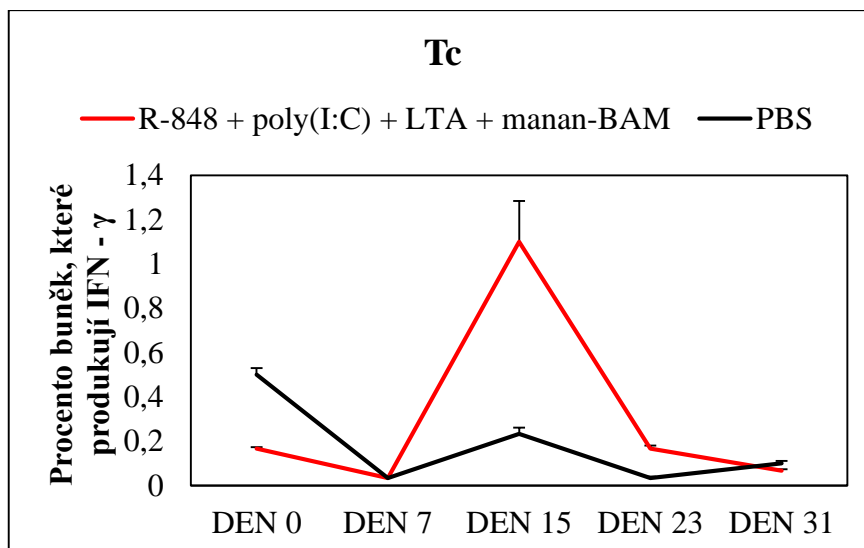
Obr. 11: Vliv terapie R – 848 + poly (I:C) + LTA + manan – BAM na redukci nádorového růstu melanomu B16-F10.

Na Obr. 12 si můžeme povšimnout grafu, který udává produkci IFN – γ Th – lymfocyty. Můžeme vidět, že u léčené skupiny (R – 848 + poly (I:C) + LTA + manan – BAM) je nejsilnější produkce přibližně 0,5% a to patnáctý den a také 0,3% 23. den (červená křivka).



Obr. 12: Produkce IFN – γ Th – lymfocyty při terapii R – 848 + poly (I:C) + LTA + manan - BAM.

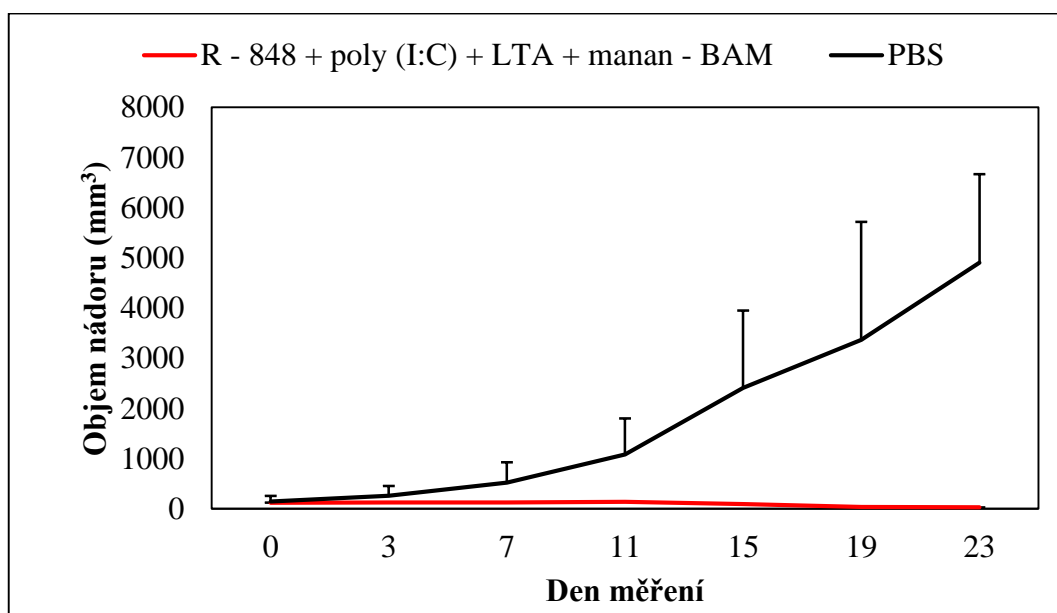
Na Obr. 13 nalezneme Tc produkci IFN – γ . Lze pozorovat, že nejsilnější produkce IFN – γ bylo dosaženo 15. den, kdy byla produkce u léčené skupiny (R – 848 + poly (I:C) + LTA + manan – BAM) v hladině 1% (červená křivka).



Obr. 13: Produkce IFN - γ Tc - lymfocyty při terapii R - 848 + poly (I:C) + LTA + manan - BAM.

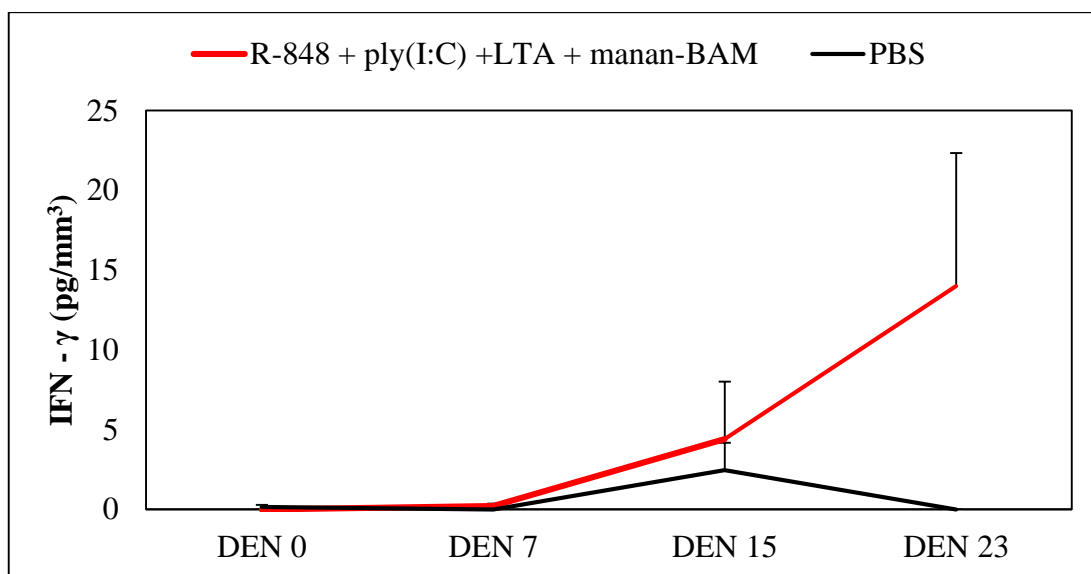
5.6. Stanovení IFN - γ metodou ELISA (extracelulární stanovení) v reakci splenocytů na nádorový antigen u myši C57BL/6.

Stanovení IFN - γ metodou ELISA (supersenzitivní kit) je velmi citlivá metoda, která stanovuje IFN - γ s citlivostí v pg/mm^3 . Jedná se o extracelulární stanovení. Ve dny 0, 7, 15 a 23 byly změřeny rozměry nádorů a vypočten jejich objem, jak je vidět na Obr. 14.



Obr. 14: Vliv terapie R - 848 + poly (I:C) + LTA + manan - BAM na redukci melanomu.

