Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

Úloha a mechanismy působení buněk vrozené imunity při rozpoznávání a likvidaci nádorových buněk

Bakalářská práce

Kristýna Danielová

Vedoucí práce: RNDr. Jan Ženka, CSc.

České Budějovice 2019

Danielová, K., 2019: Úloha a mechanismy působení buněk vrozené imunity v rozpoznávání a likvidaci nádorových buněk. [The role and mechanisms of innate immunity cells in the recognition and elimination of tumor cells. Bc. Thesis, in Czech] - 98 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

The aim of this thesis was to summarize the role of innate immunity in antitumor immunity and to define mechanisms by which cells of innate immunity (especially neutrophils, macrophages, NK cells and dendritic cells) recognize and eliminate tumor cells. Finally, I suggested methods of tumor immunotherapy using cells of innate immunity.

Prohlášení:

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

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

V Českých Budějovicích, 7. 4. 2019

……

Kristýna Danielová

Poděkování

V prvé řadě bych chtěla nejvíce poděkovat mému školiteli RNDr. Janu Ženkovi, CSc. za odborné vedení práce, za ochotu, cenné rady, a především za trpělivost. Dále bych chtěla poděkovat mé rodině a partnerovi, kteří mi byli po celou dobu psaní této bakalářské práce velkou oporou.

OBSAH

1 ÚVOD 4
2 CÍLE PRÁCE 6
3 REŠERŠE 7
3.1 NÁDOROVÁ ONEMOCNĚNÍ 7
3.1.1 Faktory ovlivňující vznik nádorového onemocnění 7
3.1.2 Klasifikace nádorů 7
3.1.3 Šíření nádoru 8
3.1.4 Nádorová terapie 9
3.2 IMUNITNÍ SYSTÉM 10
3.2.1 Získaná (specifická) imunita 11
3.2.2 Vrozená (nespecifická) imunita 13
3.2.2.1 BUNĚČNÁ SLOŽKA 14
3.2.2.2 HUMORÁLNÍ SLOŽKA 15
3.3 PROTINÁDOROVÁ IMUNITA 16
3.3.1 Imunoeditace 16
3.3.2 Únik nádorových buněk imunitnímu systému 17
3.3.3 Nádorové markery 19
3.3.4 Nádorové antigeny 20
3.3.5 Nádorový-imunitní cyklus 21
3.3.6 Nádor a zánět 22
3.4 ÚLOHA VROZENÉ IMUNITY V PROTINÁDOROVÉ OBRANĚ 23
3.5 MECHANISMY ROZPOZNÁVÁNÍ A LIKVIDACE NÁDOROVÝCH BUNĚK BUŇKAMI VROZENÉ IMUNITY 25
3.5.1 Neutrofily 25
3.5.1.1 ROZPOZNÁNÍ 26
3.5.1.2 LIKVIDACE 28
3.5.1.3 TVORBA NETs A RAKOVINA 30
3.5.1.4 NEUTROFILY A RAKOVINA 31
3.5.2 Makrofágy 34
3.5.2.1 ROZPOZNÁNÍ 36
3.5.2.2 LIKVIDACE 38
3.5.2.3 MAKROFÁGY A RAKOVINA 40

3.5.3 NK buňky 41
3.5.3.1 ROZPOZNÁNÍ 42
3.5.3.2 LIKVIDACE 45
3.5.3.3 NK BUŇKY A RAKOVINA 45
3.5.4 Dendritické buňky 47
3.5.4.1 ROZPOZNÁNÍ 49
3.5.4.2 LIKVIDACE 50
3.5.4.3 DENDRITICKÉ BUŇKY A RAKOVINA 51
3.6 ZPŮSOBY NÁDOROVÉ IMUNOTERAPIE POMOCÍ BUNĚK VROZENÉ IMUNITY 53
4 DISKUSE 57
5 ZÁVĚR 63
6 LITERATURA 64

1 ÚVOD

Dle statistik, které byly uveřejněny Českým onkologickým programem, žilo v roce 2016 pouze na území České republiky celkem 562 329 osob, kterým bylo daný rok nebo dříve diagnostikováno nádorové onemocnění. Daný rok rakovinou onemocnělo nově více než 96 500 osob (49 302 mužů, 47 198 žen) a 27 261 pacientů na následky onemocnění zemřelo. Bylo zjištěno, že rakovinou onemocní v průběhu svého života každý 3. obyvatel České republiky a každý 4. na ni zemře. Incidence zhoubných karcinomů v ČR stále roste, na čemž se z části podílí i stárnutí populace v naší zemi.

Podle statistických dat uveřejněných v lednu 2019 celosvětovou zdravotnickou organizací WHO byla v roce 2018 globální incidence nových případů 18 078 957 (17 036 901 pacientů, nezahrnujeme-li nemelanomovou rakovinu kůže). Na rakovinu v průběhu roku 2018 zemřelo 9 555 027 pacientů. Pacientům byl nejčastěji diagnostikován karcinom plic (2,1 milionu, 11,6% z celku) a prsu (2,1 milionu, 11,6% z celku), avšak nejvíce pacienti umírali na následky karcinomu plic (1,7 milionu, 18,4% z celku) a kolorektální karcinom (0,9 milionu, 9,2% z celku).

Tato data jsou pro většinou z nás velice znepokojivá a obáváme se dne, kdy my samotní nebo někdo z našeho okolí onemocní rakovinou, a není divu, data hovoří jasně, rakovina se podílí na celosvětové mortalitě 25,8% a rakovinu to tak staví na druhou příčku nejčastějších příčin úmrtí hned po kardiovaskulárních chorobách (Dušek a kol., 2014). Udává se, že 90-95% všech nádorových onemocnění je zapříčiněno životním stylem a životním prostředím a pouhých 5-10 % je způsobeno genetickými predispozicemi. Jako hlavní rizikové faktory způsobující vznik zhoubných novotvarů se udává alkohol, kouření, UV záření, obezita, nedostatečná pohybová aktivita, stres a znečištěné životní prostředí (Anald a kol., 2008).

I přes to, pokud je někomu diagnostikována rakovina, existují metody, které se využívají k léčbě rakovinného onemocnění jako je chemoterapie, radioterapie nebo chirurgické odstranění postižené tkáně. Bohužel velkou nevýhodou chemoterapie a radioterapie je, že během léčby dochází jak k likvidaci zhoubných buněk, tak i zdravých buněk. A právě proto mnoho vědců vkládá své úsilí a naděje do výzkumu imunoterapie,

která funguje na principu posílení vlastních buněk jak vrozené, tak získané imunity a cílené likvidace nádorových buněk.

Z tohoto důvodu je má bakalářská práce zaměřena na posílení vrozené imunity díky získaným informacím, jak jednotlivé buňky vrozené imunity rozpoznávají a eliminují nádorové buňky.

2 CÍLE PRÁCE

- Úloha vrozené imunity v protinádorové obraně organismu
- Mechanismy rozpoznání a likvidace nádorových buněk buňkami vrozené imunity
- Navrhované způsoby nádorové imunoterapie s použitím buněk vrozené imunity

3 REŠERŠE

3.1 NÁDOROVÁ ONEMOCNĚNÍ

Nádorová onemocnění bývají označována jako zhoubný novotvar nebo jako více známé označení rakovina. Všechny zdravé somatické buňky (vyjma lymfocytů) jednoho organismu obsahují stejný genom. U dospělého jedince nastává buněčná homeostáza, na které se podílí programovaná buněčná smrt, proliferace buněk a terminální diferenciace buněk. Tyto tři děje jsou podmíněné geneticky. Dojde-li k transformaci somatické buňky, dojde i k narušení rovnováhy (Petera a kol., 2005).

Původ nádorového onemocnění tkví pouze v jedné jediné zmutované buňce, která přestala odpovídat na signály vedoucí k programované buněčné smrti a začala se nekontrolovatelně dělit (Chabner a Chabner Thompson, 2013).

Rakovinné buňky jsou charakterizovány svou schopností unikat imunitnímu systému, sníženou citlivostí vůči signálům způsobujícím programovanou buněčnou smrt, neomezeným replikačním potenciálem, schopností stimulovat růst kapilár (angiogeneze), necitlivostí na růst inhibující signály, soběstačností v potřebě růstových signálů, schopností šířit se a zakládat sekundární ložiska ve vzdálených tkáních (metastáze). Všechny tyto schopnosti utváří logický rámec sloužící k pochopení fungování nádorového onemocnění (Hanahan a Weinberg, 2011).

3.1.1 Faktory ovlivňující vznik nádorového onemocnění

Jako hlavní příčina ovlivňující vznik rakoviny se uvádí nahromadění velkého množství mutací, které jsou následkem prodlužování věku u lidí. Mutageny jsou vlivy, které způsobují mutace v buňkách a mohou být biologického, chemického nebo fyzikálního charakteru (Comings, 1973). Známými mutageny jsou UV záření nebo chemické sloučeniny obsažené jak v cigaretovém kouři, tak ve zplodinách produkovaných automobily. Tyto faktory se podílejí na zvýšeném výskytu mutací v buňkách, které poté způsobují rakovinné bujení (Ames a kol., 1995).

3.1.2 Klasifikace nádorů

Studie ukazují, že v dnešní době existuje více než 100 druhů rakoviny (Hanahan a Weinberg, 2011). Nádory rozlišujeme podle jejich klinického a biologického chování

a také podle jejich vztahu k okolní tkáni na nádory benigní, maligní, semimaligní a potencionálně maligní.

Benigní (nezhoubné) nádory jsou ohraničené, neinvazivní, rostoucí expanzivně a pomalu, jsou snadno chirurgicky odstranitelné. Benigní nádory působí na své okolí pouze mechanickým tlakem a jedince mohou ohrožovat, jen pokud se vyskytují v nepříznivé lokaci, jako je například centrální nervová soustava (Rejthar a Vojtěšek, 2002).

Maligní (zhoubné) nádory jsou charakteristické svou invazivitou (metastazují), agresivitou vůči okolní tkáni, jsou neohraničené, rostou rychleji a jsou hůře chirurgicky odstranitelné. Pokud během chirurgického zákroku nedojde k úplnému odstranění maligní tkáně, dochází poté k znovuobjevení nádoru a k metastazování (Rejthar a Vojtěšek, 2002).

K potencionálně maligním a semimaligním nádorům se řadí nádory, u kterých nelze přesně určit podle diagnostických metod jejich malignitu či benignitu (Rejthar a Vojtěšek, 2002). Maligní nádory jsou pro pacienty velice nebezpečné a často smrtelné (Opdenakker a Van Damme, 2004).

Nádory dále klasifikujeme podle tkáně, ze které vznikají. Rozlišujeme nádory epitelové, mezenchymové, nádory z krvetvorné tkáně kostní dřeně, neuroendokrinní, smíšené, mezoteliomy, choriokarcinomy a lymfomy (Vorlíček a kol., 2016).

Nádory dále rozdělujeme podle orgánové lokalizace. U pacientů můžeme rozlišovat například rakovinu varlat, prsu, žaludku, tlustého střeva, kůže, konečníku apod. (Sell, 2004).

3.1.3 Šíření nádoru

Schopnost buněčné migrace je jedním z nejdůležitějších buněčných procesů, jako je imunitní odpověď a embryogeneze (Kovaříková a kol., 2004). Metastázy jsou dceřiné buňky vytvořené buňkami primárního nádoru za účelem expandovat. Metastázy se mohou vyskytovat v tělních dutinách, tkáních, lymfatických uzlinách či orgánech (Adam a Vorlíček, 2004). Právě metastázy jsou zodpovědné za 90% úmrtí (Hejmadi, 2010).

Metastázy rozdělujeme do tří skupin podle jejich způsobu šíření**. Lymfogenní metastázy** se šíří lymfatickými cestami a v důsledku vyústění lymfatických cév do krevního řečiště se dále metastáze šíří hematogenní cestou. **Hematogenní metastázy** se šíří krevním řečištěm, z tohoto důvodu často zakládají velmi vzdálená sekundární ložiska. Nejběžnějším příkladem je šíření nádorových buněk tlustého střeva do jater. **Implantační metastázy** se nacházejí v serózních dutinách, jakou jsou kloubní prostory či perikard (Rejthar a Vojtěšek, 2002; Adam a Vorlíček, 2004).

3.1.4 Nádorová terapie

V současné době je hlavním cílem při léčbě rakoviny prodloužit dobu přežití, zlepšit kvalitu pacientova života a při nejlepším rakovinu úplně vyléčit (Meiliana a kol., 2016). Léčebné terapie se od dob, kdy jediným řešením byl pouze chirurgický zákrok, rapidně změnily. V dnešní době máme velké množství kvalitní léčby, jako je radioterapie, chemoterapie, endokrinní léčba a nejnovější a velice účinnou protinádorovou terapií se dnes stává imunoterapie (Urruticoechea a kol., 2010).

Chirurgický zákrok je nejstarší a dodnes velmi využívanou terapií (Sudhakar, 2009). Během chirurgického zákroku dochází k odstranění části nebo celého nádoru a spádových uzlin, ve kterých mohou být přítomny metastáze. Pokud je nádor benigní, chirurgický zákrok je konečným řešením. Ovšem u maligních nádorů, právě kvůli možnosti výskytu metastáz, je chirurgická léčba doplněna o chemoterapii nebo radioterapii (Brada a kol., 1992).

Chemoterapie funguje na principu podávání chemických látek (cytostatik) pacientovi. Cytostatika jsou cytotoxické povahy a působí na buněčný cyklus (buněčné dělení) všech rychle se dělících buněk. Díky cytotoxické povaze je tedy chemoterapie schopna likvidovat jak nádor samotný, tak metastáze. Avšak toxicita zároveň poškozuje zdravé tkáně, jako například buňky kostní dřeně, zárodečné buňky nebo vlasové folikuly (Martins a de Oliveira, 2009).

Radioterapie (RT) nebo také léčba zářením, je terapie založená na toku fotonů a elektronů. Fotony/elektrony jsou cílené na nádorový útvar, kde dochází k nezvratným změnám na molekule DNA a tím i k destrukci samotných nádorových buněk. RT je nejúčinnější, pokud zasáhne buňku v G_2 nebo M fázi buněčného cyklu (Adam a

Vorlíček, 2004). Ovšem ozářením nedochází k destrukci pouze nádorových buněk, ale stejně jako u chemoterapie dochází k ničení i zdravé okolní tkáně. Z tohoto důvodu se RT využívá spíše jako doplněk k chemoterapii nebo chirurgické léčbě (Hynková a Doležalová, 2008). Různé typy nádorů mají ale různou citlivost na záření. Například sarkomy a gliomy jsou naprosto radiorezistentní, kdežto nádory zárodečných buněk, leukemie nebo lymfomy jsou enormně citlivé na záření (Adam a Vorlíček, 2004).

Hormonální terapie se zejména využívá při léčbě nádorů závislých na výskytu hormonů. Nejčastějšími nádory využívající hormonální terapii je karcinom prostaty a karcinom prsu (Adam a Vorlíček, 2004). Růst nádorových buněk je závislý na výskytu hormonálních receptorů v nádorových buňkách reagujících s endogenními hormony. Z tohoto důvodu je hlavním cílem této léčby zamezit vazbě endogenního ligandu na receptor (Petera a kol., 2005).

Imunoterapie využívá přirozených mechanismů imunity k aktivaci a posílení protinádorové imunity. Velkou výhodou imunoterapie je její cílení na nádorové buňky a mírné vedlejší účinky. Imunitní systém chrání organismus před cizími antigeny, a právě toho využívají monoklonální protilátky, které blokují receptory na povrchu nádorů.

3.2 IMUNITNÍ SYSTÉM

Hlavním úkolem imunitního systému je udržovat stálost vnitřního prostředí (homeostázu). Homeostázy systém docílí díky ochraně organismu proti vnějším a vnitřním škodlivinám tak, že škodliviny imunitní systém dokáže rozpoznat a zneškodnit. Všechny tělu cizí buňky, jako jsou nádorové buňky, mikroorganismy a patogeny, nesou na svém povrchu antigeny, které je náš imunitní systém schopný rozpoznat. Imunitní systém je tedy schopen vyhodnotit možné nebezpečí škodlivých elementů jako jsou zmutované, staré nebo poškozené buňky (Hořejší a Bartůňková, 2009). Dojde-li k narušení homeostázy, nastane rozvoj zánětlivé reakce (Krejsek a kol., 2016).

Mezi základní obranné mechanismy patří obranyschopnost, autotolerance a imunitní dohled. **Obranyschopnost** je schopnost organismu a imunitního systému rozpoznat vnější a vnitřní patogeny, viry, škodliviny, mikroorganismy aj., vyhodnotit jejich škodlivost a chránit organismus před jejich vlivem a toxicitou. **Autotolerance** je

schopná rozpoznat sobě vlastní tkáně a udržet vůči nim toleranci. Pokud by nastala porucha autotolerance, došlo by ke vzniku autoimunitní odpovědi a dále ke vzniku autoimunitního onemocnění, mezi které patří například roztroušená skleróza nebo celiakie. **Imunitním dohledem** se rozumí dohled nad vnitřním prostředím a schopnost rozlišovat a odstraňovat poškozené, zmutované nebo staré buňky (Hořejší a kol., 2017).

Imunitní mechanismy rozdělujeme na základě rychlosti odpovědi a specifity na dvě hlavní skupiny, které se vzájemně doplňují a podílejí se na eliminaci a rozpoznání škodlivin – mechanismy získané (specifické, adaptivní) a vrozené (nespecifické) imunity (Bartůňková a Vernerová, 2002).

Získaná imunita je sice vývojově mladší, zato je ale dokonalejší. Systém je založen na antigen specifických reakcích, které jsou prováděny pomocí T a B lymfocytů. U získané imunity je typické, že reakce na cizorodý antigen trvá delší dobu než u vrozené imunity, obvykle jsou to dny až týdny, než dojde k imunitní odpovědi organismu. Navíc během adaptivní imunity dochází k tvorbě paměťových buněk, díky kterým při opětovném setkání s antigenem již dochází k účinnější a rychlejší odpovědi (Bartůňková a Vernerová, 2002).

Vrozená imunita je vývojově starší a vyskytuje se u všech mnohobuněčných organismů (Medzhitov a Janeway, 1997). Tvoří mikrobiální, fyzickou a chemickou bariéru, ale více je vrozená imunita známa díky jejím buňkám (makrofágy, monocyty, neutrofily) a nebuněčným složkám (proteiny akutní fáze, cytokiny a komplement). Díky těmto složkám probíhá imunitní odpověď okamžitě (Parkin a kol., 2001).

3.2.1 Získaná (specifická) imunita

Jak již bylo zmíněno, získaná imunita je vývojově mladší a pomalejší než vrozená imunita a je známá až u obratlovců. Specifická imunita využívá rekombinací genových segmentů pro tvorbu obrovské škály různých receptorů, které jsou poté schopny rozeznat specifické antigeny (Clark a Kupper, 2005). Hlavními složkami tvořícími získanou imunitu jsou T a B lymfocyty a plazmatické buňky. Získanou imunitu dělíme na humorální složku, která je založena na protilátkách a na buněčnou složku, která je tvořena T a B lymfocyty (Hořejší a kol., 2017). Charakteristická je pro získanou imunitu tvorba paměťových buněk, díky kterým dochází při sekundárním

setkání se specifickým Ag (antigenem) k silnější a rychlejší imunitní reakci než při primárním setkání (Delves a kol., 2012).

B lymfocyty se vytvářejí a dozrávají v kostní dřeni. Na jejich povrchu se nacházejí protilátkové molekuly – receptory, které mohou být vázány buď na povrchu nebo mohou být sekretovány. Receptor je tvořen těžkými a lehkými řetězci imunoglobulinu (Ig). Na základě izoforem těžkého řetězce rozlišujeme IgA, IgE, IgG, IgD a IgM (Krejsek a Kopecký, 2004). Pokud se receptor B lymfocytu setká s Ag, tak se za přítomnosti interferonu gama (IFN-γ) produkovaného Th lymfocyty a cytokinů rozdělí na dvě subpopulace: paměťové a plazmatické buňky. Úlohou plazmatických buněk je tvorba protilátek vůči danému Ag, které daný Ag buď opsonizují (zvýrazní ho pro následnou fagocytózu fagocytárními buňkami), neutralizují, iniciují ADCC (Antibody Dependent Cell Cytotoxicity) nebo zahájí komplementovou kaskádu. Na druhou stranu paměťové buňky tvoří tzv. imunologickou paměť, jsou v těle po celý život a při sekundárním setkání s Ag urychlují imunitní odpověď (Bonilla a Oettgen, 2010).

T lymfocyty vznikají stejně jako B lymfocyty v kostní dřeni. Na druhou stranu, ale dozrávají v brzlíku, kde dochází k další selekci. Na rozdíl od B lymfocytů, T lymfocyty nerozeznávají Ag pomocí receptoru, ale rozpoznávají antigenní peptidy, které jsou prezentovány v komplexu s hlavním histokompatibilním komplexem (MHC) (Clark a Kupper, 2005). Po rozpoznání Ag dochází k diferenciaci T lymfocytů na buňky efektorové a paměťové. A současně se po rozpoznání Ag diferencují na dvě subpopulace: cytotoxické T lymfocyty (Tc) a pomocné T lymfocyty (Th) (Bonilla a Oettgen, 2010).

Cytotoxické Tc (CD8+) buňky rozpoznávají Ag v komplexu s MHC I. Tc buňky jsou toxické pro buňky, které nesou specifický Ag pro jejich receptor. Poté, co se Ag naváže na receptor Tc buňky, uvolní se perforin, který způsobuje programovanou buněčnou smrt (apoptózu) cizí buňky. Tohoto principu též využívají NK buňky. Za přítomnosti cytokinů, které jsou produkovány Th lymfocyty, se Tc lymfocyty dále diferencují na aktivované CTL (cytotoxické T lymfocyty). CTL mají za úkol odstraňovat nádorové, transplantované nebo virem napadené buňky (Parkin a kol., 2001).

Pomocné Th (CD 4+) buňky nehrají pouze důležitou roli při aktivaci B lymfocytů, sekretujících protilátky, ale také pomáhají aktivovat Tc buňky (Parkin a kol., 2001). Th buňky nesou na svém povrchu CD 4+ molekuly a Ag rozpoznávají v komplexu s MHC II. Podle cytokinů, které Th buňky produkují se pomocné Th buňky = Th0 diferencují na Th1 a Th2 buňky. Dalšími minoritními subpopulacemi jsou Th9, Th17 a Th22. Th0 lymfocyty se pomocí cytokinů IL-12, IL-18 a INF-γ diferencují na Th1 lymfocyty a IL-4 indukuje diferenciaci Th0 na Th2 lymfocyty (Hořejší a kol., 2009).

Th1 buňky mají vliv na tvorbu buněčné imunity, zejména na cytotoxické Tc buňky a na NK buňky. Exprimují IL-2, INF-γ, TNF-β a díky těmto cytokinům působí Th1 buňky prozánětlivě (Hořejší a kol., 2009).

Th2 buňky podporují humorální imunitu, aktivují B lymfocyty, které poté syntetizují a vylučují antigen specifické protilátky. Exprimují IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 A IL-13. Th2 lymfocyty jsou zejména využívány v antiparazitární imunitě, ale v patologii je tato reakce často spojována s alergickými reakcemi - atopií (Krejsek a kol., 2004).

3.2.2 Vrozená (nespecifická) imunita

Vrozená imunita je vývojově starší, rychlejší a méně specifická. Nemá vyvinutou imunologickou paměť, ale aktivace efektorových buněk je velice rychlá, a tudíž při vstupu antigenu do těla hostitele reaguje okamžitě a stejnou silou (Medzhitov a Janewey, 2000). Nespecifická imunita je tvořena řadou obranných mechanismů (bariérové, humorální a buněčné).

První mechanismus, který brání vstupu patogenu do organismu, jsou fyziologické a anatomické bariéry, které jsou tvořeny mechanickou a chemickou složkou (Raval a kol., 2014). Mezi mechanickou složku řadíme mukózní sliznici a epitel plic, sliznici gastrointestinálního a genitourinárního traktu. Chemická složka zlepšuje funkci mechanické složky díky produkci enzymů, které jsou obsaženy v slzách, potu, slinách a žaludku a tvorbě kyselého pH v žaludku a moči (Hořejší a Bartůňková, 2009). Jestliže patogen překoná prvotní obranu, dojde k aktivaci buněčné a humorální složky.

3.2.2.1 BUNĚČNÁ SLOŽKA

Buněčná složka je tvořena fagocytujícími buňkami (makrofágy, neutrofily, eosinofily, bazofily, monocyty, žírné a dendritické buňky) a cytotoxickými NK buňkami, u kterých není fagocytární vlastnost vyvinuta (Beutler, 2004). Fagocytující buňky nespecifické imunity rozpoznávají patogeny určené k likvidaci díky PAMPs (pathogen associated molecular patterns), což jsou různorodé molekuly na povrchu cizorodých částic tvořené lipopolysacharidy (u Gram-negativních bakterií), peptidoglikany (u Gram-pozitivních bakterií), mannany a glukany (houby a kvasinky) (Hořejší a kol., 2017). PRRs (pattern recognition receptors) jsou receptory makrofágů, NK buněk, neutrofilů a dendritických buněk, rozpoznávající PAMPs. PRRs se mohou vyskytovat intracelulárně, extracelulárně (na povrchu buňky) nebo mohou být nalezeny v krvi a tkáňových tekutinách (Beutler, 2004).

Rozeznáváme tři typy PRRs z hlediska jejich funkčnosti - signální, sekretované a endocytární receptory.

Signální PRR - v okamžiku navázání antigenu na signální PRR dochází k zahájení signální kaskády, jejímž výsledkem je tvorba cytokinů. Produkované cytokiny aktivují vrozenou a získanou imunitní odpověď. Mezi signální PRR řadíme například NOD (nukleotide-binding oligomerization domain) a TLR (tool-like receptor) (Neth a kol., 2005; Krejsek a Kopecký, 2004).

Sekretované PRR - váží se na buněčnou stěnu patogenu a v tomto spojení jsou rozpoznávány fagocytárními buňkami a komplementovým systémem. Sekretovanými PRRs jsou například SAP (serum amyloid protein), CRP (C-reactive protein) a MBL (mannose-binding lectin) (Neth a kol., 2005; Krejsek a Kopecký, 2004).

Endocytární PRR – jsou exprimovány na povrchu fagocytárních buněk. V případě rozpoznání cizího mikroorganismu dojde k vazbě PAMP-PRR a to vede k fagocytóze mikroorganismu. Mezi endocytární PRR patří například makrofágový vychytávací (scavenger) receptor nebo manózový receptor (Neth a kol., 2005; Krejsek a Kopecký, 2004).

3.2.2.2 HUMORÁLNÍ SLOŽKA

Humorální složka je tvořena složkami komplementu a cytokiny. Úlohou humorální složky nespecifické imunity je obrana organismu proti extracelulárním baktériím, opsonizace (navázání na mikroby a označení pro fagocytující buňky) (Hořejší a Bartůňková, 2009).

Komplement

Komplement je nejdůležitější obranný systém těla, skládající se přibližně z třiceti proteinů a glykoproteinů, které se nacházejí buď jako s membránou asociované proteiny nebo se vyskytují rozpuštěné v krvi. Existuje celkově devět sérových proteinů označovaných jako C1-C9, které jsou produkovány makrofágy a jaterními buňkami.

C složky, neboli složky komplementu, se v séru nacházejí v neaktivní formě. Až po kontaktu s aktivátorem (patogenem) se složky kaskádovitě aktivují pomocí enzymatických reakcí (Sarma a kol., 2011).

K aktivaci komplementu může docházet klasickou, lektinovou nebo alternativní cestou. Rozhodujícím místem aktivace je štěpení C3 složky na C3a a C3b fragmenty a produkce MAC neboli membrane attack komplex, který napadá membrány mikroorganismů (Sarma a kol., 2011).

Funkcí aktivního komplementu je **opsonizace** (C3b složka se kovalentně naváže na membránu patogenu a označí ho fagocytárním buňkám k fagocytóze), **chemotaxe** (pohyb buněk do místa zánětu je zprostředkován složkami C3a a C5b) a **osmotická lýze buněk** (způsobená pomocí MAC, který je tvořený složkami C5b, C6, C7, C8 a C9) (Hořejší a Bartůňková, 2009).

Cytokiny

Cytokiny jsou polypeptidové hormony, přenášející informace mezi buňkami pomocí specifického receptoru, který se vyskytuje na membráně buňky. Cytokiny mají různé funkce, ale většina má vliv na dělení buňky, diferenciaci, regulaci růstu, zánět a apoptózu (Parkin a kol., 2001). Cytokiny se v těle nacházejí buď rozpuštěné v séru nebo jsou součástí buněčné membrány. Působí buď autokrinně (ovlivňují buňku, která je vyloučila), parakrinně (působí v okolí buňky, která je vyloučila) nebo endokrinně

(působí na vzdálené buňky). Cytokiny jsou produkovány téměř všemi buňkami, avšak nejvíce Th buňkami a makrofágy (Zhang a An, 2007).

Na základě rozdílné funkce rozdělujeme cytokiny do mnoha skupin. Na **interleukiny** (regulují imunitní reakce), **lymfokiny** (aktivují makrofágy), **chemokiny** (stimulují regulovanou migraci neboli chemotaxi), **interferony** (antivirový účinek), **TGF** (transforming growth factors – regulují embryonální vývoj a nádorové přeměny buněk), **CSF** (colony stimulating factors - stimulují granulocyty a makrofágy) a **TNFs** (Tumour necrosis factors – cytotoxická a regulační funkce) (Parkin a kol., 2001).

3.3 PROTINÁDOROVÁ IMUNITA

Nádorové buňky vznikají nekontrolovatelným dělením původní zdravé buňky, z toho vyplývá, že nádory na svém povrchu nesou antigeny, které mohou být rozeznané buňkami imunitního systému, avšak tyto antigeny jsou tolerovány jako sobě vlastní (Klener a Klener jr., 2010). Dojde-li k rozpoznání antigenu, tak se na jeho likvidaci podílejí téměř všechny složky vrozené (NK buňky, neutrofily, makrofágy) a získané (protilátky aktivující fagocytózu, komplement a CTL) imunity. Problémem ovšem je, že nádory využívají mechanismy, díky kterým se před imunitním systémem schovají (Hořejší a kol., 2017). Avšak v dnešní době můžeme laboratorně prokázat nádorové markery, kterými se nádorové bujení projevuje (Abrahámová a kol., 2008).

3.3.1 Imunoeditace

Immunoeditace (*cancer immunoediting*) je dynamický proces, během kterého dochází k interakci mezi nádorem a imunitním systémem. Imunitní editace se skládá ze tří fází, tzv. „3E“: eliminace, rovnováha a únik (*elimination, ekvilibrium, escape*) (Calì a kol., 2017).

Během fáze **eliminace** dochází k rozpoznání a likvidaci nádorových buněk za spolupráce získané (T buňky) a vrozené (NK buňky) imunity. Buňky specifické a nespecifické imunity jsou aktivovány cytokiny. Sekretované cytokiny infiltrují imunitní buňky, které následně produkují další cytokiny, jako například IFN-γ nebo IL-12. K likvidaci nádorových buněk dochází pomocí NK buněk, které k aktivaci specifické imunity využívají Fas ligand a perforin (Kim a kol., 2007). Nádorové buňky se stále

vyvíjejí a vznikají u nich mutace, které mění jejich charakter. Vznikají nádorové buňky, které tak unikají eliminaci a vstupují do další fáze (Calì a kol., 2017).

Během fáze **rovnováhy** nejsou nádorové buňky zcela eliminovány, jelikož buňky neproliferují a jsou ve stálém konstantním malém počtu, který není klinicky prokazatelný. Tato fáze může trvat i roky bez jakýchkoli klinických příznaků. Jestliže v této fázi dojde k transplantaci postiženého orgánu, hrozí propuknutí u recipienta (Hatina, 2005).

Během fáze **úniku** nedochází k prezentaci nádorových buněk aktivovanými dendritickými buňkami T lymfocytům. K úniku dochází ať už vlivem oslabeného imunitního systému nebo mutací nádoru. Po uniknutí nádorových buněk imunitě se buňky začínají nekontrolovatelně množit a začínají se objevovat i klinické příznaky rakoviny (Dunn a kol., 2004).