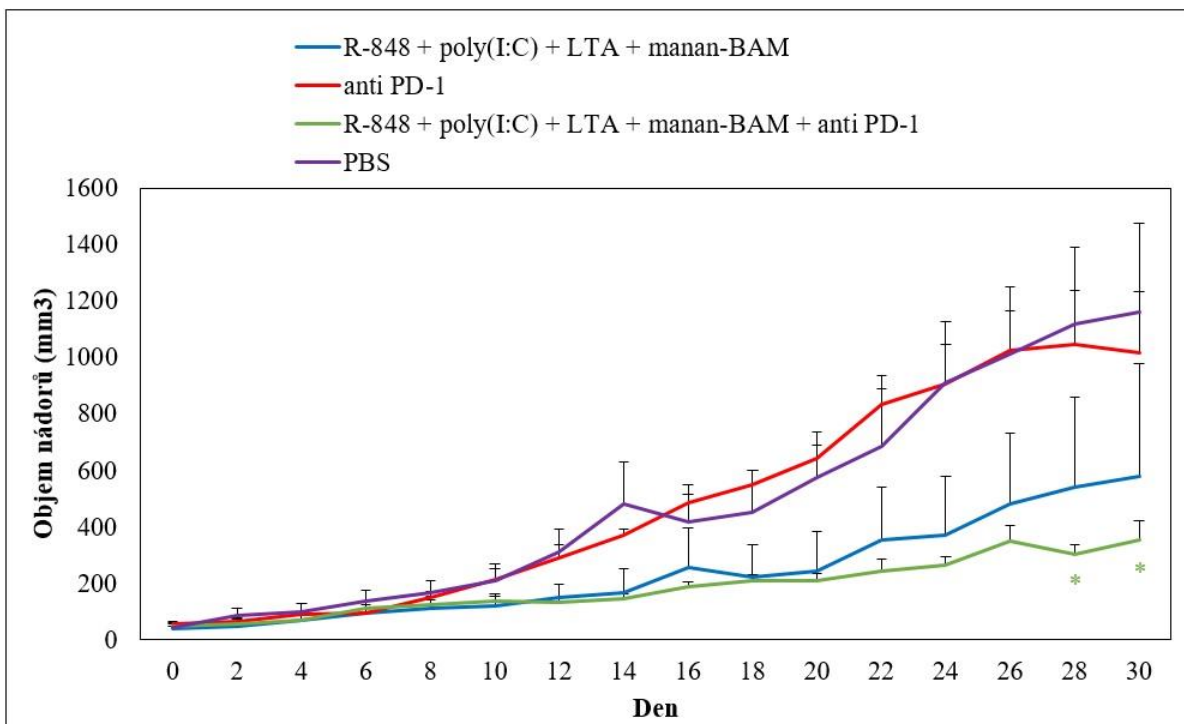
Na Obr. 15 si můžeme povšimnout stanovení IFN – γ při terapii R – 848 + poly (I:C) + LTA + manan - BAM (červená křivka). Největší množství IFN – γ bylo detekováno 23. den a to v množství přibližně 15 pg/mm³ a 15. den v množství asi 5 pg/ml u léčené skupiny terapií R - 848 + poly (I:C) + LTA + manan – BAM (červená křivka).



Obr. 15: Stanovení extracelulárního IFN – γ v množství pg/mm³.

5.7. Posouzení vlivu anti PD-1 na účinnost terapie směsí R – 848, poly (I:C), LTA a mananu - BAM. Myší model pankreatického adenokarcinomu.

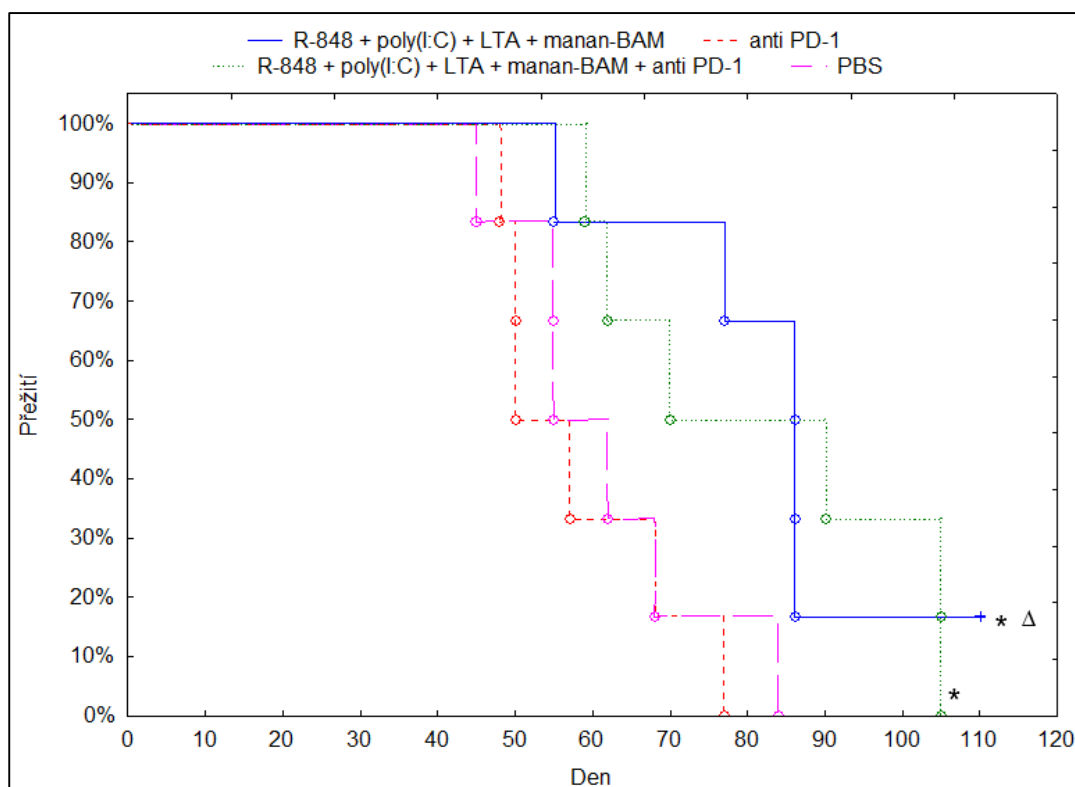
Na Obr. 16 pozorujeme účinky terapie R – 848 + poly (I:C) + LTA + manan – BAM v kombinaci s anti PD – 1. Jak je z grafu patrné, terapie samotným anti PD – 1 (červená křivka) nezvýšilo redukci nádorového růstu. Anti PD – 1 v kombinaci s terapií R – 848 + poly (I:C) + LTA + manan – BAM (zelená křivka) dosáhlo signifikantního snížení nádorového růstu vůči kontrolní skupině PBS (fialová křivka) a zároveň srovnatelné redukce nádorového růstu s terapií R – 848 + poly (I:C) + LTA + manan – BAM (modrá křivka).



Obr. 16: Pozorování účinku terapie R – 848 + poly (I:C) + LTA + manan – BAM v kombinaci s anti PD – 1. * $P \leq 0,05$ vztaženo ke skupině PBS

Obr. 17 znázorňuje křivku přežití (Kaplan – Meier) 110 dní. Anti PD – 1 nevykazuje žádný léčebný efekt (červená křivka), ve srovnání s kontrolní skupinou (fialová křivka). R - 848 + poly (I:C) + LTA + manan – BAM (modrá křivka) vykazuje signifikantní terapeutický efekt ve srovnání s kontrolní skupinou PBS (fialová křivka) a anti PD – 1 (červená křivka).