3.3.2 Únik nádorových buněk imunitnímu systému

Úkolem imunitního systému je efektivně bojovat proti cizorodým patogenům, na druhou stranu musí rozeznat a zachovávat naše vlastní buňky. Na aktivitu imunitního systému mají vliv stimulační a inhibiční signály. Nádorové buňky si vyvinuly mnoho mechanismů, díky kterým je snížená imunogenita nádorových buněk, imunitní systém není schopen buňky rozeznat a mohou tak přetrvat v těle hostitele. Mnoho způsobů úniku nádorových buněk se podobá úniku infekčních mikroorganismů (Hořejší a kol., 2017).

Nádorové buňky ke svému úniku před imunitním systémem využívají mechanismy, jako jsou například snížená prezentace antigenu na povrchu nádoru, a tím způsobená vysoká variabilita, nízká exprese MHC I molekul, Fas ligand a produkce faktorů inaktivující T lymfocyty. Dalším faktorem jsou metastáze, které změnou své lokace znesnadňují zacílení imunitního systému (Vinay a kol., 2015).

Snížená prezentace antigenu na povrchu nádoru je jedním z obranných mechanismů nádoru. U metastází je snížená exprese antigenů vyšší než u primárního nádoru. Mimo to mutace vzniklé v oblasti nádorového antigenu mohou vést k vyšší heterogenitě nádorových lézí. Heterogenita nádorových antigenů redukuje schopnost

imunitního systému zacílit a zneškodnit nádorové buňky (Vinay a kol., 2015). Nádor také využívá tzv. maskování antigenu, které je způsobeno překrytím antigenu molekulami glykokalixu (např. kys. sialovou) (Šťastný a kol., 2015).

Schopnost imunitního systému může být též potlačena **sníženou expresí MHC I molekul** na povrchu nádorových buněk, čímž unikají před CTL (Villalba a kol., 2013). Avšak snížená exprese MHC I molekul je signál pro NK buňky. Proto nádorové buňky exprimují pozměněné MHC Ib molekuly, které NK buňky považují za vlastní, což vede k vyššímu množství výskytu tumorů a metastáz (Haynes-Gilmore a kol., 2014).

Dalším obranným mechanismem před imunitním systémem je **Fas ligand**. Fas ligand (CD95L) po vazbě na Fas receptor (CD95), který je produkován v thymu, ledvinách, srdci a játrech, spouští apoptózu. Fas ligand i Fas receptor se nacházejí na T buňkách. Naváže-li se Fas ligand na Fas receptor, spustí se vlastní destrukce apoptózou. Tohoto principu využívají nádorové buňky, které sníží expresi Fas receptoru a buňky poté nejsou citlivé vůči lymfocytům majícím Fas ligand. Na druhou stranu nádorové buňky zvyšují expresi Fas ligandu, který se váže na Fas receptor lymfocytů a tím způsobuje jejich apoptózu (Motz a kol., 2014).

V protinádorové imunitní odpovědi hrají důležitou roli též **Tregs**, neboli regulační T lymfocyty vzniklé z CD4+ (Yamagiwa a kol., 2001). Funkcí je tolerance vůči vlastním antigenům (prevence autoimunitních chorob), regulace homeostázy v imunitním systému a modulace imunitní odpovědi v průběhu infekce. Tregs tvoří 5-10% T lymfocytů, kterou mohou způsobovat růst nádoru a negativně ovlivňovat funkce ostatních T lymfocytů (Klasbusay, 2015). Tregs jsou do nádoru naváděny chemokiny, které nádorové buňky produkují (Curiel a kol., 2004). Odstraníme-li Tregs, dojde sice k zesílení protinádorové obrany, ale na druhou stranu hrozí vznik autoimunitního onemocnění (Hořejší a Bartůňková, 2009). Regulační T lymfocyty produkují řadu faktorů, jako jsou například IL-6, IL-10 nebo TGF-β, díky nimž regulují nádorové mikroprostředí a inhibují efektorové T lymfocyty (Klasbusay, 2015). Produkovaný IL-10 je zodpovědný za nádorovou toleranci (Facciabene a kol., 2012).

MDSCs (myeloid-derived supressor cells) jsou buňky vyskytující se jak v nádoru, tak i v krvi a lymfoidních tkáních, potlačující imunitní odpověď (Parker a kol., 2015). MDSCs jsou myeloidního původu a jsou produkovány v kostní dřeni.

Produkují IL-10, který potlačuje nespecifickou imunitu a zánětlivé reakce. Dále podporují tvorbu Tregs, čímž snižují protinádorovou T buněčnou odpověď (podporují proliferaci Th2, které mají omezenou protinádorovou funkci oproti Th1) (Perez-Gracia a kol., 2014).

Makrofágy M2 jsou regulační buňky, které snižují imunitní odpověď proti nádorovým buňkám. Stejně jako MDSCs a Tregs podporují mikroprostředí nádoru tím, že ovlivňují T buněčnou odpověď produkcí IL-10, TGF-β a VEGF (Mantovani a kol., 2010).

Nádorové buňky dále produkují inhibující molekuly jako je VEGF (*vascular endothelial growth factor*), CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte antigen-4*), LAG-3 (*lymphocyte activation gene-3*), TIM-3 (*T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3*) a receptor PD-1 (*programmed death-1*) (Perez-Gracia a kol., 2014). **VEGF** inhibuje diferenciaci dendritických buněk a spolu s TGF-β a IL-10 inhibují maturaci dendritických buněk, které se poté stávají tolerantními vůči nádorovým antigenům (Gabrilovich a kol., 2004).

Všemi těmito mechanismy se nádor snaží skrýt před imunitní kontrolou. Organismus jej tak považuje za neškodný a z toho důvodu na něj nereaguje.

3.3.3 Nádorové markery

Nádorové markery jsou proteinové molekuly, díky kterým lze prokázat riziko vzniku, přítomnost, prognózu a účinnost nebo neúčinnost terapie nádorového onemocnění. Jsou obsaženy v krvi pacienta s nádorovým onemocněním. Diagnostické vyšetření nádorových markerů umožnuje odhalit tumor o hmotnosti 1mg, tedy 10^6 nádorových buněk. Při vyšetření běžnými diagnostickými metodami jako je CT, RTG nebo mammograf se odhalí nádor, který má nejméně 10^9 buněk, takový nádor už je v průměru 1-2 cm velký a schopný metastazovat (Abrahámová a kol., 2008).

Nádorové markery:

- **Onkofetální antigeny** jsou antigeny exprimované na povrchu buněk v průběhu fetálního vývoje. Jelikož je po porodu tvorba těchto antigenů velice slabá, zvýšená produkce u dospělého člověka většinou značí přítomnost nádorového onemocnění. Řadíme sem AFP (alfa1-fetoprotein), HCG (lidský choriový

gonadotropin), CAE (karcinoembryonální antigen) a PLAP (placentární alkalická fosfatáza) (Abrahámová a kol., 2008).

- **Tkáňové a orgánové specifické antigeny** jsou obsaženy ve zdravých orgánech a tkáních, mimo se vyskytují jen zřídka. Při patologických stavech se antigeny začnou samovolně vylučovat do krve. Řadíme sem PSA (prostatický specifický antigen), PAP (prostatickou kyselou fosfatázu), NSE (neuron specifickou enolázu), TG (tyreoglobulin), mozkový S-100 protein, rozpustné fragmenty cytokeratinů (TPS, TPA, CYFRA 21-1) a SCC (antigen ze skvamózních buněk) (Abrahámová a kol., 2008).
- **Nespecifické antigeny** jsou hormony a enzymy produkované nádory. Řadíme sem feritin, LDH (laktát dehydrogenázu), TK (thymidinkinázu), CRP (C-reaktivní protein), β_2- mikroglobulin (Abrahámová a kol., 2008).
- **Genetické nádorové markery** prokazují přítomnost genů, které mohou způsobit vznik tumoru. Řadíme sem PC1 (nádor prostaty), BRCA1 a BRCA2 (nádor prsu a ovaria) (Abrahámová a kol., 2008).

3.3.4 Nádorové antigeny

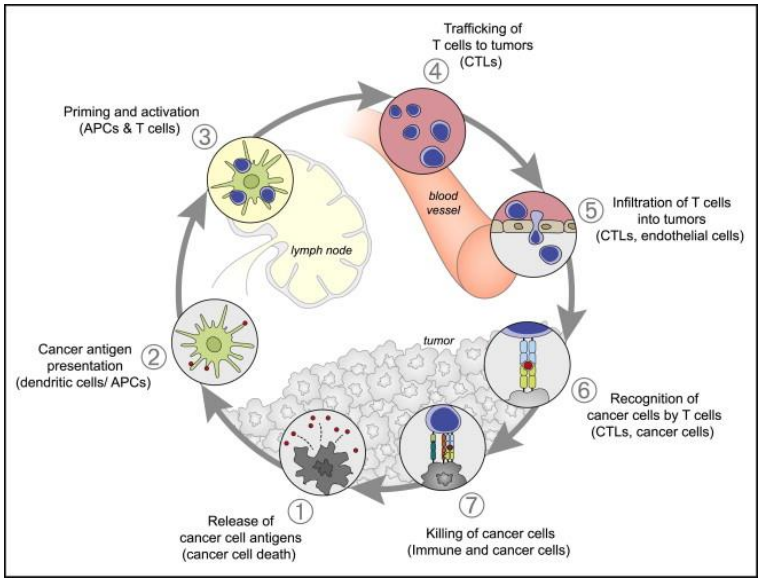
Úkolem imunitního systému je rozpoznat cizí antigen a spustit imunitní reakci. Nádorové buňky ovšem vyvinuly mechanismy, díky kterým se před imunitním systémem skrývají nebo je systém vyhodnotí jako buňky tělu vlastní. Nádor vytváří kolem sebe imunosupresivní prostředí, které potlačuje účinnost imunitní odpovědi a nádorové buňky jsou tak tolerovány a chráněny imunitním systémem (podobný princip jako u semialogenního štěpu, aby nedošlo k potratu) (Holtan a kol., 2009).

Rozeznáváme dvě skupiny nádorových antigenů. **TSAs** (*tumor-specific antigens*) jsou specifické pro nádorové buňky a nevyskytují se u jiných buněk. Vznikly z onkogenních virů nebo ze zmutovaných vlastních proteinů. Maligní nádory exprimují TSAs jako produkt genomové nestability. (Steer a kol., 2010). **TAAs** (*tumor-associated antigens*), neboli neoantigeny, jsou antigeny specifické pro nádorové buňky, ale vyskytují se i u jiných buněk a tkání (Vigneron a kol., 2015). Neoantigeny vznikají mutací a způsobují změnu pořadí kódujících sekvencí aminokyselin. Tyto mutace mohou být poté zpracovány a prezentovány na povrchu buňky a rozpoznány T buňkami. Jelikož normální tkáně nepodléhají této somatické mutaci, neoantigenně specifické

T lymfocyty jsou ideálním prostředkem při imunoterapii zacílené na neoantigeny (Lu a Robbins, 2016). Mezi TAAs zahrnujeme onkospermatogonální antigeny (například diferenciální antigeny, onkofetální antigeny, Her2 proteiny, wild type forma p53, ESO nebo MAGE). Antigeny se nacházejí na povrchu buněk v komplexu s MHC I. třídy nebo v cytoplazmě. Když buňka zemře, jsou antigeny fagocytovány APC buňkami a prezentovány na povrchu buňky v komplexu s MHC II. třídy (Steer a kol., 2010).

3.3.5 Nádorový-imunitní cyklus

Nádorový-imunitní cyklus (*cancer-immunity cycle*) znázorňuje pořadí kroků vedoucích k likvidaci nádorových buněk (Obr. 1). První krok cyklu znázorňuje TAAs (tumor-asociované antigeny) produkované nádorovými buňkami, na které se následně naváží DCs pro zpracování. V druhém kroku DCs prezentují navázaný antigen v komplexu s MHC I a MHC II T lymfocytům. Třetí krok vyobrazuje priming a aktivaci efektorové T-buněčné linie reagující proti specifickým nádorovým antigenům, které jsou vnímány jako cizí. Charakter imunitní odpovědi je stanovován právě v tomto stádiu, kdy je kritická rovnováha mezi T-efektorovými a T-regulačními buňkami, která určuje finální výsledek. Ve čtvrtém kroku aktivované T-efektorové buňky migrují a v pátém kroku infiltrují nádorové ložisko. Šestý krok znázorňuje T-efektorové buňky specificky rozpoznávající a vážící se na nádor skrze interakci mezi T buněčným receptorem (TCR) a jeho příbuzným antigenem vázaném na MHC I. V sedmém kroku buňky imunitního systému zabíjejí nádorové buňky. Zabití nádorové buňky uvolní další TAAs (začíná opět první krok), což zvýší rozsah a hloubku imunitní odpovědi v následujícím cyklu. Avšak u pacientů s nádorovým onemocněním nádorový-imunitní cyklus nepracuje optimálně. Nádorové antigeny nejsou detekovány imunitním systémem. DCs spolu s T buňkami nevnímají nádorové antigeny jako cizí, a tudíž se tvoří T-regulační buňky spíše než T-efektorové buňky. T buňky jsou nejčastěji během infiltrace nádoru inhibovány nebo nádor vyplavuje faktory do svého mikroprostředí, čímž dochází k potlačení T-efektorových buněk (Motz a Coukos, 2013).



Obr. 1: Nádorový-imunitní systém (Chen a Mellman, 2013).

3.3.6 Nádor a zánět

Přítomnost nádoru v organismu způsobuje rozvrat přirozené homeostatické rovnováhy. Tělo na rozvrat reaguje aktivováním vrozené imunity a spuštěním zánětlivé reakce (Lu a kol., 2006). Receptory rozpoznávající motivy (PRR, *pattern recognition receptors*) spouští signální kaskádu, která způsobuje zánětlivou odpověď. Vyskytují-li se cizorodé antigeny v těle organismu, PRR rozeznávají PAMPs (*Pathogen-associated molecular patterns*) nacházející se na povrchu cizorodých částic. Jedná-li se o nádorové onemocnění, PRR rozeznávají DAMPs (*Damage-associated molecular paterns*) (Takeuchi a Akira, 2010).

Doposud jsou známé 4 druhy PRRs, které jsou tvořeny buď transmembránovými nebo cytoplazmatickými proteiny. Transmembránové proteiny zahrnují CLRs (*C-type lectin receptors*) a TLRs (*Toll-like receptors*). Mezi cytoplazmatické proteiny patří NLRs (*NOD-like receptors*) a RLRs (*RIG-I-like receptors*). PRRs jsou exprimovány nejen na povrchu dendritických buněk a makrofágů, ale i na neprofesionálních imunitních buňkách (Takeuchi a Akira, 2010).

Za přítomnosti PAMPs nebo DAMPs dochází k aktivaci PRRs, které zvyšují transkripci genů, tvořících zánětlivou odpověď (vyjma NLRs). Transkribované geny kódují prozánětlivé cytokiny (INF-α, INF-β, TNF-α, IL-1, IL-6, chemokiny, proteiny upravující PRR signalizaci a další necharakterizované proteiny), které regulují apoptózu

buněk v zánětlivé tkáni a indukují expresi proteinů akutní fáze. Exprese genů závisí na množství aktivovaných PRRs (Takeuchi a Akira, 2010).

3.4 ÚLOHA VROZENÉ IMUNITY V PROTINÁDOROVÉ OBRANĚ

Imunitní systém zahrnuje vůči infekčním antigenům koordinovanou odezvu vrozených a adaptivních imunitních buněk, pracujících v souladu s mnoha regulátory interakcí a ovlivňujících obě ramena imunitního systému. Přesto se ale mnoho terapeutických strategií pro posílení imunitní odezvy proti nádorům zaměřilo převážně na stimulaci získané imunity. Nicméně rostoucí přínos buněk vrozené imunity pro protinádorovou imunitu, zejména v kontextu kombinované imunoterapie, vede k novým strategiím využívajících vrozenou imunitní odpověď proti rakovině (Moynihan a Irvine, 2017).