Přídavek anti PD – 1 ke směsi R – 848 + poly (I:C) + LTA + manan - BAM neměl na prodloužení přežití vliv (zelená křivka).

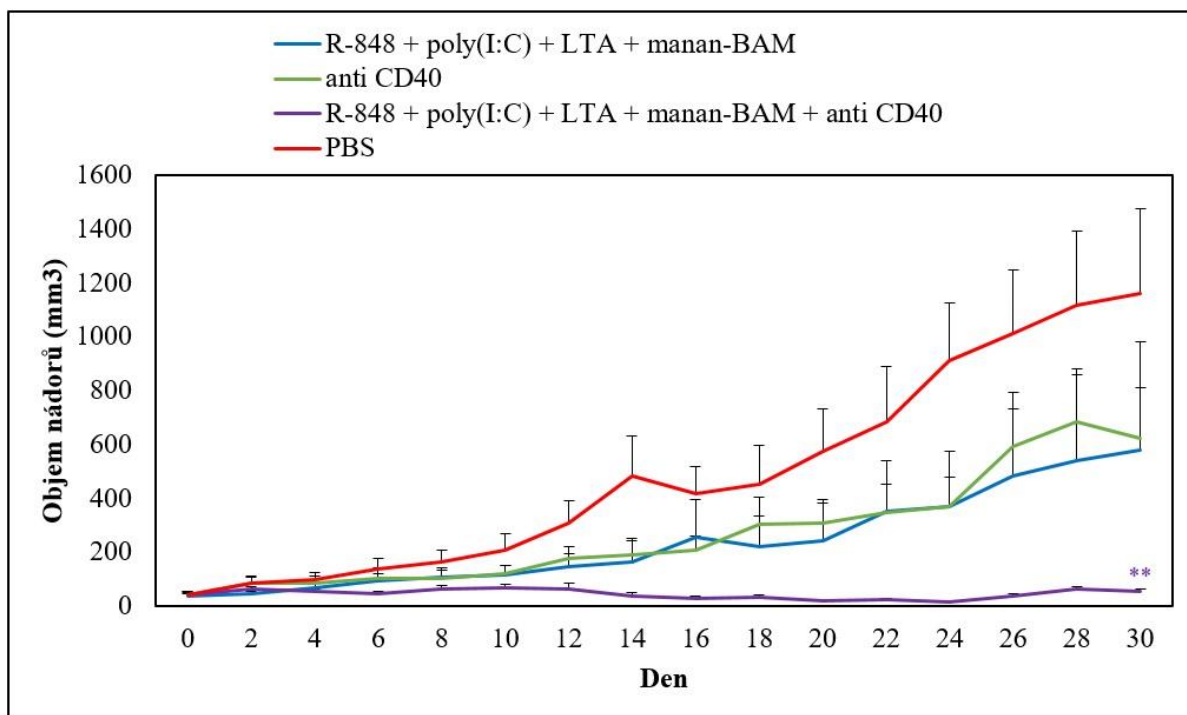


Obr. 17: Křivka přežívání (Kaplan – Meier) 110 dní.

* $P \leq 0,05$ vztaženo ke skupině anti PD-1, $\Delta P \leq 0,05$ vztaženo ke skupině PBS

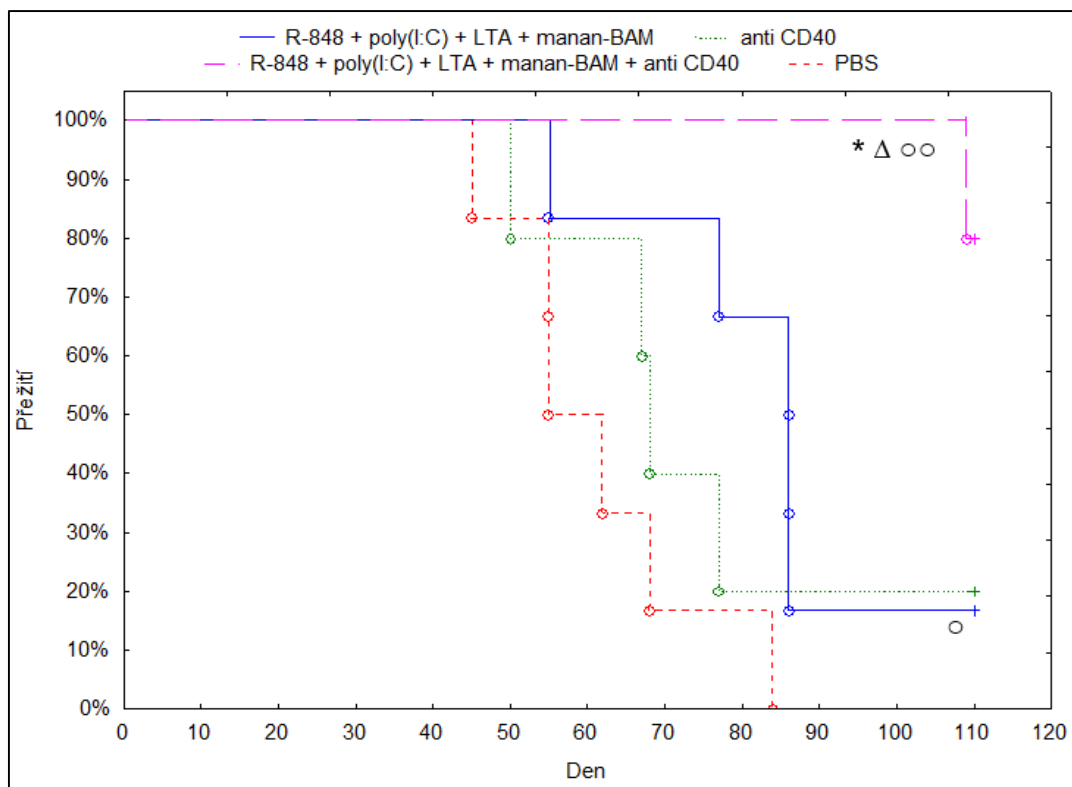
5.8. Účinek R – 848, poly (I:C), LTA, mananu kotveného BAM, protilátky anti CD40 a jejich kombinace na redukci růstu pankreatického adenokarcinomu u myši C57BL/6.

Obr. 18 ukazuje vliv anti CD40 na nádorovou redukci. Využití samotného anti CD40 (zelená křivka) pro nádorovou imunoterapii vykazuje podobný efekt jako terapie R - 848 + poly (I:C) + LTA + manan – BAM (modrá křivka). Výrazného terapeutického efektu bylo dosaženo u terapie R – 848 + poly (I:C) + LTA + manan – BAM + anti CD40 (fialová křivka), kdy došlo k signifikantně větší nádorové redukci adenopankreatického nádoru vůči kontrolní skupině PBS (červená křivka).



Obr. 18: Vliv terapie R – 848 + poly (I:C) + LTA + manan – BAM + anti CD40 na redukci nádorového růstu pankreatického adenokarcinomu. * $P \leq 0,05$ vztaženo ke skupině PBS, ** $P \leq 0,01$ vztaženo ke skupině PBS, *** $P \leq 0,001$ vztaženo ke skupině PBS

Graf přežití (Kaplan – Meier) 110 dní nalezneme na Obr. 19. Můžeme zde pozorovat velký úspěch terapie R – 848 + poly (I:C) + LTA + manan – BAM + anti CD40 (fialová křivka), kde bylo dosaženo 80% přežití signifikantního vůči všem ostatním skupinám. Úspěšná je také terapie základní R – 848 + poly (I:C) + LTA + manan – BAM (modrá křivka), signifikantní vůči kontrolní skupině PBS (červená křivka).



Obr. 19: Křivka přežívání (Kaplan – Meier) 110 dní.

* $P \leq 0,05$ vztaženo ke skupině R-848 + poly (I:C) + LTA + manan-BAM, Δ $P \leq 0,05$ vztaženo ke skupině anti CD40, \circ $P \leq 0,05$ vztaženo ke skupině PBS, $\circ\circ$ $P \leq 0,01$ vztaženo ke skupině PBS

Dále byla provedena retransplantace pankreatického adenokarcinomu Panc02 120. den. Nádory myši neinfikovaly a nedošlo k uchycení nádorů. Proto byla retransplantace opakována s melanomovými buňkami B16-F10. Melanom se myším ujal a následkem nádorového onemocnění zemřely.

6. DISKUZE

Tato práce je součástí dlouhodobého výzkumu týmu RNDr. Jana Ženky, CSc. a doplňuje určité poznatky z oblasti nádorové imunoterapie založené na synergii TLR agonistů a ligandů stimulujících fagocytózu. Ačkoliv bylo u léčby melanomu B16-F10 s terapií založenou na této synergii (tj. terapie R - 848 + poly (I:C) + LTA + manan – BAM) dosaženo velmi kvalitních výsledků (Masáková, 2016), nelze se s nimi spokojit a je nutno stále tuto terapii vylepšovat. Především je toto vylepšení terapie nutné v případě adenopankreatického karcinomu.

Tímto se zabývá i první experiment této diplomové práce, který podává **terapeutickou látku systémově nejen i.t., ale i systémově (tj. i.p.) při terapii melanomu B16-F10**. Hlavním záměrem systémového podání terapeutik byla celková stimulace imunitního systému s rozvojem zánětu a vzestupem tělní teploty. Například v práci Maletzki a kol. (Maletzki a kol., 2013) bylo u 4 z pěti myší dosaženo remise pankreatického adenokarcinomu Panc02 kombinací více ligandů PRRs (TLRs, NLRs) s rozvojem zánětu a vzestupem tělní teploty myší průměrně o 1°C. Rozvoj zánětu spojený s horečkami je také dobrým prognostickým faktorem při léčbě osteosarkomu (Jeys, 2007). Tento efekt byl očekáván i při tzv. systémové imunoterapii (i.t. a i.p. aplikace terapeutik), ale bohužel ho nebylo dosaženo. Můžeme uvažovat, proč nebylo dosaženo tohoto výsledku, ale je to obtížně vysvětlitelné. Zdá se, že nádorová imunoterapie (R – 848 + poly (I:C) + LTA + manan – BAM) dosáhla svého terapeutického maxima a intraperitoneální aplikace pouze odvrátila pozornost imunitního systému od nádoru.

Mimo jiné byla v tomto experimentu použita pouze dvou pulzní terapie, ve snaze o snížení počtu injekčních pulzů při nádorové imunoterapii z důvodu zjednodušení terapie. Klasická čtyř pulzní terapie dosahuje až 83% přežití léčených myší (Masáková, 2016). Bohužel, dvou pulzní terapie byla zřejmě nedostačující, neboť se přežití stejně léčené skupiny (R – 848 + poly (I:C) + LTA + manan – BAM) snížilo a dosáhlo pouze 33%. Jako ideální se proto zdá být čtyř pulzní terapie.

V dalším experimentu byla posuzována **účinnost CpG při nádorové imunoterapii melanomu B16-F10**, v poslední době hojně užívaného imunoterapeutika, v kombinaci s naší terapeutickou směsí (R – 848 + poly (I:C) + LTA + manan – BAM). CpG (TLR9) bylo v rámci našeho výzkumu uvažováno jako náhrada tří TLR agonistů (tj. R – 848 + poly (I:C) + LTA) pro snížení možných nežádoucích účinků a zjednodušení terapie. Samotné CpG

mělo podobný účinek na redukci nádorové hmoty jako kombinace CpG + manan – BAM i kombinace R – 848 + poly (I:C) + LTA + manan - BAM. Rozdíl byl ovšem prokázán hlavně v přežívání, kdy ve skupině léčené terapií R - 848 + poly (I:C) + LTA + manan - BAM bylo dosaženo přežití 33% myši, ale ve skupině léčené CpG + manan – BAM se ani jedna myš nedožila 90. dne. Samotné CpG mělo nejmenší vliv na přežívání, v této skupině se ani jedna myš nedožila 50. dne.

Kombinace TLRs, jako například R – 848 a poly (I:C) vytváří synergistický vztah, který vede až k 50x vyšší produkci IL – 12, než jednotlivými složkami samostatně. Vznik IL - 12 stimuluje maturaci dendritických buněk a tím moduluje Th1 prostředí nádoru vhodné pro atak získané imunity (Napolitani a kol., 2005). Poly (I:C) stimuluje vznik CD – 80 a CD - 86 kostimulačních molekul, které jsou důležité pro fungování dendritických buněk při antigenní prezentaci naivním lymfocytům (Alli a Khar, 2002).

CpG také stimuluje vznik IL – 12, ale v menší míře a stimulace není tak masivní, jako kdyby bylo použito s dalším TLR agonistou a došlo k rozvoji synergie (Napolitani a kol., 2005). Vysvětlení nižší úspěšnosti CpG tak můžeme nalézt právě ve srovnání se synergistickým vztahem R - 848 a poly (I:C).

Další experiment se zabýval **využitím Fc – fragmentu - BAM při nádorové imunoterapii melanomu B16/F10**. Tento experiment vycházel z poznatků práce Primasové (Primasová, 2013). V této práci byla použita celá IgG protilátka vyizolovaná z myši kotvená SMCC v kombinaci s LPS, která měla pozitivní vliv na redukci melanomu B16-F10. V předkládané diplomové práci byl ale použit pouze samotný Fc – fragment. Hlavním záměrem této terapie bylo zopakování experimentu pouze s účinnou částí protilátky Fc - fragmentem kotveným na nádorové buňky kotvou BAM, pro zesílení terapeutického efektu.

Můžeme předpokládat, že hlavními mechanismy, které v případě zmíněné práce Primasové vyvolaly terapeutický účinek, byly: přímá opsonizace vyvolávající atak fagocytů (DC, neutrofilů a makrofágů), tedy ADP, dále ADCC vedoucí k apoptóze, ale i CDC, tedy aktivace komplementu klasickou cestou – opsonizace přes iC3b (Zhou a kol., 2017, Mamidi a kol., 2017, Ana-Sosa-Batiz a kol., 2014). Neúspěch terapie s použitím Fc si můžeme vysvětlovat tím, že se při vazbě Fc – fragmentu došlo ke sterickým zábranám a tedy omezení účinku Fc - fragmentu. V případě použití celých protilátek IgG byly tyto sterické zábrany zřejmě nižší.

Účinek terapie R – 848 + poly (I:C) + LTA + manan - BAM s perorálním přidáním beta glukanu na redukci pankreatického adenokarcinomu Panc02 byl pozorován v následujícím experimentu. Využitím beta glukanu navazují na svou bakalářskou práci, kde byl perorálně přidán ke kombinaci R – 848 + manan – SMCC (TCEP předchozí aplikace). Tato terapie vedla k výrazné redukci melanomů B16-F10 a přežití 50% myši z této skupiny. Beta glukán vede útok přes CR3 (iC3b) a stimuluje neutrofilů, makrofágů a NK buňky (Paďouková, 2016). Proto byl beta glukán použit i při terapii pankreatického adenokarcinomu Panc02.