Rozlišujeme dvě hlavní teorie imunitní odpovědi proti nádorovým buňkám. První teorií je ***immunosurvillance*** (teorie imunologického dohledu), kdy imunitní systém rozpoznává a eliminuje nádorové buňky. Průběh reakce mezi nádorem a imunitním systémem se dělí do tří částí: *elimination* (eliminace), *ekvilibrium* (rovnováha) a *escape* (únik). Díky těmto mechanismům může být vznikající nádorová buňka eliminována efektorovými buňkami, například NK buňkami (Kim a kol., 2007).

Druhou teorií je **Danger model**, jenž popisuje, jak imunitní systém funguje. Imunitní systém potřebuje antigen prezentující buňky (APC), jako jsou aktivované makrofágy, dendritické buňky nebo B buňky stimulující T buněčnou odpověď, aby vyhodnotil cizí antigen jako nebezpečný. Danger model vychází z toho, že imunitní systém nepovažuje nádorové buňky za nebezpečné, a proto není imunitní odpověď zahájena (Fuchs a Matzinger, 1996).

Jak jsem již výše zmínila, díky rychlé aktivaci buněčných a humorálních složek zajišťuje vrozená imunita první obrannou reakci organismu proti škodlivým agens. Jako první se cizí patogen potkává s anatomickou a fyziologickou bariérou (pokožka, lysozym, mukóza). Hlavními činiteli buněčné složky jsou neutrofily a myeloidní makrofágy, které fagocytují patogeny. Dendritické buňky spolu s makrofágy tvoří antigen prezentující buňky. Humorální složka je tvořena především komplementem a cytokiny (Beutler, 2004).

Buňky vrozené imunity rozpoznávají cíle svého ataku díky uzpůsobeným receptorům, PRR. Těmito receptory buňky vrozené imunity rozpoznávají PAMPs motivy, tedy motivy spojené s patogeny. Avšak žádné takovéto motivy na nádorových buňkách neexistují. PRR jsou aktivovány pouze nespecificky, a to DAMPs látkami uvolňovanými při poškození tkáně. Přesto je známo, že buňky vrozené imunity mají určitou spontánní schopnost detekovat nádorové buňky a likvidovat je. Doktor Yan popsal schopnost neutrofilů ze zdravých dárců poznávat a zabíjet nádorové buňky, nicméně neutrofily od různých dárců se těmito schopnostmi velmi lišily (Yan a kol., 2014). Schopnost rozpoznat a zabít nádorové buňky bez primární zvýšené citlivosti mají rovněž NK buňky (Marcus a kol., 2014). Jejich účinnému působení ale brání exprese MHC Ib molekul na nádorových buňkách (Smith a kol., 2013). Na druhou stranu neaktivované TAM (*tumor-associated macrophages*) nádory podporují a jejich výskyt je spojen se špatnou prognózou nádorových pacientů.

Vědci se dříve domnívali, že hlavní roli v protinádorové obraně hraje získaná imunita, především ADCC (buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách). Ovšem v roce 1999 přišel profesor Cui s tím, že nádory by mohly být zničeny buňkami vrozené imunity. Profesor Cui prováděl se svým týmem pokusy na myších typu BALB/c, kterým naočkoval 200 tisíc buněk sarkomu S180. Avšak jedna myš nevykazovala žádné příznaky výskytu nádoru, a proto byla dávka navýšena na 400 tisíc a poté až na 20 milionů buněk sarkomu, ale i přesto se nádor neuchytil. Odolnost myši byla způsobena rychlou a masivní infiltrací leukocytů na místo výskytu rakovinných buněk. Leukocyty formují nejprve agregáty a vytváří rosety okolo nádorových buněk, které jsou poté likvidovány pomocí cytolýzy, aniž by došlo k poškození okolní tkáně (Cui a kol., 2003; Hicks a kol., 2006).

Myš, která byla i přes aplikaci vysoké dávky nádorových buněk odolná vůči nádoru, byla namnožena a ukázalo se, že 40% potomků vlastnilo tutéž resistenci vůči nádorům. Takto byla objevena dominantní mutace genu u myší. Kromě nádorové rezistence mutace způsobovala navíc ještě spontánní regresi. Z tohoto důvodu se mutace genu označuje jako SR/CR (spontaneous regression/*Cancer Res*istant). Výzkumy ukázaly, že mutace genu SR/CR je ovlivňována stářím myši. Myši mladší 4 měsíců byly zcela rezistentní vůči nádoru, avšak u starších myší se nádor objevil. Zjistilo se, že

v určité fázi došlo ke stagnaci zmutovaného genu a poté až k samovolnému zániku (Hicks a kol., 2006).

Zheng Cui se svým týmem zkřížili myš se SR/CR mutací s jinými kmeny myší (bezthymové C57BL/6$^{foxn1/foxn1}$, CAST/Ei nebo C57BL/6), což vedlo k přenosu mutace na potomky. Díky použití myší bez thymu bylo zjištěno, že se při likvidaci nádorových buněk uplatňuje vrozená imunita (neutrofily, makrofágy a NK buňky). Jelikož T lymfocyty se u bezthymových C57BL/6$^{foxn1/foxn1}$ myší vyskytovaly jen v malém množství, bylo jasné, že nádor musel být zlikvidován buňkami vrozené imunity. Profesor Cui usoudil vzhledem k reakci SR/CR myší na rakovinné buňky, že vrozená imunita bude hrát důležitou roli v odpovědi na nádorové buňky (Cui a kol., 2003; Hicks a kol., 2006).

3.5 MECHANISMY ROZPOZNÁVÁNÍ A LIKVIDACE NÁDOROVÝCH BUNĚK BUŇKAMI VROZENÉ IMUNITY

Buňky imunitního systému neboli leukocyty vznikají z kmenových buněk. Kmenové buňky rozdělujeme na myeloidní a lymfoidní řadu. Z buněk myeloidní řady vznikají jak erytrocyty a trombocyty, tak buňky imunitního systému, jako jsou makrofágy, neutrofily, bazofily, eozinofily, monocyty, žírné buňky a dendritické buňky. Lymfoidní řada dává vznik kromě lymfocytů B a T i NK buňkám (Janeway a kol., 2001).

3.5.1 Neutrofily

Neutrofily řadíme mezi leukocyty myeloidního původu do skupiny granulocytů. Buňky patřící do řady granulocytů se vyznačují segmentovaným jádrem a výskytem granul v cytoplazmě, které mají vliv na vznik jejich efektorových funkcí. Výskyt neutrofilů v lidské periferní krvi činní 50-70% ze všech leukocytů. Neaktivované neutrofily cirkulují v krevním oběhu zhruba 5-6 dní. Aktivované neutrofily přežívají jen pár hodin (Kolaczkowska a Kubes, 2013). Samotný nádor má vliv na množství neutrofilů v těle i v nádoru, a proto mnoho pacientů v pokročilém nádorovém stádiu trpí neutrofilií. Neutrofilie je obvykle vnímána jako negativní prognostický činitel (Schmidt a kol., 2005).

Neutrofily reagují jako první na infekce a zranění. Patogenní motivy a endogenní produkty nekrózy, jako jsou např. DAMPs (*Damage-associated molecular patterns*) aktivují receptory v neutrofilech. Jelikož pokročilá stádia rakoviny jsou přirovnávána k ráně, která se nehojí, vznikají stavy v nádorovém mikroprostředí jako je - hypoxie, hladovění živinami, buněčná proliferace a nekróza, ty pak vedou k uvolňování DAMPs, které mohou navodit a aktivovat neutrofily. Zatímco v souvislosti s bojem proti infekcím je neutrofilní zánět prospěšný, v mikroprostředí nádoru má méně předvídatelné účinky. Neutrofily jsou důležitou součástí imunologického sledování, které je kritické při ochraně hostitele před rozvojem rakoviny a progresí onemocnění (Singel a Segal, 2016).

Při chronickém zánětu neutrofily zhoršují hojení ran. Nedávná studie u diabetického myšího modelu ukázala, že tvorba neutrofilních extracelulárních s (NETs) zhoršuje hojení ran, a že narušením NETozy bylo hojení ran zvýšeno (Wong a kol., 2015).

Neutrofily, hlavní efektory vrozeného imunitního systému, se dříve zřídka považovaly za protinádorový terapeutický nástroj. Avšak nedávné studie používající zvířecí modely a předběžné klinické studie však zdůraznily potenciální protinádorovou účinnost neutrofilů (Yan a kol., 2014).

Kromě toho lidé s genetickou vadou neutrofilní myeloperoxidázové funkce (podílí se na degranulaci neutrofilů) vykazují zvýšený výskyt maligních onemocnění (Lanza, 1998).

3.5.1.1 ROZPOZNÁNÍ

Neutrofily vyskytující se běžně v krevním řečišti jsou v neaktivní formě, aby nedošlo k samovolné degranulaci granul do extracelulární matrix a nepoškodila se tak okolní tkáň. Aktivace neutrofilů nastává jen v případě přítomnosti určitých signálů, např. cytokinů (GM-CSF, TNF-α) nebo bakteriálních produktů. Během aktivace neutrofilu je na jeho povrch nasyntetizován receptor, zvyšuje se jeho afinita a indukuje transkripci nových cytokinů a receptorů. Nově nasyntetizované receptory jsou ukotveny v granulích (Woodfin a kol., 2009).

Existují společné mechanismy zprostředkovávající šíření neutrofilů do ran a nádorů. Příliv neutrofilů do nádorového mikroprostředí je pod vlivem samotných **neutrofilů** (CCL3, CXCL1,2,6), **tumor infiltrujících lymfocytů a makrofágů** (CCL3, IL 8) (Fridlender a Albelda, 2012) a **chemokinů produkovaných nádorovými buňkami** (IL 8, CXCL6, GM-CSF, G-CSF) (Gijsbers a kol., 2005).

Peroxid vodíku je první atraktant uvolněný poškozenou tkání (Niethammer a kol., 2009). Ten je vnímán neutrofily Src rodinnou kinázou Lyn, která je nutná pro časnou neutrofilní odezvu na zranění (Yoo a kol., 2011).

Další signály uvolňují lipidové mediátory, jako **LTB4.** Na myších pokusech bylo prokázáno, že LTB4 aktivuje neutrofily k migraci do místa poškozené tkáně (Lämmermann a kol., 2013).

Obecně platí, že neutrofily hrají hlavní roli při zánětu v nádoru, protože jsou přitahovány ligandy CXCR2 jako jsou CXCL1, CXCL2 a CXCL6 (Coffelt a kol., 2016). Nekrotická tkáň uvolňuje po poškození ATP, aktivuje inflammazóm NLRP3 prostřednictvím receptoru P2X7, který může zprostředkovat chemokinový gradient **CXCL2** (MIP-2) a **CXCL1** (McDonald a kol., 2010). CXCL2 je regulován TLR2 a S100A9 a zprostředkovává nábor neutrofilů (Moles a kol., 2014). Kromě toho bylo prokázáno, že CXCL1 a G-CSF lokálně rekrutují neutrofily do oblastí s poraněním srdce (Anzai a kol., 2015). Navíc chemokiny jako CXCL8 a IL-8 rekrutují neutrofily prostřednictvím chemokinových receptorů CXCR1 a CXCR2 k poškozeným tkáním (de Oliveira a kol., 2013).

Receptory spojené s **G-proteinem** se také podílejí na náboru neutrofilů. Bylo zjištěno, že při zánětu jater a sterilním poškození zprostředkovávají nábor neutrofilů receptory formylpeptidu Fpr1 a Fpr2 (McDonald a kol., 2010; Liu a kol., 2014).

Poškozená tkáň a hypoxie vedou k produkci **VEGF-A**, jež rekrutuje neutrofily exprimující pro-angiogenní MMP9 (*Matrix metallopeptidase 9*), což přispívá k revaskularizaci zraněné tkáně (Christoffersson a kol., 2012). MMP9 je také důležitá pro remodelaci kolagenu po poškození tkáně, které podporuje reparaci a regeneraci tkáně (LeBert a kol., 2015).

Existuje několik skupin receptorů exprimovaných na povrchu neutrofilů, zahrnující G-protein transmembránový receptor, Fc-receptor, adhezivní molekuly jako selektiny, integriny, různé cytokinové receptory, TLR a lektiny typu C. Aktivace těchto receptorů vede ke komplexním procesům aktivace a eliminace buněk, jako je fagocytóza, exocytóza intracelulárních granulí, produkce kyslíkových radikálů, uvolňování neutrofilních extracelulárních pastí (TRAPs), chemotaktická migrace nebo uvolňování chemokinů a cytokinů (Futosi a kol., 2013).

3.5.1.2 LIKVIDACE

Je prokázáno, že neutrofilová schopnost zabít buňky je velmi specifická a netransformované buňky neutrofily většinou ignorují.

Výzkumy Yan a kol. ukázaly, že neutrofily některých zdravých dárců mají přirozeně silnou aktivitu zabíjení transformovaných buněk. Zjistily, že u pěti lidských rakovinných buněčných linií, včetně buněk karcinomu prsu (SKBR-3), nemalobuněčného karcinomu plic (A549), karcinomu děložního čípku (Hela), karcinomu vaječníků (SKOV-3) a karcinomu pankreatu (Capan-1), které byly použity jako cílové buňky, byly všechny cílové nádorové buňky náchylné k usmrcení zdravými neutrofilními buňkami získanými od zdravého dárce. Tím se zjistilo, že aktivita zabíjení zprostředkovaná neutrofily je specifická pro nádorové buňky, jelikož neutrofily vykazovaly malou nebo žádnou cytotoxicitu proti netransformovaným prsním epiteliálním buňkám nebo primárním epiteliálním buňkám. Dalším významným zjištěním bylo, že někteří jedinci mají velmi aktivní neutrofily a neutrofily jiných pacientů nevykazovaly téměř žádnou protinádorovou aktivitu. Toto zjištění dokazuje, že neutrofily jsou velmi důležitou součástí imunologického dohledu, jež je kritické při rozvoji rakoviny a progresi onemocnění (Yan a kol., 2014).

Navíc bylo zjištěno, že kombinace β-glukanu a protinádorové mAb (monoklonální protilátky - ty jsou tvořeny nesmrtelnými myelomovými buňkami a B lymfocyty produkující specifické protilátky) primárně aktivuje neutrofily a vyvolává silnou aktivitu zabíjení proti iC3b-opsonizovaným nádorovým buňkám (Xiang a kol., 2012).

Některé druhy rakoviny mohou být zvláště citlivé na léčbu, která zvyšuje nebo obnovuje funkci neutrofilů u pacientů s nádorovým onemocněním, jako je GM-CSF (také známý jako CSF 2) nebo G-CSF (známý jako CSF3). Předchozí klinické studie používající GM-CSF prokázaly úplnou nádorovou remisi (Arellano a Lonial, 2008). Kromě toho byly protinádorové účinky posíleny prodlouženým užíváním G-CSF, který stimuluje intenzivní a trvalou neutrofilii s masivní nádorovou infiltraci neutrofily (Souto a kol., 2011).

Zranitelnost nádorových buněk vůči neutrofilním útokům může být dále posílena přidáním mTOR inhibitorů (rapamycin), které inhibují růst a proliferaci nádoru (Yan a kol., 2014).

Neutrofily likvidují cíl třemi způsoby: fagocytózou, frustrovanou fagocytózou nebo tvorbou NETs.

Prvním mechanismem likvidace cizorodých buněk neutrofilů je **fagocytóza** a zabíjení cizorodých materiálů pomocí uvolněných aktivovaných defensinů a cytokinů (TNF-α, IL-1, IFNs) (Mantovani a kol., 2011). V průběhu fagocytózy dojde k pohlcení cizorodého organismu, poté vznikne fagosom uvnitř neutrofilu, do kterého se uvolnují ROS (*reactive oxygen species*) a azurofilní granula vzniklé NADPH oxidázou ve fagosomu (DeLeo a kol., 1999). Úlohou ROS je poškození membrány cizorodého organismu a tím ochránit hostitele (Fialkow a kol., 2007). ROS mohou mít buď cytotoxický (vedoucí k regresi tumoru) nebo genotoxický efekt (iniciace poškození DNA) (Güngör a kol., 2010). Z fagosomu vzniká fagolysozom, uvnitř kterého dojde k degradaci pohlceného materiálu. Fagolysozom obsahuje enzymy redukující molekulární kyslík do O_2^- , díky kterému vzniká ROS. Pomocí neutrofil-specifického enzymu myeloperoxidázy obsaženého v azurofilních granulích, může být superoxidový radikál s chlorem katalyzován na kyselinu chlornou (Fialkow a kol., 2007).