Přidání beta glukanu k terapii R – 848 + poly (I:C) + LTA + manan - BAM v léčbě pankreatického adenokarcinomu Panc02 bohužel nedosáhlo takových výsledků jako u melanomu. Tento efekt můžeme vysvětlovat vlastnostmi samotných nádorů. U imunoterapie melanomu B16-F10 je větší podíl vrozené imunity, jak lze pozorovat z dynamiky (Paďouková, 2016). Naopak při terapii pankreatického adenokarcinomu je větší podíl získané imunity, což můžeme pozorovat z průběhu léčby pankreatického adenokarcinomu. Na rozdíl od léčby melanomu, kdy dochází k významné redukci nádorového růstu do 30. dne, významná redukce pankreatického adenokarcinomu je pozorovatelná až po ukončení pulzní terapie. Proto terapie beta glukánem podporuje spíše léčbu melanomu, neboť je cílena na imunitu vrozenou.

Vyhodnocení přenosu informace na získanou imunitu měřením reakce splenocytů na setkání s nádorovým antigenem detekcí vnitrobuněčné produkce IFN - γ pomocí průtokové cytometrie a stanovení ELISA. Intracelulární stanovení IFN – γ průtokovou cytometrií umožňuje rozlišení Th (CD4+) a Tc (CD8+) produkce (v procentech). Extracelulární ELISA stanovení IFN – γ naopak umožňuje přesnější stanovení množství tohoto interferonu.

Pro specifickou imunitu je nutná správná prezentace antigenu, kterou v naší terapii (R - 848 + poly (I:C) + LTA + manan – BAM) zajišťují zejména dendritické buňky a také makrofágy. Dále jsou nutné kostimulační molekuly CD80 a CD86, jejichž tvorbu stimuluje poly (I:C), nebo R - 848 (Napolitani a kol., 2005, Alli a Khar, 2002). A v neposlední řadě je nezbytný vznik správného mikroprostředí - navození Th1. To zajišťuje již zmíněná kombinace poly (I:C) a R – 848, která synergisticky stimuluje vznik IL – 12 nutného pro vznik Th1 prostředí (Napolitani a kol., 2005).

Th1 prostředí je prozánětlivé a protinádorové a vyznačuje se přítomností IL – 12 a IFN - γ . Th2 prostředí je naopak protizánětlivé (pronádorové) a vyznačuje se přítomností IL – 4 a IL – 10 (Bais a kol., 2007). Velké množství IL – 12 na počátku terapie zřejmě vedlo k dobré antigenní prezentaci projevující se tím, že zejména Tc – lymfocyty (CD8+), v menší míře i Th – lymfocyty (CD4+) reagují na antigen intracelulární produkcí IFN – γ . CD8+ reagují na antigen prezentovaný s MHC I. třídy, tyto komplexy jsou přirozeně přítomny na nádorových buňkách. Proto byla tato stanovovaná frakce detekována ve vyšším množství. Naopak CD4+ reagují na antigen prezentovaný MHC II. třídy (vyskytuje se např. u DCs, nebo makrofágů). Takovýto antigen není přirozeně na nádorových buňkách. Při tomto stanovení byly smíseny splenocyty s usmrčenými nádorovými buňkami. Dostatečná doba inkubace umožnila přítomným dendritickým buňkám a makrofágům prezentaci nádorových antigenů nezbytnou pro CD4+ intracelulární tvorbu IFN – γ .

Samotná přítomnost IFN – γ 15. a 23. den terapie je důkazem zapojení specifické imunity. Poměr IFN – γ : IL – 10 určuje typ prostředí (Th1:Th2). Tento poměr byl stanovován v práci Krejčové (Krejčová, 2016) při použití podobné terapeutické směsi aktivující tytéž TLR receptory (*Listeria monocytogenes* + R – 848 + mannan - SMCC + poly (I:C)) a tento poměr byl již od třetího dne velmi vysoký. Převládalo zde tedy Th1 prostředí.

Předmětem dalšího experimentu bylo **pozorování účinku anti PD – 1 při nádorové imunoterapii pankreatického adenokarcinomu Panc02**. Tento experiment porovnával úspěšnou terapii směsí R – 848 + poly (I:C) + LTA + mannan - BAM + anti PD – 1, která vedla k signifikantnímu snížení objemů melanomu B16-F10 (Nedbalová, 2017). Tento experiment se zaměřil na využití pankreatického adenokarcinomu Panc02 při stejné terapii. Lidský pankreatický adenokarcinom patří do skupiny nádorů, které mají nižší expresi PD - L1, stejně jako například kolorektální karcinom (Brahmer a kol., 2012). Dle výsledků této diplomové práce, lze předpokládat, že i u myši varianty pankreatického adenokarcinomu Panc02 je tato exprese také nižší, proto není tento negativní výsledek tak překvapující.

V posledním experimentu této práce byl studován **účinek anti CD40 při imunoterapii pankreatického adenokarcinomu Panc02**. Použitá anti CD40 protilátka působí agonisticky, podporuje rozvoj vrozené i získané imunity a působí protinádorově. Bylo prokázáno, že snižuje denzitu pankreatického adenokarcinomu a inhibuje nádorový růst, což je přičítáno její schopností aktivovat fagocytární aktivitu makrofágů (Vonderheide a kol., 2013).

Pro získanou imunitu je anti CD40 protilátka důležitá také proto, že je zodpovědná za maturaci dendritických buněk a jejich „licensing“ pro cross - prezentaci antigenů CTL (Stone a kol., 2009, Vonderheide a kol., 2013). Velmi důležitým momentem je to, že anti CD40 v synergii s R-848 a poly (I:C) vytváří podmínky pro tvorbu paměťových buněk z CTL. Intermediátem této synergie jsou IFN I. typu (tj. IFN – α a IFN – β) (Ahonen a kol., 2004). K zesílení celkového efektu mimo jiné také přispívá již zmíněný synergistický efekt poly (I:C) a R – 848 při tvorbě IL – 12 (Napolitani a kol., 2005).

Můžeme uvažovat i o jistém vakcinačním efektu terapie, kdy je každým dalším pulzem stimulován vznik paměťových buněk z CTL, jenž jsou důležitým nástrojem získané imunity. Zapojení získané imunity bylo provedeno v rámci tohoto pokusu a potvrzení její specifčnosti bylo provedeno pomocí dvojí retransplantace. Zaprvé byla provedena retransplantace buňkami Panc02 (ve standardní dávce) 120. den, která byla neúspěšná. Pankreatický adenokarcinom Panc02 se při transplantaci neujal a myši zůstaly vyléčeny. Můžeme to proto považovat za průkaz zapojení specifické imunity. Druhá retransplantace byla provedena 164. den, ale na rozdíl od první byl použit melanom B16-F10. Tento melanom se u zkoumaných myší ujal. To svědčí o antigenně specifické paměti.