Druhým typem likvidace buněk je **frustrovná fagocytóza**, označující proces, kdy neutrofil není schopen pohltit cílovou cizorodou strukturu v důsledku její velikosti. Následkem toho dochází k uvolnění ROS a obsahu neutrofilních granul exocytózou do okolí buňky (Herant a kol., 2006). Tento proces způsobuje poškození buňky bez způsobených poruch okolní tkáně (Labrousse a kol., 2011). Velikost cílové buňky

pravděpodobně neutrofily rozpoznávají pomocí fagocytárního receptoru dectin-1 (Branzk a kol., 2014).

Třetím druhem likvidace buněk je tvorba **extracelulárních neutrofilních sítí, NETs**, jež tvoří síťovitou strukturu zachycující mikroby a bránící jejich rozšíření z místa infekce. NETs tvoří plochu 10x až 15x větší než je velikost původní buňky (Brinkmann a kol., 2004). NETs využívají neutrofily k likvidaci velkých cílů, které nemohou fagocytovat. NETs vznikají procesem NETózy. NETóza je forma apoptózy, jejímž výsledkem je vznik vláknité sítě jaderného chromatinu nesoucího globulární domény, jež obsahují proteiny z primárních (elastáza, MPO, katepsin G), sekundárních a terciálních granulí (gerlatináza a laktoferin). Tvorba NETs požaduje primární stimulaci např. TLR4 mikrobiálními produkty a přemostění receptoru CR3 (Brinkmann a Zychlinsky, 2012).

Aktivované neutrofily prodělávají morfologické změny. Během první minuty po aktivaci dochází ke zploštění neutrofilu a k jeho připojení k podkladu. V průběhu první hodiny dojde k rozpadu jádra, dekondenzaci chromatinu, k oddělení vnitřní a vnější jaderné membrány a rozpadu granulí. Po první hodině se nukleoplasma a cytoplasma mění v homogenní masu a jaderný obal se separuje do vezikulů. Závěrem se buňka vypoukne, membrána praskne a buněčný obsah se vylije do extracelulárního matrix, kde vznikají NETs, jež vyžadují výskyt ROS (Fuchs a kol., 2007).

NETs nejsou obaleny žádnou membránou. Tubulin a aktin v NETs nejsou obsaženy (Brinkmann a kol., 2004). NETs byly dříve pozorovány pouze u infekcí, avšak dnes již byla jejich přítomnost prokázána i v nádorovém mikroprostředí (Urban a kol., 2006; Park a kol., 2016).

3.5.1.3 TVORBA NETs A RAKOVINA

Trombóza je druhou nejčastější příčinou smrti u pacientů s rakovinou (Rickles a kol., 1992). Hlavními rysy chronické myelogenní leukémie (CML) je přebytek granulocytárních myeloidních buněk s různými stupni zrání (Champlin a kol., 1985) G-CSF je cytokin produkovaný leukocyty a endotelem a často je spojován s leukocytózou a neutrofilií. G-CSF je také produkován různými nádory a rakovinnými buňkami (Kowanetz a kol., 2010), včetně leukemických buněk pacientů s CML v chronické fázi

(Jiang a kol., 1999). G-CSF aktivuje neutrofily, stimuluje oxidační metabolismus (Avalos a kol., 1990) a zvyšuje agonisty indukovanou agregaci trombocytů *ex vivo* (Spiel a kol., 2011).

Dříve se domnívali, že NETs fungují pouze jako mechanismus zabíjení bakterií (Brinkmann a kol., 2004). Později však bylo zjištěno, že NETs podporují trombózu (Brill a kol., 2012) a koagulaci (Massberg a kol., 2010). Při kontaktu s bakteriemi se aktivují neutrofily a jejich primární odezvou je pohlcení patogenů do fagosomů. Kromě toho *in vitro* aktivace lidských neutrofilů se silným stimulem, jako je forbol-12-myristát-13-acetát nebo peroxid vodíku vede k tvorbě NETs (Fuchs a kol., 2007). Stejný účinek je pozorován při kombinaci slabších podnětů, jako je GM-CSF a LPS nebo C5a (Yousefi a kol., 2009). Protože zvýšení neutrofilů je charakteristickým znakem CML, předpokládá se, že maligní neutrofily mohou být náchylnější k formování NETs. Pomocí modelů ukotvených nádorů se ukázalo, že rakovina může vyvolat zvýšení neutrofilů v periferní krvi, které jsou senzibilizovány vůči tvorbě NETs, a že spontánní trombóza je spojena s generací NETs *in vivo*. Ukazuje se také, že G-CSF asociovaný s rakovinou předisponuje hostitele ke zhoršené vrozené imunitní odpovědi, která vede k protrombotickému stavu. Tento nález vysvětluje souvislost rakoviny s trombózou (Demers a kol., 2012).

3.5.1.4 NEUTROFILY A RAKOVINA

Neutrofily slouží jako bezpečnostní opatření eliminující rakovinné buňky ve velmi raném stadiu iniciace nádoru a neoplastické progrese (Schreiber a kol., 2011). Nicméně specifické reakce neutrofilů mohou podporovat progresi nádoru prostřednictvím řady určitých onkogenních signalizačních cest, včetně interakce s nádorem (Singel a Segal, 2016).

Bylo zjištěno, že rakovina způsobuje stav neutrofilní anergie a že jedinci s vadnou aktivitou zabíjení maligních buněk zprostředkovanou neutrofily mohou mít na prvním místě zvýšené riziko vzniku rakoviny. Je třeba poznamenat, že mnoho dalších faktorů by mohlo přispět k nižší účinnosti protirakovinového zabíjení, které vykazují neutrofily odvozené od pacientů s rakovinou. Například kuřačky ženského pohlaví měly výrazně sníženou funkci neutrofilů (Sato a kol., 2011).

Neutrofily vyskytující se v okolí nádoru označujeme jako **TAN** (*tumor associated neutrophils*) a mohou mít jak protumorovou, tak protitumorovou funkci). Rozeznáváme dva fenotypy TAN, N1 fenotyp (prozánětlivý, protinádorový) a N2 (protizánětlivý, pronádorový) fenotyp. Tento aspekt neutrofilů využívá nádor ke svému užitku. Avšak na druhou stranu lze tento charakter využít i v imunoterapeutické léčbě. Rozdíl mezi TAN a kmenovými neutrofily je ten, že TAN produkují až stokrát více cytokinů než nativní neutrofily. Dr. Fridlender se domnívá, že hlavní rolí neutrofilů je regulace imunitní odpovědi (Fridlender a kol., 2009).

N2 fenotyp TAN plní pronádorové funkce, jež se mohou vyvinout u neléčeného nádoru a svou funkci plní zejména v procesu jeho růstu. Fenotyp N2 TAN též podporuje angiogenezi, tlumí funkce CD8+ T lymfocytů a byl prokázán i jeho vliv na průběh metastazování. Nedostatek N2 TAN vede k zastavení růstu nádoru (Di Carlo a kol., 2005). TGF-β je důležitým nádorovým signálem pro N2 TAN a zabraňuje degranulaci neutrofilů. Blokováním TGF-β dojde ke změně N2 na N1 fenotyp TAN (Fridlender a kol., 2009).

N1 fenotyp TAN má za úkol inhibovat růst nádoru a likvidovat nádorové buňky. N1 TAN produkují také více FasL, tím označují nádor T lymfocytům a dochází k jeho následné destrukci. Dalším účinkem N1 fenotypu je produkce prozánětlivých cytokinů a aktivace CD8+ T lymfocytů. Výzkumy ukázaly, že izolované N1 TAN z nádoru produkují mnohem víc kyslíkových radikálů (Di Carlo a kol., 2005).

Neutrofily fungují jako dvojsečný meč, který může vykazovat jak nádorové, tak i inhibiční vlastnosti. Komplexní porozumění funkčnosti neutrofilů v rakovině by mohlo vést ke strategiím, které úmyslně vyvolávají „spontánní remisi“ (Souto a kol., 2011).

Neutrofily mohou usnadnit proliferaci nádorů tlumením imunitního systému. CD8+ T lymfocytární protinádorová odezva může být potlačena syntézou oxidu dusnatého (iNOS) nebo arginasou 1 (ARG1) uvolňovanou neutrofily stimulovanými TGF-β (Bodogai a kol., 2015). Také produkují MMP9, který hraje důležitou roli v iniciaci nádoru. Navíc nádorová proliferace může být zprostředkována odbouráváním inzulínového receptorového substrátu 1 (IRS1) a aktivací signalizace PI3K v důsledku transferu neutrofilní elastázy na rakovinné buňky (Houghton a kol., 2010). Je třeba poznamenat, že produkce iNOS může být také stimulována v neutrofilech zvýšením

regulace receptoru tyrosinkinázy MET (Finisguerra a kol., 2015). Nakonec neutrofily mohou motivovat metastatické šíření tím, že inhibují přirozené zabíječské funkce a usnadňují extravazaci nádorových buněk (Spiegel a kol., 2016).

Nádor produkuje chemokinové a cytokinové signály, jež způsobují opuštění neutrofilů z kostního řečiště a jejich vstup do tkání. Neutrofily jsou v kostní dřeni v neaktivní formě a aktivace nastává až po jejich vstupu do tkáně. Aktivované neutrofily jsou schopné vykonávat svou funkci. Neutrofily uvolňují chemokinové receptory CXCR1 a CXCR2, které jsou důležité pro chemotaxi (Murphy, 1997). Nádorové buňky exprimují pro tyto receptory různé ligandy usnadňující nábor TAN. TAN jsou nádorovým mikroprostředím stimulovány k produkci cytokinů, jež způsobují příliv dalších neutrofilů. Tímto vzniká tzv. pozitivní smyčka, jež vede k potlačení nádorového bujení (Fridlender a kol., 2009). Naopak příkladem protumorového cytokinu je v souvislosti s neutrofily (jinak působí protinádorově) GM-SCF (*Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*), který je produkován rakovinnými buňkami prsu a v kultivačních experimentech vyvolává u neutrofilů produkci onkostatinu M. Onkosantin M poté může zvyšovat produkci VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) a tím tak zvýšit invazivitu nádoru (Queen a kol., 2005). Myší T-buněčný lymfom a buňky Lewisova plicního karcinomu (LLC) exprimují LXR (*Liver X receptor*) oxysterolový ligand, u kterého bylo prokázáno, že najímá neutrofily prostřednictvím CXCR2 (Tab. 1) (Raccosta a kol., 2013).

Tab. 1: Faktory aktivující nábor neutrofilů a jejich vliv na nádorové mikroprostředí.

	NÁDOROVÝ PROCES	PROTEIN/ FAKTOR	NÁDOROVÝ/ TKÁŇOVÝ TYP	DRUH	AUTOR
Nábor TAN, pro-tumorová	nádorový růst, angiogenees	Oxysterol	T-buněčný lymfom, LLC	myš	Raccosta a kol., 2013
Nábor TAN, pro-tumorová	EMT/invaze, slabá prognóza	CXCL5	HCC	myš, člověk	Zhou a kol., 2012; Zhou a kol., 2015
Nábor TAN, pro-tumorová	iniciace nádoru	TNF-α	kůže	myš	Moore a kol., 1999
Nábor TAN, pro-tumorová	nádorový růst, metastáze	IL-17	karcinom prsu	myš	Coffelt a kol., 2015; Benevides a kol., 2015
Nábor TAN, pro-tumorová	nádorový růst	H_2O_2	kůže	*Danio rerio*	Feng a kol., 2010
Nábor TAN, pro-tumorová	nádorová invaze a migrace	HGF	adenocarcinom plic, LLC	myš, člověk	Wislez a kol., 2003; Finisguerra a kol., 2015
Nábor TAN, pro-tumorová	nádorová invaze a angiogeneze	VEGF/VEGFR	karcinom pankreatu	myš, *Danio rerio* xenograft	Nozawaa kol., 2006; He a kol., 2012
Pro-tumorová	angiogeneze	MMP9	spontánní metastáze	kuře	Bekes a kol., 2011; Nozawaa kol., 2006
Pro-tumorová	nádorová invaze a angiogeneze	Onkostatin M	karcinom prsu a plic	myš, člověk	Queen a kol., 2005
Pro-tumorová	EMT/invaze	CXCR2	kůže	*Danio rerio*	Freisinger a kol., 2014
Pro-tumorová	proliferace nádorových buněk	Prostaglandin E2	kůže	*Danio rerio*	Feng a kol., 2012
Pro-tumorová	inhibice T buněk	Argináza 1	NSCLC	myš, člověk	Rotondo a kol., 2009
Pro-tumorová	Metastáze, chemorezistence	CXCL1/2, CXCR2	karcinom prsu	myš	Acharyya a kol., 2012
Nábor TAN, pro-tumorová	nádorový růst, metastáze	CXCL6	melanom	myš	Verbeke a kol., 2011
Pro-tumorová	nádorový růst	NE	plíce	myš	Houghton a kol., 2010
Pro-tumorová /anti-tumorová	inhibice T buněk/aktivace, cytotoxicita	TGF-β	plíce	myš	Fridlender a kol., 2009
Anti-tumorová	aktivace T buněk (CD8+, CD4+)	OX-40L, 4-1BBL	plíce	člověk	Eruslanov a kol., 2014

Nedávné studie ukázaly, že působení neutrofilů na nádorovou imunitu je velmi složité. Bylo zjištěno, že neutrofily N1 mohou být vlivem působení TGF-β, jež je vylučován buňkami nádorového mikroprostředí, přeměněny na N2 neutrofily podobně jako makrofágy, o čemž se zminuji níže (Fridlender a kol., 2009).

3.5.2 Makrofágy

Makrofágy jsou podskupinou leukocytů a hrají důležitou roli v tkáňové homeostáze a imunitě. Hrají klíčovou roli ve vývoji krevních cév, odstraňují apoptické

buňky během tvorby končetin. Navíc udržují hematopoetický ustálený stav pohlcováním neutrofilů a eozinofilů v játrech a slezině (Wynn a kol., 2013). Makrofágy fagocytují cizorodé agens označené komplementem nebo protilátkou a produkcí oxidu dusnatého jej zabijí. Spoluúčastní se zánělivé reakce a granulomatózních procesů (Chaplin, 2010).

Makrofágy hrají při zánětlivých reakcích dvojí roli. Počáteční sekrecí zánětlivých mediátorů, jako je TNF-α, IL-1β a oxid dusnatý, aktivují antimikrobiální obranné mechanismy, jež likvidují invazivní agens. Avšak i přesto, že jsou zánětlivé makrofágy zpočátku prospěšné, vyvolávají také podstatné poškození tkání a musí být tedy rychle kontrolovány, jinak se stanou patogenními a přispívají k progresi onemocnění (Wynn a kol., 2013). Nejdůležitější funkcí makrofágů je ochrana těla před agresivními patogeny.

Makrofágy asociované s nádory (TAM) jsou polarizovány na dva odlišné fenotypy podle vzniku a vlivu na nádor. První fenotyp TAM je označován jako **M1 makrofágy,** je aktivován IFN-γ a LPS a je spojen s produkcí prozánětlivých cytokinů (IL-12, IFN-γ a TNF-α) s prezentací antigenů, tvorbou reaktivních druhů kyslíku a schopností eliminovat patogeny a buňky. M1 makrofágy zprostředkovávají obranu proti bakteriálním patogenům, exprimují MHC II na povrchu a prezentují antigeny T lymfocytům.

Druhý fenotyp TAM označovaný jako **M2 makrofágy** je aktivován IL-4, IL-10 a IL-13 a je spojen s produkcí protizánětlivých cytokinů (IL-10) a tkáňovou remodelací (Biswas a kol., 2010; Biswas a kol., 2013). M2 makrofágy se produkují u parazitárních infekcí a nádorů a exprimují IL-4 (Martinez a kol., 2013).