7. ZÁVĚR

- 1) Kombinace stávající intratumorální terapie založené na směsi R - 848 + poly (I:C) + LTA + manan - BAM s její systémovou (i.p.) aplikací nevedla k významnému zlepšení.
- 2) Použití CpG namísto tří TLR agonistů (R - 848 + poly (I:C) + LTA) vyvolalo srovnatelnou redukci nádorového růstu, ale neprojevovalo se při prodloužení přežití.
- 3) Použití Fc – fragmentu namísto mananu nevedlo k vylepšení stávající terapie.
- 4) Perorální přidání beta glukanu ke stávající terapii při léčbě pankreatického adenokarcinomu nevedlo, na rozdíl od terapie melanomu, k jejímu vylepšení.
- 5) Vyhodnocení přenosu informace na získanou imunitu měřením intracelulární a extracelulární produkce IFN-gamma pomocí průtokové cytometrie a ELISA stanovením prokázalo reaktivitu zejména CD8+ lymfocytů na nádorový antigen a potvrdilo tak tento přenos.
- 6) Přidání anti PD - 1 ke stávající terapii (R - 848 + poly (I:C) + LTA + manan - BAM) nemělo na její účinek při terapii pankreatického adenokarcinomu významný vliv (redukce růstu, přežití).
- 7) Přidání anti CD40 ke stávající terapii vedlo k výrazné redukci růstu pankreatického adenokarcinomu a k výraznému prodloužení přežití. Získaná nádorově specifická odolnost vůči retransplantaci prokazuje účast specifických paměťových buněk a tím i získané imunity.

8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

- ADCC = na protilátkách závislá buněčná cytotoxicita
- ADP = na protilátkách závislá fagocytóza
- APC = antigen prezentující buňky
- ATM = ataxie teleangiektázie mutovaná
- BCR = B buněčný receptor
- BRCA 1, 2 = rakovina prsu 1, 2
- CDC = na komplementu závislá cytotoxicita
- CDKN2A = cyklin - dependentní kinázový inhibitor 2A
- CLRs = c – typ lecitin receptor
- CR 3 = komplement receptor 3
- CRP = C reaktivní protein
- CTL = cytotoxický T – lymfocyt
- DAMPs = vzory spojené s poškozením
- EBV = virus Epsteinova a Baarova
- Exstirpace = úplné operativní vyjmutí nádoru, nebo nádorové tkáně
- FGF – 2 = fibroblastový růstový faktor 2
- HBOC (hereditary breast and ovarian cancer) = dědičný nádor prsu a vaječníků
- HBV = virus hepatitidy B
- HMGB 1 = skupina s vysokou mobilitou 1
- HPV = lidský papilomavirus
- IFN = interferon
- LPS = lipopolysacharid
- LTA = kyselina lipoteichová

MDSC = myeloidní supresorové buňky

NLRs = nod – like receptory

p21 = protein 21

p53 = protein 53

PALB – 2 = partner a lokalizátor BRCA2

PAMPs = vzory spojené s patogenitou

PD – 1 = programovaná buněčná smrt 1

poly (I:C) = polyinosin – polycytidylová kyselina

PRRs = receptory rozpoznávající vzory

R – 848 = resiquimod

Rb = retinoblastom

TAA (tumor – associated antigens) = nádorově specifické antigeny

TCR = T buněčný receptor

TLRs = Toll – like receptory

TSA (tumor – specific antigens) = antigeny sdružené s nádory

UVA/B/C = ultrafialové záření A/B/C

VEGF = vaskulární endoteliální faktor

9. LITERATURA

- Abercrombie, M., & Ambrose, E. J. (1962). The surface properties of cancer cells: a review. *Cancer Research*, 22(5 Part 1), 525-548.
- Ahonen, C. L., Doxsee, C. L., McGurran, S. M., Riter, T. R., Wade, W. F., Barth, R. J., ... & Kedl, R. M. (2004). Combined TLR and CD40 triggering induces potent CD8+ T cell expansion with variable dependence on type I IFN. *Journal of Experimental Medicine*, 199(6), 775-784.
- Alli, R. S., & Khar, A. (2002). Dendritic cells as natural adjuvants and modulators of immune response in cancer immunotherapy.
- American Cancer Society. Cancer Facts & Figures (2017).
- Ana-Sosa-Batiz, F., Johnston, A. P., Liu, H., Center, R. J., Rerks-Ngarm, S., Pitisuttithum, P., ... & Kelleher, A. D. (2014). HIV-specific antibody-dependent phagocytosis matures during HIV infection. *Immunology & Cell Biology*, 92(8), 679-687.
- Andersen, L. M. K., Wegner, C. S., Simonsen, T. G., Huang, R., Gaustad, J. V., Hauge, A., ... & Rofstad, E. K. (2017). Lymph node metastasis and the physicochemical micro-environment of pancreatic ductal adenocarcinoma xenografts. *Oncotarget*, 8(29), 48060.
- Arai, M., Yokoyama, S., Watanabe, C., Yoshida, R., Kita, M., Okawa, M., ... & Akama, Y. (2018). Genetic and clinical characteristics in Japanese hereditary breast and ovarian cancer: First report after establishment of HBOC registration system in Japan. *Journal of Human Genetics*, 63(4), 447.
- Bais, A. G., Beckmann, I., Ewing, P. C., Eijkemans, M. J., Meijer, C. J., Snijders, P. J., & Helmerhorst, T. J. (2007). Cytokine Release in HR-HPV. *Mediators of Inflammation*, 2007.
- Brahmer, J. R., Tykodi, S. S., Chow, L. Q., Hwu, W. J., Topalian, S. L., Hwu, P., ... & Pitot, H. C. (2012). Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *New England Journal of Medicine*, 366(26), 2455-2465.
- Cabrera, M. C., Hollingsworth, R. E., & Hurt, E. M. (2015). Cancer stem cell plasticity and tumor hierarchy. *World Journal of Stem Cells*, 7(1), 27.
- Cambi, A., Netea, M. G., Mora-Montes, H. M., Gow, N. A., Hato, S. V., Lowman, D. W., ... & Figdor, C. G. (2008). Dendritic cell interaction with *Candida albicans*

- critically depends on N-linked mannan. *Journal of Biological Chemistry*, 283(29), 20590-20599.
- Chen, C., & Wang, G. (2015). Mechanisms of hepatocellular carcinoma and challenges and opportunities for molecular targeted therapy. *World Journal of Hepatology*, 7(15), 1964.
 - Dusek, L., Muzik, J., Gelnarová, E., Fínek, J., Vyzula, R., & Abrahámová, J. (2010). Cancer incidence and mortality in the Czech Republic. *Klin Onkol*, 23(5), 311-324.
 - Eliade, M., Skrzypski, J., Baurand, A., Jacquot, C., Bertolone, G., Loustalot, C., ... & Arnould, L. (2017). The transfer of multigene panel testing for hereditary breast and ovarian cancer to healthcare: What are the implications for the management of patients and families?. *Oncotarget*, 8(2), 1957.
 - Feinstein, D., & Collins, S. (2018). The Personal Care Products Safety Act. *JAMA Internal Medicine*.
 - Fidler, I. J. (2002). The organ microenvironment and cancer metastasis. *Differentiation*, 70(9-10), 498-505.
 - Freund, J. E. (2017). Regulation of Natural Killer Cell Development and Function by Activating Receptor Signaling Pathways.
 - Gadaleta, R. M., Garcia-Irigoyen, O., & Moschetta, A. (2017). Bile acids and colon cancer: Is FXR the solution of the conundrum?. *Molecular Aspects of Medicine*, 56, 66-74.
 - Gallagher, R., Motohashi, N., Vanam, A., & Gollapudi, R. (2017). Restricting Anaerobic Glycolysis Reliance (Warburg effect): Novel Natural Products Based Therapeutic Strategy for Cancer Treatment. *Archives of General Internal Medicine*, 1(3).
 - Green, D. S., Young, H. A., & Valencia, J. C. (2017). Current prospects of type II interferon γ signaling and autoimmunity. *Journal of Biological Chemistry*, 292(34), 13925-13933.
 - Gross, L. (1943). Intradermal immunization of C3H mice against a sarcoma that originated in an animal of the same line. *Cancer Research*, 3(5), 326-333.
 - Gruda, M. C., Ruggeberg, K. G., O'Sullivan, P., Guliashvili, T., Scheirer, A. R., Golobish, T. D., ... & Chan, P. P. (2018). Broad adsorption of sepsis-related PAMP and DAMP molecules, mycotoxins, and cytokines from whole blood using CytoSorb® sorbent porous polymer beads. *PLoS One*, 13(1), e0191676.

- Hassfjell, C. S., Grimsrud, T. K., Standring, W. J., & Tretli, S. T. E. I. N. A. R. (2017). Lung cancer prevalence associated with radon exposure in Norwegian homes. *Tidsskrift for den Norske Laegeforening: Tidsskrift for Praktisk Medicin, ny Raekke*, 137(14-15).
- Heil, F., Ahmad-Nejad, P., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Gellert, T., ... & Wagner, H. (2003). The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily. *European Journal of Immunology*, 33(11), 2987-2997.
- Ingber, D. E. (2008). Can cancer be reversed by engineering the tumor microenvironment?. In *Seminars in Cancer Biology* (Vol. 18, No. 5, pp. 356-364). Academic Press.
- Isakov, N. (2017). Protein kinase C (PKC) isoforms in cancer, tumor promotion and tumor suppression. In *Seminars in Cancer Biology*. Academic Press.
- Jerant, A. F., Johnson, J. T., Demastes Sheridan, C., & Caffrey, T. J. (2000). Early detection and treatment of skin cancer. *American Family Physician*, 62(2).
- Jeys, L. M., Grimer, R. J., Carter, S. R., Tillman, R. M., & Abudu, A. (2007). Post operative infection and increased survival in osteosarcoma patients: are they associated?. *Annals of Surgical Oncology*, 14(10), 2887-2895.
- Jühling, F., Bandiera, S., Hamdane, N., Thumann, C., Durand, S. C., Saghire, H. E., ... & Schmidl, C. (2017). Hepatitis C virus-induced epigenetic and transcriptional changes persist post cure. *Journal of Hepatology*, 66(1), S21.
- Klabusay, M. (2015). Úloha regulačních T buněk v protinádorové imunitní odpovědi. *Klinická onkologie*, 23.
- Knudson, A. G. (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 68(4), 820-823.
- Kramer, M. G., Masner, M., Ferreira, F. A., & Hoffman, R. M. (2018). BACTERIAL THERAPY OF CANCER: PROMISES, LIMITATIONS AND INSIGHTS FOR FUTURE DIRECTIONS. *Frontiers in Microbiology*, 9, 16.
- Krejčová, G. (2016). Nádorová imunoterapie založená na kombinaci TLR signalizace a aktivací fagocytózy. Studium mechanismů a možností dalšího zesílení účinku (Bakalářská práce). České Budějovice: Přf JČU.
- Kurtz, J. (2005). Specific memory within innate immune systems. *Trends in Immunology*, 26(4), 186-192.

- Landy, R., Windridge, P., Gillman, M. S., & Sasieni, P. D. (2018). What cervical screening is appropriate for women who have been vaccinated against high risk HPV? A simulation study. *International Journal of Cancer*, 142(4), 709-718.
- Lawson, J. S., Salmons, B., & Glenn, W. (2018). Oncogenic viruses and breast cancer Mouse mammary tumour virus (MMTV), bovine leukaemia virus (BLV), human papilloma virus (HPV), Epstein Barr virus (EBV). *Frontiers in Oncology*, 8, 1.
- Lim, J. J., Grinstein, S., & Roth, Z. (2017). Diversity and versatility of phagocytosis: roles in innate immunity, tissue remodeling, and homeostasis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7, 191.
- Maletzki, C., Linnebacher, M., Savai, R., & Hobohm, U. (2013). Mistletoe lectin has a shiga toxin-like structure and should be combined with other Toll-like receptor ligands in cancer therapy. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 62(8), 1283-1292.
- Mamidi, S., Höne, S., & Kirschfink, M. (2017). The complement system in cancer: Ambivalence between tumour destruction and promotion. *Immunobiology*, 222(1), 45-54.
- Marvel, D., & Gaborilovich, D. I. (2015). Myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment: expect the unexpected. *The Journal of Clinical Investigation*, 125(9), 3356-3364.
- Masáková, K. (2016). Nádorová imunoterapie založená na mechanizmech vrozené imunity a její optimalizace (Bakalářská práce). České Budějovice: PřF JČU.
- Matoušková, M. (2015). Imunoterapie uroteliálního karcinomu močového měchýře– od BCG vakcín k cílené imunoterapii. *Klinická onkologie*, 28(6).
- McIlwain, D. R., Berger, T., & Mak, T. W. (2015). Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(4).
- REP, R. G. M., Peratoni, A. O., Damajanov, I., & Pierce, G. B. (2006). The Biological Basis of Cancer.
- Meeusen, E. N., Lim, E., & Mathivanan, S. (2017). Secreted tumor antigens–immune biomarkers for diagnosis and therapy. *Proteomics*.
- Metz, K. A., Westerwick, D., Driever, F., Schmid, K. W., & Le Guin, C. H. D. (2017). Retinoblastom und Retinocytopom (Retinom) Retinoblastoma and retinocytoma (retinoma). *Der Pathologe*, 38(6), 507-514.
- Mirzayans, R., Andrais, B., Scott, A., Wang, Y. W., Kumar, P., & Murray, D. (2017). Multinucleated giant cancer cells produced in response to ionizing radiation retain

viability and replicate their genome. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(2), 360.

- Morath, S., Geyer, A., & Hartung, T. (2001). Structure–function relationship of cytokine induction by lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus*. *Journal of Experimental Medicine*, 193(3), 393-398.
- Mortara, L., Castellani, P., Meazza, R., Tosi, G., Barbaro, A. D. L., Procopio, F. A., ... & Accolla, R. S. (2006). CIITA-induced MHC class II expression in mammary adenocarcinoma leads to a Th1 polarization of the tumor microenvironment, tumor rejection, and specific antitumor memory. *Clinical Cancer Research*, 12(11), 3435-3443.
- Napolitani, G., Rinaldi, A., Bertoni, F., Sallusto, F., & Lanzavecchia, A. (2005). Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1–polarizing program in dendritic cells. *Nature Immunology*, 6(8), 769.
- Nedbalová, P. (2017). Úloha vrozené a získané imunity v imunoterapii melanomu a pankreatického adenokarcinomu (Diplomová práce). České Budějovice: PřF JČU.
- Nonoyama, M., Huang, C. H., Pagano, J. S., Klein, G., & Singh, S. D. N. A. (1973). DNA of Epstein-Barr virus detected in tissue of Burkitt's lymphoma and nasopharyngeal carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70(11), 3265-3268.
- Ostroff, G. R. (2014). *U.S. Patent No. 8,865,679*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Paďouková, L. (2016). Studium mechanismů nádorové imunoterapie založené na kombinaci resiquimodu s kotveným mananem a její další optimalizace (Bakalářská práce). České Budějovice: PřF JČU.
- Paget, S. (1889). The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *The Lancet*, 133(3421), 571-573.
- Pestka, S., Krause, C. D., & Walter, M. R. (2004). Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunological Reviews*, 202(1), 8-32.
- Preziosi, L. (Ed.). (2003). *Cancer Modelling and Simulation*. CRC Press.
- Primasová, H. (2013). The use of artificial opsonization for cancer treatment (Bakalářská práce). České Budějovice: PřF JČU.
- Qian, C., Guan, M., Si, C., Shen, H., Jin, T., & Zhang, T. (2017). Identification of differentially expressed profiles of lncRNAs and mRNAs in ER-negative and HER-2