V závislosti na aktivačních signálech mohou makrofágy získat různé fenotypy a funkce, a poté fenotypy M1 a M2 představují extrémy tohoto spektra (Murray a kol., 2014). M1 a M2 aktivace makrofágů je spojena s Th1 a Th2 lymfocyty, IFN-γ (Schroder a kol., 2004) a IL-4 jako mediátorem. Různé aktivační stavy vyžadují odlišné transkripční faktory. M1 polarizaci indukují IRF (*transcription factor family*): STAT1 a IRF5. M2 polarizaci indukují IRF: STAT6 a IRF4 (Lawrence a Natoli, 2011).

Jednotlivé makrofágové buňky se navzájem výrazně liší a mění své funkce v závislosti na dávkách a kombinacích agonistů a času. A proto jsou dodnes způsoby a důsledky aktivace neobjasněné (Hume, 2015).

3.5.2.1 ROZPOZNÁNÍ

Makrofágy exprimují velké množství plazmatických membránových receptorů zprostředkovávajících interakce s přirozenými a pozměněnými vlastními složkami hostitele, ale i celou řadu mikroorganismů. Rozpoznání je následováno povrchovými změnami, vychytáváním, signalizací a změněnou expresí genu, přispívající k homeostáze, obraně hostitele, efektorovým mechanismům a indukci získané imunity (Taylor a kol., 2005). Makrofágy jsou schopné detekovat produkty bakterií a jiných mikroorganismů pomocí systému rozpoznávajícího receptory, jako jsou Toll-like receptory (TLR). TLR se mohou specificky vázat na různé složky patogenů, jako jsou cukry (LPS), RNA, DNA nebo extracelulární proteiny (například flagellin z bakteriálních flagel).

SRs (*Scavenger receptors*) se vyskytují pouze na buňkách myeloidních linií a jsou exprimovány na zralých tkáňových makrofágách a na dendritických buňkách pocházejících z kostní dřeně (Hughes a kol., 1995). Zprostředkovávají endocytózu odpadních produktů a cizích patogenů. SRs váží LDL (*low density lipoproteins*) a rozpoznávají velkou škálu ligandů. **SR-A** je nejvíce prostudovaný díky své roli v ateroskleróze, kde se podílí na metabolických změnách ovlivňujících makrofágy, které jsou vystavené vysokému obsahu tuku a oxidativnímu stresu (Horiuchi a kol., 2003). Funkce SR-A může být relevantní pro jiné nemoci se základními metabolickými a oxidativními změnami, včetně rakoviny (Chiurchiù a Maccarrone, 2011). SR-A zprostředkovává adhezi makrofágů (Maxeiner a kol., 1998). Bylo potvrzeno, že SR-A byl exprimován na TAM u pacientů s rakovinou vaječníků (Hagemann a kol., 2006). Exprese SR-A na makrofágách je důležitá pro progresi nádoru a metastáz *in vitro* a *in vivo*. Avšak konkurence se SR-A ligandem může snížit invazivitu nádorových buněk vyvolanou makrofágy. Další funkcí SR-A je snižuní regulace aktivace makrofágů produkcí TGF-ß a PGE (Chang a kol., 2008). Bylo prokázáno, že přítomnost SR-A na makrofágách zprostředkovává podporu invazivity nádorů, a že konkurence se SR-A

ligandem může snížit invazivitu nádorových buněk indukovanou makrofágy (Neyen a kol., 2013).

MARCO (*Macrophage Receptor With Collagenous Structure*) řadící se do SR-A skupiny receptorů, zprostředkovává fagocytózu nezávislou na opsoninu. MARCO zprostředkovává aktivaci IL-12 (Sutterwala kol., 1998), který ovlivňuje zvýšení cytotoxické aktiviny NK buněk a CD8+ cytotoxických T lymfocytů. Výzkumy ukázaly, že ztráta MARCO vede ke snížení cytotoxické aktivity NK buněk a T lymfocytů, a tudíž dojde ke zvýšení nádorové multiplicity (Józefowski a kol., 2005).

Dalším scavengerovým receptorem je **stabilin-2**, jenž vykazuje protonovou aktivitu díky své schopnosti pohlcovat kyselinu hyaluronovou, bohatě se vyskytující v extracelulární matrix. Inhibicí stabilinu-2 dojde ke zvýšení cirkulační hladiny kyseliny hyaluronové a to vede ke snížení invazivity nádorů v plicích (Hirose a kol., 2012). Z tohoto důvodu má stabilin-2 protumorovou funkci.

Povrchové receptory makrofágů regulují řadu funkcí (Tab. 2) včetně diferenciace, růstu a přežití, adheze, migrace, fagocytózy, aktivace a cytotoxicity (Gordon, 2003). Jejich schopnost rozpoznat širokou škálu endogenních a exogenních ligandů a vhodně reagovat, je hlavní funkcí pro udržení homeostázy, stejně jako obranou hostitele při autoimunitě a imunopatologii (Kaufmann, 2004).

Tab. 2: Přehled makrofágových receptorů, podílejících se na imunologickém rozpoznávání (Taylor a kol., 2005).

Receptorová rodina	Receptor	Funkce
Scavenger receptory (kolagenní)	SR-A	Fagocytóza, apoptóza, enocytóza modifikovaného LDL, adheze
Scavenger receptory (nekolagenní)	CD36	Fagocytóza, apoptóza, rozpoznán diacyl lipidu bakterií
GPI-kotvené	CD14	LPS-vázající protein, TLR signalizace, rozpoznání apoptotických buněk
Integrin	CR3	Komplementový receptor (C3bi) zprostředkovávající fagocytózu
Ig superrodina	(CD18/11)	Endoteliální adheze
	FcR (ITAM/ITIM)	Na protilátce závislá vazba, absorpce, zabíjení
	TREM-1 (ITAM)	Regulace zánětu
Sedmi transmembránová	CCR1	Receptor pro MCP-1
	C5aR	Chemotaxe, degranulace
	EMR2(EGF-TM7)	Adheze myeloidních buněk, vazba chondroitin sulfátu
NK-like C-typ lektin-like	Dectin-1 (ITAM-like)	β-glukanový receptor, TNF-α uvolnění/interakce TLR2
C-type lectin (samotný CTLD)	DC-SIGN	Rozpoznání patogenu, ICAM adheze
Mnohonásobný CTLD	MR	Alternativní aktivace, antigenní transport?
TLR	TLR2	Odpověď na peptidoglykan
	TLR4	Odpověď na LPS

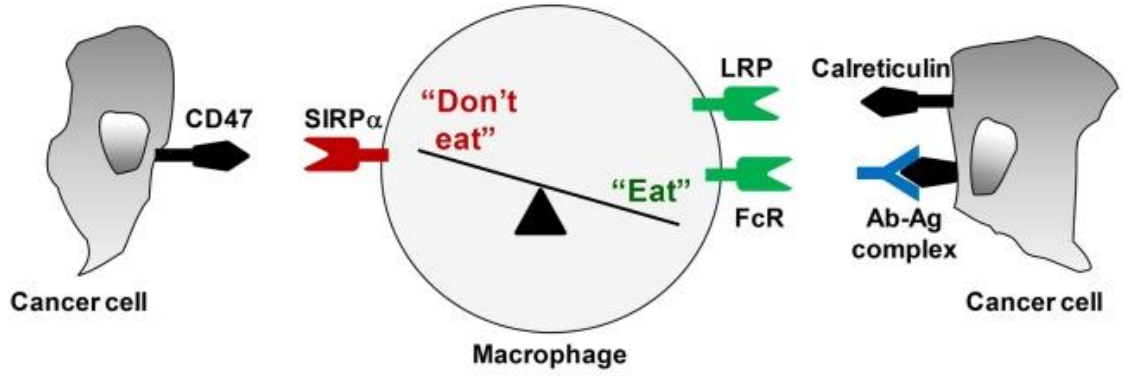
3.5.2.2 LIKVIDACE

PrCR (*Macrophage-mediated programmed cell removal*) je důležitým mechanismem eliminace nemocných a poškozených buněk před apoptózou (Chao a kol., 2012). Indukce PrCR pomocí „eat me“ signálů na buňkách nádorů je potlačena „don't eat me“ signály, jako je CD47 (Kim a kol., 2012). CD47 je regulován nádorem a chrání jej před PrCR. CD47 váže makrofágový signál-regulační protein α (SIRP α), jenž inhibuje fagocytózu (Obr. 2). Blokací signálu CD47 na nádorových buňkách je umožněn vznik signálu „eat me“ za účelem vyvolání PrCR s následnou eliminací nádorové buňky. Aktivace signalizačních cest TLR (*Toll-like receptor*) v makrofágách spolupracuje s blokováním CD47 na nádorových buňkách za účelem zvýšení PrCR (Chao a kol., 2012).

Výzkum Mingye a kol. ukázal, že aktivace cest TLR v makrofágách indukuje fosforylaci Btk (Burtonovy tyrosinkynázy), která katalyzuje odhalení kalretikulinu na povrchu nádorových buněk. (Mingye a kol., 2015). Kalretikulin, který má funkci jako signál „eat-me“ na rakovinných buňkách, interaguje s LRP proteinem, jenž se vyskytuje na povrchu makrofágů (Obr. 2) (Miyanishi a kol., 2007). Kalretikulin aktivovaný pomocí TLR a Btk vede nádorové buňky k cílené eliminaci fagocytózou (Gardai a kol., 2005).

Dále makrofágy eliminují maligní buňky produkcí rozpustných faktorů (např. Oxidu dusnatého a TNF-α), které mohou indukovat apoptózu nádorových buněk (Nathan, 1987).

Makrofágy na svém povrchu exprimují Fc receptory, které se váží na nádorové buňky, které jsou označené protilátkou a tím dochází k likvidaci nádorových buněk (Obr. 2) (Grugan a kol., 2012).



Obr. 2: Makrofágová regulace „eat me“ a „don't eat me“ signálů (Long a Beatty, 2013).

Způsoby likvidace cizích antigenů:

1. **Přímé zabití uvolněním škodlivých produktů** (např. kyslíkové radikály).
2. **Přímá cytolýza nádorových buněk pomocí ADCC** (*antibody dependent cellular cytotoxicity*).
3. **Nepřímé zabití nádorových buněk aktivováním dalších buněk imunitního systému schopných lýze.**

3.5.2.3 MAKROFÁGY A RAKOVINA

Jak jich bylo výše zmíněno, makrofágy se dělí na dva fenotypy TAM na M1 a M2 makrofágy. Přičemž M1 makrofágy působí protinádorově a M2 makrofágy pronádorově.

Kyselina mléčná produkovaná nádory nebo sekretované imunosupresivní cytokiny (IL-4, IL-10 a IL-13) z různých buněk v mikroprostředí nádorů ovlivňují vznik M2 makrofágů (Colegio a kol., 2014). M2 makrofágy se nacházejí uvnitř hypoxických oblastí nádoru a upřednostňují jeho růst a angiogenezi snížením regulace signalizace PlexinA1/A4 zprostředkované neuropilinem-1 a semaforinem 3A (Dandekar a kol., 2011). M2 makrofágy uvnitř hypoxických oblastí mají sníženou expresi MHC II, a tudíž neprezentují antigen T lymfocytům (Laoui a kol., 2014).

Makrofágy vykazují několik protumorových funkcí, které hrají důležitou roli při vývoji a progresi rakoviny, jako je schopnost exprese cytokinů a indukce nádorové angiogeneze (Grivennikov a kol., 2010). M2 makrofágy jsou zdrojem nádor podporujícího cytokinu IL-6. Produkce IL-6 podporuje proliferaci nádorových buněk střev a ochranu před apoptózou prostřednictvím aktivace STAT3 (*Signal transducer and activator of transcription 3*) (Bollrath a kol., 2009; Grivennikov a kol., 2009).

Makrofágy jsou také důležité pro nádorový angiogenní vývoj, produkcí VEGF-A (*vascular-endothelial growth factor A*) a PlGF (*placental growth factor*). Avšak protilátkou zprostředkovaná neutralizace angiopoietinu 2, ligandu pro receptor Tie2 nebo makrofágová deplece, blokuje nádorovou angiogenezi a omezuje progresi nádoru u myšího modelu rakoviny prsu (Lin a kol., 2006; Mazzieri a kol., 2011).

Makrofágy hrají klíčovou roli při:

- rezistenci na chemoterapeutickou léčbu: makrofágy jsou považovány za hlavní zdroj IL-10 a bylo zjištěno, že IL-10 inhibuje expresi IL-12 v dendritické buňce a následně redukuje aktivaci cytotoxických CD8+ T buněk. Je zajímavé, že protilátka zprostředkovaná neutralizací IL-10 v kombinaci s chemoterapií zvyšuje citlivost na chemoterapeutické léčby (Ruffell a kol., 2015).

- rozvoji metastáz: stimulováním signálních drah pro přežití buněk rakovinných buněk a vyvoláním vzniku metastatického místa v sekundárním místě po diseminaci nádorových buněk (Vanharanta a kol., 2013).

3.5.3 NK buňky

NK buňky (*Natural killer cells*) pocházejí jako jediné buňky z vrozené imunitní odpovědi z lymfoidní vývojové linie. Jsou známé svou schopností rozpoznat a rychle eliminovat infikované nebo transformované buňky. V důsledku toho jsou NK buňky zásadní pro ochranu hostitele před virovými infekcemi a malignitami (Guillerey a Smyth, 2016).

Rozpoznávání buněk se děje dvěma mechanismy. Buď dojde ke vzniku vazby imunoglobulinových receptorů (FcR) s cílovými strukturami, které nesou protilátky, a tím se aktivuje cytotoxická NK buněčná odpověď. Nebo, nedojde-li k vazbě na receptor MHC I, zahájí NK buňky automaticky lýzi cílové buňky (Parkin a kol., 2001).

V cytoplazmě NK buněk se vyskytují velká granula, jež obsahují buněčné aparáty nezbytné k perforaci a indukci apoptózy citlivých cílových buněk (Vivier a kol., 2008). Dvě primární molekuly zapojené do tohoto procesu jsou perforin a granzym-B a jsou předem vytvořeny v klidových, nestimulovaných NK buňkách (Timonen a kol., 1981). Kromě lytických enzymů produkují NK buňky zánětlivé cytokiny (TNF-α, IFN-γ), které jsou po stimulaci rychle sekretovány a vyvolávají silnou zánětlivou odpověď (Cooper a kol., 2001) a růstové faktory (G-CSF a GM-CSF) (Vivier a kol., 2011). Sekrece IFN-γ NK buňkami působí jako můstek mezi vrozenou a adaptivní imunitou indukováním zvýšené regulace MHC I na okolních buňkách (Wallach a kol., 1982), což zvyšuje rozpoznávání cílů CD8+ T buňkami (Martin-Fontecha a kol., 2004). NK sekretovaný IFN-γ může dále regulovat molekuly MHC I stejně jako PD-1 ligandy na nádorových buňkách. TNF-α může mít přímou cytotoxickou aktivitu vyvoláním apoptózy zprostředkované kaspázou 8 (Peter a Krammer, 2003). Navíc kombinace IFN-γ a TNF-α může řídit nádorové buňky k procesu stárnutí (Braumuller a kol., 2013). Takže cytokiny sekretované vrozenými buňkami mohou mít přímé protinádorové aktivity.

NK buňky také modulují aktivitu jiných leukocytů, jako jsou dendritické buňky a T buňky, prostřednictvím sekrece cytokinů nebo různých interakcí receptoru a ligandu (Martin-Fontecha a kol., 2004; Moretta a kol., 2005). Ačkoli spolupráce mezi různými leukocyty nebyla doposud do hloubky prozkoumána v kontextu nádorové imunologie, nedávná zpráva naznačuje, že NK buňkami produkovaný IFN-γ polarizuje makrofágy směrem k protinádorovému stavu Ml (O'Sullivan a kol., 2012).

3.5.3.1 ROZPOZNÁNÍ

NK buňky neidentifikují cílové buňky na základě jejich prezentace virových nebo nádorově specifických antigenů. Místo toho využívají receptory zakódované v zárodečné linii, které rozpoznávají ligandy prezentované na buňkách, které vznikly v důsledku stresu buněk nebo poškození DNA, ke kterým dochází během virové infekce nebo transformace nádorů (Raulet a Guerra, 2009). Jelikož NK buňky rozpoznávají své cíle na základě zárodečných linií, jsou jejich odpovědi přísně regulovány, aby se minimalizovalo usmrcení zdravých buněk a tkání. Tato regulace je řízena jemnou rovnováhou mezi aktivačními a inhibičními signály, jež jsou produkovány aktivačními a inhibičními receptory na povrchu NK buněk.

MHC I poskytuje inhibiční signál NK buňkám a brání jejich reakci na cílovou buňku, i přes přítomnost aktivačního ligandu (Ljunggren a Karre, 1990). Pouze když MHC I chybí nebo je snížená jeho regulace na buňce, je schopná NK buňka reagovat. Aktivace NK buněk a inhibiční receptorová exprese se mění v závislosti na podskupině NK buněk, stejně jako na cytokinech a rozpustných ligandech přítomných v mikroprostředí nádoru nebo v jeho blízkosti. Ligandy přítomné na nádorových buňkách se také liší v závislosti na typu nádoru a stavech v mikroprostředí (Obr. 3) (Davis a kol., 2017).

AKTIVACE NK BUNĚK

NK buňky také exprimují řadu aktivačních receptorů kódovaných zárodečnou linií, které zahrnují NCR (*natural cytotoxicity triggering receptors*) (např. NKp30, NKp44, NKp46 a NKp80), receptory rodiny SLAM (např. 2B4 a NTB-A), lektiny typu c (tj. NKG2D a NKG2C/CD94) a Fc receptor s nízkou afinitou (CD16=FcyRIII) (Obr. 3) (Lanier, 2008).

Je důležité vymezit úlohu CD16 od ostatních aktivačních receptorů, jelikož CD16 nerozpoznává buněčně exprimovaný ligand. Naopak CD16 liguje Fc část IgG protilátek vázanou na buňku. CD16 poskytuje prostřednictvím ligace dostatečně silný aktivační signál k překonání většiny inhibičních signálů k vyvolání ADCC (*antibody directed cell-mediated cytotoxicity*) bez potřeby ko-ligace dalších aktivačních receptorů (Long a kol., 2013). Bylo prokázáno, že aktivace NK buněk aktivuje matricovou metaloproteázu ADAM-17, která je zodpovědná za štěpení CD16 na povrchu NK buněk, což by potenciálně omezilo NK zprostředkované ADCC odpovědi.

Ze zmíněných receptorů je c-lektinový homodimer NKG2D nejlépe charakterizovaný. Tento receptor rozpoznává molekuly regulované na povrchu buněk, které prošly poškozením DNA nebo buněčným stresem (McCann a kol., 2007).

Existují také receptory aktivující NK buňky, které rozpoznávají ligandy konstitutivně exprimované na zdravých buňkách. DNAM-1 (CD226) rozpoznává ligandy CD155 (PVR) a CD112 (Nektin-2), které jsou exprimovány na mnoha endoteliálních buňkách, stejně jako v klidových CD4+ a CD8+ T buňkách (Levin a kol., 2011; Mendelsohn a kol., 1989). Podobně je NK koaktivační ligand NTB-A zásadně exprimován na všech NK, T a B buňkách. Pevná regulace aktivačních drah, zejména v místech, kde jsou přítomné aktivační ligandy na zdravých buňkách, je integrální složkou nezbytnou k prevenci autoimunity zprostředkovanou NK buňkami.

INHIBICE NK BUNĚK

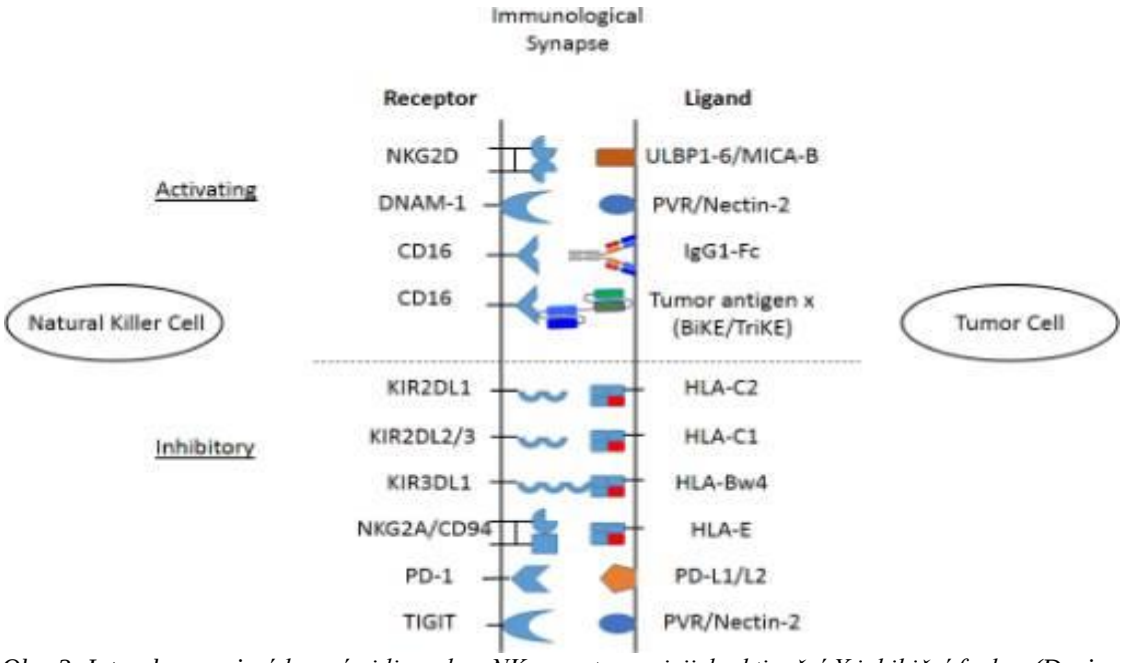
Negativní regulace funkce NK buněk je řízena řadou inhibičních receptorů (Obr. 3). NK inhibiční receptory dělíme do čtyř hlavních kategorií:

1. zabíjející imunoglobulinové receptory (KIR)
2. lektinové receptory typu c (NKG2A/CD94)
3. leukocytové imunoglobulinové receptory (LILRs)
4. checkpoint receptory (PD-1, TIM-3, LAG-3 a TIGIT)

Ligandy pro mnoho z těchto inhibičních receptorů jsou hlavními molekulami MHC I. KIR rozpoznání MHC I je vysoce specifické v tom, že určité KIR mají definované molekuly MHC I jako své ligandy. KIR2DL1 rozpoznává molekuly HLA-C2, zatímco KIR2DL2/3 rozpoznává HLA-C1 (Malnati a kol., 1995). KIR3DL1

rozpoznává molekuly HLA-B-Bw4 epitop (Wan a kol., 1986; Gumperz a kol., 1995). Lektin typu c, heterodimer, NKG2A/CD94 rozpoznává molekuly HLA-E (Miller a kol., 2003; Petrie a kol., 2008). I přesto, že má LIR-1 (ILT-2/CD85j/LILRB1) řadu vazebných partnerů, vykazuje HLA-G nejsilnější vazebné charakteristiky (Shiroishi a kol., 2003).

Indukce inhibiční signalizace prostřednictvím exprimovaných MHC I ligandů je kritickým aspektem regulace NK buněčné odpovědi. Vzhledem k tomu, že zdravé buňky exprimují molekuly MHC I, tak i přes to, že mohou konstitutivně exprimovat některé aktivační ligandy, bude dominantní inhibiční signál, který vede k inhibici funkce NK buněk a k udržení tolerance. Je důležité poznamenat, že NK buňky jako populace jsou velmi rozmanité ve smyslu jejich inhibiční receptorové exprese. Ne každá NK buňka exprimuje každý inhibiční receptor. Například zatímco $CD56^{bright}$ NK buňky všechny exprimují NKG2A/CD94, postrádají expresi KIR. Pouze přibližně 50-60% $CD56^{dim}$ NK buněk exprimuje NKG2A/CD94, zatímco přibližně 70-75% exprimuje KIR. $CD56^{dim}$ NK buňky jsou dále rozděleny podle toho, které KIR exprimují (Sternberg-Simon a kol., 2013).



Obr. 3: Interakce mezi nádorovými ligandy a NK receptory a jejich aktivační X inhibiční funkce (Davis a kol., 2017).

3.5.3.2 LIKVIDACE

Zda NK buňky zabijí cílové buňky, závisí na rovnováze signálů z aktivačních a inhibičních receptorů na povrchu NK buněk, jak jsem již zmínila výše.

Koligace s koaktivačním receptorem jako NTB-A nebo 2B4 vede k degranulaci NK buněk (Bryceson a kol., 2006). Perforin a granzymy pak vytvářejí póry v cílových buňkách a spouštějí kaspázy vedoucí k apoptóze cílové buňky (Millard a kol., 1984; Keefe a kol., 2005).

3.5.3.3 NK BUŇKY A RAKOVINA

NK buňky jsou nejlépe studované mediátory vrozeného imunitního dohledu nad rakovinou. NK buňky jsou charakteristické svou silnou schopností zabíjet nádorové buňky *in vitro* bez předchozího podráždění. Mnoho transplantovaných nádorových buněk je odmítnuto způsobem závislým na NK buňkách (Diefenbach a kol., 2001; Ljunggren a Karre, 1985; Seaman a kol., 1987). Experimenty naznačují, že produkce perforinu NK buňkami chrání myš před methylcholantrenem (MCA) indukovaným sarkomy (van den Broek a kol., 1996). Klinické důkazy naznačují, že infiltrace NK buněk v biopsii nádorů jsou spojeny s příznivými prognózami u pacientů s nádorovým onemocněním (Coca a kol., 1997; Ishigami a kol., 2000).

Nicméně nádorové mikroprostředí může potlačit funkci NK buněk, což vede k úniku nádoru a k progresi onemocnění. Navzdory nedávnému pokroku v cytokinové terapii a NK buněčném adoptivním přenosu, tumorová exprese ligandů k NK exprimovaným kontrolním receptorům může stále potlačovat lýzi nádoru (Obr. 3) (Davis a kol., 2017).

Studie ukazují, že různé abnormality NK buněk korelují se zvýšeným rizikem výskytu některých typů rakoviny (Imai a kol., 2000). Navíc NK buňky s aberantní funkcí se často objevují u pacientů s rakovinou, což činí funkci NK buněk potenciálním biomarkerem pro rakovinu (Roder a kol., 1980; Gineau a kol., 2012).

Rakovinné buňky jsou buňky vyznačující se neregulovaným dělením. Toto neregulované dělení je důsledkem poškození DNA v genech, které řídí buněčný cyklus (Gerlinger a kol., 2012). Aktivace odpovědi na poškození DNA (DDR) nastává v mnoha nádorových buňkách a prekancerózních lézích, což vede k indukci ligandů

NKG2D a DNAM-1 (Cerboni a kol., 2007; Croxford a kol., 2013). Exprese těchto ligandů by měla vyvolat lýzi NK buněk. Nicméně, rakovinné buňky mohou zrušit aktivaci NK buněk řadou prostředků. Jedním z mechanismusmů, kterým nádorové buňky vylučují odpověď NK buněk, je přes regulaci MHC I (Wang a kol., 2013). Zatímco mnoho nádorů reguluje určité molekuly MHC I, aby se vyhnuly odpovědi T buněk, neklasická molekula MHC I, HLA G, je často na povrchu nádoru více regulována (Lin a Yan, 2015). Jak bylo uvedeno výše, tato molekula HLA působí jako ligand pro NK-exprimovaný inhibiční receptor LIR-1 (Gonzalez a kol., 2012). Výsledkem je silný inhibiční signál poskytovaný NK buňkám exprimujícím LIR-1, čímž jim brání zprostředkovat jejich cytotoxickou funkci navzdory přítomnosti aktivačních ligandů (Heidenreich a kol., 2012).

Nádorové buňky exprimují na svém povrchu ligandy NKG2D (MIC a ULBP) (Chitadze a kol., 2013). Rozpustné proteiny MIC a ULBP byly identifikovány v séru pacientů s různými druhy rakoviny včetně plic, tlustého střeva, prsu, vaječníků, gliomů, neuroblastomu, melanomu a leukemie (Salih a kol., 2006; Yamaguchi a kol., 2012). Nádorové buňky unikají NK buněčnému receptoru NKG2D díky procesu, během kterého dojde ke snížení exprese ligandu na povrchu nádoru a tím se sníží náchylnost nádoru k usmrcení NK buňkami. (Lundholm a kol., 2014). Nicméně, bez ohledu na uvolňování ligandů NKG2D, sérum od pacientů s nádorovým onemocněním obsahuje další imunosupresivní faktory, jako je TGF-β, o kterém se ví, že snižuje expresi NKG2D a NCR NKp30 na NK buňkách (Rouce a kol., 2016).

Imunosupresivní buňky, jako jsou myeloidní supresorové buňky (MDSC) a regulační T (Treg) buňky, které se nacházejí v nádorovém mikroprostředí, mohou také účinně omezit protinádorovou funkci NK buněk. MDSC se vytvářejí v kostní dřeni hostitelů nesoucích nádor a poté migrují do lymfatických a nádorových tkání pomocí chemoatraktantů, jako jsou CCL2 a CCL5. Tyto buňky jsou jednou z hlavních složek nádorového mikroprostředí a bylo prokázáno, že potlačují proliferaci T lymfocytů, stejně jako blokují vstup CD8+ T buněk do nádoru (Marvel a kol., 2015). MDSCs zprostředkovávají některé své funkce prostřednictvím sekrece imunosupresivních cytokinů IL-10 a TGF-β (Ostrand-Rosenberg a Sinha, 2009). Jak již bylo zmíněno výše, TGF-β snižuje expresi NKG2D na NK buňkách (Sarhan a kol., 2016).

Vysoký podíl Tregs, též pravděpodobně zapojený do buněčné imunosuprese NK buněk v mikroprostředí nádoru, byl korelován s progresí rakoviny (Orentas a kol., 2006). Bylo prokázáno, že tyto vysoké podíly byly doprovázeny sníženým počtem a funkčností NK buněk (Betts a kol., 2012). Naopak terapeutické léčebné postupy, které indukují snížení počtu Tregů, jako je léčba nízkými dávkami cyklofosfamidu nebo léčba Lenalidomidem a Pomalidomidem nebo přímou deplecí Tregs za použití IL-2 difterického toxin fúzního proteinu, vedly ke zvýšené funkci NK buněk (Davies a kol., 2001; Bachanova a kol., 2014). Tregs mohou zprostředkovat inhibici NK buněk prostřednictvím kontaktu membránově vázaného TGF-β a rozpustného TGF-β (Pedroza-Pacheco a kol., 2013). Jak již bylo zmíněno, TGF-β může snížit expresi NKG2D na NK buňkách, ale může také pomoci vyvolat expanzi Tregs v supresivním mikroprostředí nádoru. Další mechanismus, kterým Tregs potlačuje funkce NK buněk, je omezením přístupu NK buněk k IL-2 prostřednictvím jeho spotřeby (Gasteiger a kol., 2013).

Možné mechanismy nádorového úniku NK buněčné odpovědi (Marcus a kol., 2014):

1. Ztráta exprese aktivačních ligandů pro NK receptory, jako jsou NKG2D, NKp46 nebo DNAM-1.
2. Vylučování/uvolňování rozpustných ligandů pro aktivaci NK receptorů, např. NKG2D, čímž se redukuje exprese ligandu na povrchu nádoru a v některých případech inhibuje rozpoznávání a funkce NK buněk.
3. Persistentní stimulace NK buněk v nepřítomnosti zánětlivých cytokinů indukující stav NK buněčné anergie.
4. Ztráta nádorových supresorů indukujících sekreci chemokinů, které aktivují NK buňky.
5. Modulace mikroprostředí nádorů vedoucí k sekreci imunosupresivních cytokinů, například IL-10 a TGF-ß.