- positive breast cancer. *Archives of Medical Science-Civilization Diseases*, 2(1), 148-160.
- Rahib, L., Smith, B. D., Aizenberg, R., Rosenzweig, A. B., Fleshman, J. M., & Matrisian, L. M. (2014). Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. *Cancer Research*, 74(11), 2913-2921.
 - Ramasamy, K., Shanmugam, M., Balupillai, A., Govindhasamy, K., Gunaseelan, S., Muthusamy, G., ... & Nagarajan, R. P. (2017). Ultraviolet radiation-induced carcinogenesis: Mechanisms and experimental models. *Journal of Radiation and Cancer Research*, 8(1), 4.
 - Reuschenbach, M., von Knebel Doeberitz, M., & Wentzensen, N. (2009). A systematic review of humoral immune responses against tumor antigens. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 58(10), 1535.
 - Ribatti, D. (2017). A revisited concept: contact inhibition of growth. From cell biology to malignancy. *Experimental Cell Research*, 359(1), 17-19.
 - Ribatti, D. (2017). The concept of immune surveillance against tumors: The first theories. *Oncotarget*, 8(4), 7175.
 - Ronca, R., Benkheil, M., Mitola, S., Struyf, S., & Liekens, S. (2017). Tumor angiogenesis revisited: Regulators and clinical implications. *Medicinal Research Reviews*.
 - Schröder, N. W., Morath, S., Alexander, C., Hamann, L., Hartung, T., Zähringer, U., ... & Schumann, R. R. (2003). Lipoteichoic acid (LTA) of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* activates immune cells via Toll-like receptor (TLR)-2, lipopolysaccharide-binding protein (LBP), and CD14, whereas TLR-4 and MD-2 are not involved. *Journal of Biological Chemistry*, 278(18), 15587-15594.
 - Shindo, K., Yu, J., Suenaga, M., Fesharakizadeh, S., Cho, C., Macgregor-Das, A., ... & Navarro Almario, J. A. (2017). Deleterious germline mutations in patients with apparently sporadic pancreatic adenocarcinoma. *Journal of Clinical Oncology*, 35(30), 3382-3390.
 - Sica, A., & Mantovani, A. (2012). Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(3), 787-795.
 - Siegel, R. L., Miller, K. D., Fedewa, S. A., Ahnen, D. J., Meester, R. G., Barzi, A., & Jemal, A. (2017). Colorectal cancer statistics, 2017. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 67(3), 177-193.

- Smyth, M. J., Cretney, E., Kershaw, M. H., & Hayakawa, Y. (2004). Cytokines in cancer immunity and immunotherapy. *Immunological Reviews*, 202(1), 275-293.
- Stier, H., Ebbeskotte, V., & Gruenwald, J. (2014). Immune-modulatory effects of dietary Yeast Beta-1, 3/1, 6-D-glucan. *Nutrition Journal*, 13(1), 38.
- Stone, G. W., Barzee, S., Snarsky, V., Santucci, C., Tran, B., & Kornbluth, R. S. (2009). Regression of established AB1 murine mesothelioma induced by peritumoral injections of CpG oligodeoxynucleotide either alone or in combination with poly (I: C) and CD40 ligand plasmid DNA. *Journal of Thoracic Oncology*, 4(7), 802-808.
- Stüve, O., & Vernino, S. (2017). The major histocompatibility complex and antibody-mediated limbic encephalitis. *Annals of Neurology*, 81(2), 181-182.
- Stramer, B., & Mayor, R. (2017). Mechanisms and in vivo functions of contact inhibition of locomotion. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 18(1).
- Tomasetti, C., Li, L., & Vogelstein, B. (2017). Stem cell divisions, somatic mutations, cancer etiology, and cancer prevention. *Science*, 355(6331), 1330-1334.
- Torosantucci, A., Bromuro, C., Chiani, P., De Bernardis, F., Berti, F., Galli, C., ... & Rappuoli, R. (2005). A novel glyco-conjugate vaccine against fungal pathogens. *Journal of Experimental Medicine*, 202(5), 597-606.
- Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., & Jemal, A. (2015). Global cancer statistics, (2012). *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 65(2), 87-108.
- Turner, J. G., Rakhmilevich, A. L., Burdelya, L., Neal, Z., Imboden, M., Sondel, P. M., & Yu, H. (2001). Anti-CD40 antibody induces antitumor and antimetastatic effects: the role of NK cells. *The Journal of Immunology*, 166(1), 89-94.
- Turvey, S. E., & Broide, D. H. (2010). Innate immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2), S24-S32.
- Ú. Z. I. A. S. ČESKÉ REPUBLIKY, © (2016). *Zdravotnická ročenka*.
- Vonderheide, R. H., Bajor, D. L., Winograd, R., Evans, R. A., Bayne, L. J., & Beatty, G. L. (2013). CD40 immunotherapy for pancreatic cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 62(5), 949-954.
- VoPham, T., DuPré, N., Tamimi, R. M., James, P., Bertrand, K. A., Vieira, V., ... & Hart, J. E. (2017). Environmental radon exposure and breast cancer risk in the Nurses' Health Study II. *Environmental Health*, 16(1), 97.
- Wei, W., & Sedivy, J. M. (1999). Differentiation between senescence (M1) and crisis (M2) in human fibroblast cultures. *Experimental Cell Research*, 253(2), 519-522.

- Weinberg, R. A. (1989). Oncogenes, antioncogenes, and the molecular bases of multistep carcinogenesis. *Cancer Research*, 49(14), 3713-3721.
- Whitson, R. J., & Oro, A. E. (2017). Soil primes the seed: Epigenetic landscape drives tumor behavior. *Cell Stem Cell*, 20(2), 149-150.
- Wollina, U., Hansel, G., Schmidt, N., Schönlebe, J., Kittner, T., & Nowak, A. (2017). Very Rare Amelanotic Lentigo Maligna Melanoma with Skull Roof Invasion. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*, 5(4), 458.
- Wong, B. C. Y., Lam, S. K., Wong, W. M., Chen, J. S., Zheng, T. T., Feng, R. E., ... & Fong, D. Y. T. (2004). Helicobacter pylori eradication to prevent gastric cancer in a high-risk region of China: a randomized controlled trial. *Jama*, 291(2), 187-194.
- Yin, H., & Cheng, K. (2016). *U.S. Patent No. 9,409,880*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Yuksel, M. E., & Tamer, F. (2017). Nodular malignant melanoma in the nasolabial fold. *Our Dermatology Online*, 8(3), 352-353.
- Zhang, J. Y., Casiano, C. A., Peng, X. X., Koziol, J. A., Chan, E. K., & Tan, E. M. (2003). Enhancement of antibody detection in cancer using panel of recombinant tumor-associated antigens. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 12(2), 136-143.
- Zhong, J., Chen, Y., & Wang, L. J. (2016). Emerging molecular basis of hematogenous metastasis in gastric cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 22(8), 2434.
- Zhou, H., Olsen, H., So, E., Mérigeon, E., Rybin, D., Owens, J., ... & Zhang, X. (2017). A fully recombinant human IgG1 Fc multimer (GL-2045) inhibits complement-mediated cytotoxicity and induces iC3b. *Blood Advances*, 1(8), 504-515.