3.5.4 Dendritické buňky

Dendritické buňky (DCs) vznikají v kostní dřeni, nezralé migrují do tkání a aktivují se až po kontaktu se signály nebo motivy jako jsou PAMPs, tkáňové faktory a cytokiny (Chain, 2003). Jsou hlavními regulátory adaptivní imunitní odpovědi a jako

takové jsou nezbytné pro imunitní odpověď zprostředkovanou T buňkami. DCs řadíme mezi antigen prezentující buňky (APC), jež poskytují antigeny a ko-stimulační signály buňkám adaptivního imunitního systému (Shortman a Naik, 2007). V rovnovážném stavu jsou DCs z velké části přítomny jako nezralé a slabé APC charakterizované vysokou schopností zachytit antigeny, nízkou expresí kostimulačních molekul a omezenou sekrecí cytokinů (Trombetta a Mellman, 2055; Steinman a kol., 2003). Různé podněty spojené s bakteriemi, viry a poškozenými tkáněmi mohou indukovat aktivaci a zrání DCs. Aktivované DCs jsou charakterizovány sníženou regulací aktivity zachycování antigenu, zvýšenou expresí MHC II a kostimulačních molekul a CCR7 (*C-C chemokine receptor type 7*), vysokou schopností produkovat cytokiny a aktivní migrací do lymfatických uzlin. DCs jsou silnými induktory T buněčné odpovědi a již dlouhou dobu považovány za kritickou složku protinádorové imunity (Veglia a Gabrilovich, 2017).

DCs zahrnují několik podskupin heterogenních buněk definovaných specifickým fenotypem, anatomickou lokalizací a specializovanými funkcemi určovanými profilem cytokinu (Banchereau a Steinman, 1998; Ueno a kol., 2007). DCs se diferencují v kostní dřeni sekvenčními kroky zahrnujícími **CMPs** (*common myeloid progenitors*) a **MDPs** (*macrophage/DC progenitors).* MDPs vytvářejí **cMOPs** (*common monocyte precursors*) a **CDPs** (*common DC precursors*) (Fogg a kol., 2006; Merad a kol., 2013). CMOPs pak vedou k vzniku monocytů (Hettinger a kol., 2013), které se mohou za určitých podmínek v tkáních diferencovat na DCs (Segura a Amigorena, 2013). V rovnovážných podmínkách se prakticky všechny DCs v tkáních liší od CDP (Onai a kol., 2007). V současné době je rozpoznáno několik podmnožin DCs a vývoj každé podmnožiny DCs je řízen specifickými transkripčními faktory (Murphy a kol., 2016). Například transkripční faktor E2-2 podporuje diferenciaci **pDCs** (*plasmacytoid DCs*), zatímco exprese Id2 řídí diferenciaci **cDC** (*conventional DCs*) (Cisse a kol., 2008). V nádorovém mikroprostředí se pre-DCs diferencují na dvě populace DCs: **CD11b$^+$ DCs (DC1)** a **CD103$^+$ DCs (DC2)**. Monocyty transportované do nádorového mikroprostředí se diferencují na makrofágy a **Inf-DCs** (*inflammatory DCs*). pDCs také infiltrují nádorové mikroprostředí. DC2s a inf-DC migrují do lymfatických uzlin pomocí CCR7 a prezentují zde nádorové antigeny CD8+ T buňkám, což započíná protinádorovou odpověď (Veglia a Gabrilovich, 2017).

3.5.4.1 ROZPOZNÁNÍ

DCs mohou identifikovat patogeny přímo rozpoznáním mikrobiálních molekulárních vzorků pomocí **PRRs**, jako jsou například **TLR** (Medzhitov a kol., 1997). Vazba TLR na mikrobiální ligandy vede k aktivaci fagocytů a přímému zabíjení patogenů, stejně jako k uvolňování prozánětlivých cytokinů a antimikrobiálních peptidů (Takeda a kol., 2003). Kromě toho tyto molekuly aktivují DCs a jsou proto důležité při zahájení adaptivní imunitní odpovědi. Vazba ligandů na TLR spouští aktivaci signální dráhy jaderného faktoru-κB (NF-κB) potřebné k indukci zánětu. Signalizace NF-κB indukuje expresi chemokinů, cytokinů, adhezních molekul, matrixových metaloproteináz, syntézy oxidu dusnatého a enzymů, které regulují syntézu prostanoidů, což vede ke vzniku zánětlivé odpovědi (Medzhitov a kol., 1997).

DCs na základě jejich APC a funkcí imunitní regulace vyvolávají lokální zánět okolo neoplastických lézí modifikací okolních tkání. To vede k náboru vrozených imunitních buněk, jako jsou neutrofily, makrofágy, NKT (*Natural killer T cell*s) nebo γδ T buňky, které zase podporují nábor nezralých DCs prostřednictvím produkce chemokinu. Nádorové antigeny dostupné pro vychytávání nezralými DCs jsou poskytovány smrtí frakce nádorových buněk. Smrt frakce je indukována vrozenými buňkami imunitního systému nebo cytokiny, které produkují, jako je například IFN-γ (Zitvogel a kol., 2006).

Kromě TLR nezralé DCs exprimují několik lektinů typu C, jako je **manózový receptor**, **DEC205** a DC-specifické mezibuněčné adhezivní molekuly (**ICAM**), které štěpí neintegrin rozpoznávající sacharidové struktury na patogenech (Figdor a kol., 2002).

Dále exprimují multifunkční, rozpustné PRR, které se podílejí na vrozené imunitě a zánětu, jako jsou krátké a dlouhé pentraxiny. Prototyp pentraxinu 3 (**PTX3**) je vysoce exprimován pomocí DCs a makrofágů. PTX3 je schopen rozpoznat mikroby, aktivovat komplement a usnadnit rozpoznávání patogenů fagocyty (Garlanda a kol., 2005).

DCs analyzují prostředí prostřednictvím vícenásobných mechanismů vychytávání antigenu. Patří mezi ně **endocytóza** zprostředkovaná receptory

prostřednictvím lektinů typu C a Fc receptorů (Banchereau a kol., 2000). Mají také vysokou kapacitu endocytovat částice a soluty nespecificky prostřednictvím **fagocytózy** a **makropinocytózy** (Sallusto a kol., 1995). Ačkoli se zdá, že mnohé z těchto cest se používají pro vychytávání molekul příbuzných s patogenem, mohou být také relevantní pro vychytávání vlastních antigenů (Steinman a kol., 2000).

Nezralé DCs také exprimují **αvβ3-integriny**, **αvβ5-integriny** a **CD36**, které usnadňují kontinuální vychytávání apoptotických buněk (Rovere a kol., 1998). Tento mechanismus může být důležitý v udržování periferní samo-tolerance zprostředkované DCs (Steinman a kol., 2000).

3.5.4.2 LIKVIDACE

Mnoho nezávislých studií dokumentovalo cytotoxickou aktivitu různých nativních a *in vitro* generovaných lidských DCs podskupin. Mechanismy zabíjení rakovinných buněk primárně zahrnují **ligandy receptoru smrti**, **perforin/granzym B** a **NO**. Bylo zjištěno, že cytotoxická aktivita pDCs aktivovaných skrz TLR7 nebo 9 vyžaduje přítomnost TRAIL (*TNF related apoptosis inducing ligand*) (Fanger a kol., 1999; Hardy a kol., 2007)

Nedávné studie dále prokázaly, že lidské pDCs produkující IFN typu I mohou také fungovat jako zabijáci nádorových buněk (Tel a kol., 2012). Zjistilo se také, že nezralé **$CD4^+$ $HLA\text{-}DR^+Lin^-$ DCs** vyvolávají apoptózu různých rakovinných buněk čtyřmi různými TNF ligandy (TRAIL, TNF, FasL a lymfotoxin (LT)-$\alpha_1\beta_2$) (Janjic a kol., 2002). Bylo zjištěno, že další lidská podmnožina DCs nazývaná slanDC (charakterizovaná modifikací PSGL-1 pomocí 6-sulfo LacNAc) zabíjí různé linie nádorových buněk mechanismem závislým na TNF-α (Schmitz a kol., 2005) Kromě toho řada studií prokázala, že DCs pocházející z monocytů generovaných *ex vivo* pomocí GM-CSF a IL 4 nebo IFNα mohou zabíjet nádorové buňky prostřednictvím TNF-α, TRAIL, FasL, peroxynitritu nebo granzymu B. Výzkumy ukázaly, že LPS aktivované DCs usmrcují rakovinné buňky mechanismem závislým na peroxynitridu (Lakomy a kol., 2011).

V klinických studiích Stary a kol. bylo prokázáno, že pDCs a mDCs vykazují přímou aktivitu v zabíjení nádorových buněk. Nicméně mDCs byly detekovány pouze

na periferii nádoru a exprimovaly perforin a granzym B, zatímco pDCs byly identifikovány primárně uvnitř nádorových lůžek a exprimovaly TRAIL (Stary a kol., 2007).

3.5.4.3 DENDRITICKÉ BUŇKY A RAKOVINA

Silnou schopností DCs je prezentovat antigen a díky tomu jsou považovány za kritický faktor pro protinádorovou imunitu. Množství molekul nalezených v nádorovém mikroprostředí inhibuje DCs aktivaci *in vitro*. To zahrnuje VEGF, prostaglandin E2 (PGE2) a IL-10. Navíc bylo prokázáno, že VEGF, IL-6, IL-10 a CSF-1 inhibují zrání progenitorů a monocytů na DCs v kostní dřeni a místo toho směrují monocyty směrem k supresivnímu fenotypu (Zong a kol., 2016). Bylo zjištěno, že s nádorem spojené DCs jsou defektní v jejich diferenciaci a aktivaci, z toho důvodu jsou špatnými stimulátory imunitních odpovědí. Nedávné údaje poskytly další podporu této představě a prokázaly nové mechanismy negativní regulace funkcí DCs (Obr. 4) (Veglia a Gabrilovich, 2017).

(A) Hypoxie, akumulace adenosinu, zvýšené hladiny laktátu a snížení pH ukazují, že narušují normální funkci DCs. U modelu rakoviny prsu bylo prokázáno, že IL-10 inhibuje produkci IL-12 nádorem infiltrujícím $CD103^{+}CD11b^{-}$DCs, což mění jejich schopnost aktivovat antigen specifickou T buněčnou odpověď. Exprese IL-12 a protinádorové odezvy byly obnoveny u myší léčených protilátkou blokující receptor IL-10 (IL-10R) (Ruffell a kol., 2014).

(B) IL-10 indukuje diferenciaci tDCs (*tolerogenic DCs*), jež jsou charakteristické nízkou expresí kostimulačních a MHC molekul a vysokou produkcí IL-10.

(C) IL-10 produkovaný TAM inhibuje produkci IL-12 pomocí $CD103^{+}$ DCs, což vede k zhoršené aktivaci T buněk.

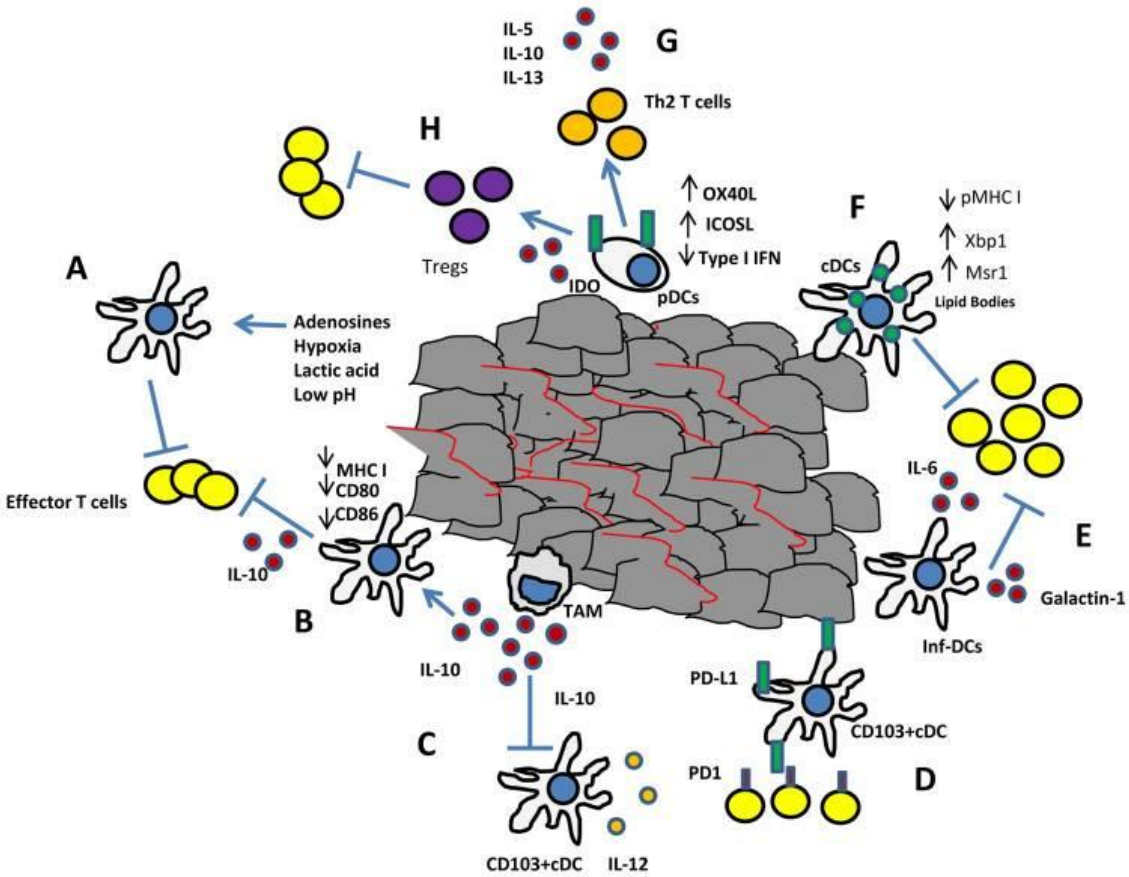
(D) Exprese PD-L1 na $CD103^{+}$ DCs v nádorovém mikroprostředí přispívá k dysfunkci DCs.

(E) Faktory odvozené od tumoru řídí diferenciaci imunosupresivního inf-DC (*inflammatory DCs*). Vyrábějí nádor podporující IL-6 a imunosupresivní galektin-1.

(F) Abnormální akumulace lipidů v DCs ovlivňuje jejich schopnost prezentovat nádorové antigeny.

(G) pDCs produkují malé množství IFN typu I, ale vykazují vyšší expresi ligandu OX40L a ICOSL. Exprese těchto markerů je spojena s produkcí IL-5, IL-10 a IL-13 T buňkami.

(H) IDO (*Indoleamine-2,3-dioxygenase*) produkující pDCs indukují diferenciaci Tregs buněk v nádorovém mikroprostředí.



Obr. 4: Mechanismy DCs dysfunkce při nádorovém onemocnění (Veglia a Gabrilovich, 2017).

3.6 ZPŮSOBY NÁDOROVÉ IMUNOTERAPIE POMOCÍ BUNĚK VROZENÉ IMUNITY

Heterogenita lidských rakovin, kombinovaná s různorodostí mechanismů působících během zakládání metastáz, vede k potlačení imunitní odpovědi. To činí nepravděpodobné, že jakákoli imunoterapie s jediným činidlem vyvolá u většiny pacientů významnou regresi tumoru. Pokrok v porozumění nádorového mikroprostředí a protinádorové imunity vedl k idee, že je zapotřebí několika funkčních kroků imunitní odpovědi vedoucí k odstranění nádorů včetně blokády imunosuprese, podpory imunitní infiltrace, aktivace APCs a zvýšení aktivity efektorových buněk (Surace a kol., 2015). Identifikace těchto cílových funkčních kroků nám stanovuje postup pro navrhování kombinované léčby.

Mnoho studií se zaměřilo na kombinované terapie, které podporují komplementární vlastnosti aktivity T buněk (léčba vakcínami nebo protilátky blokující inhibiční receptory) nebo které synteticky nahrazují B buňky (protinádorové monoklonální protilátky). Přirozená imunitní odpověď však nikdy není založena pouze na adaptivní imunitě. Vrozené imunitní buňky hrají důležitou roli při doplňování efektorových aktivit CD4+ a CD8+ T buněk a poskytují jedinečné cesty k podpoře pokračující adaptivní odpovědi.

Nejdůležitější úloha vrozených buněk v imunitní odpovědi na nádorové buňky spočívá v jejich schopnosti podporovat další migraci leukocytů do nádorů. Například makrofágy polarizované na M1 fenotyp, vylučují druhy oxidu dusnatého aktivující endoteliální buňky a chemokiny, které společně podporují nábor T buněk do nádorů (Klug a kol., 2013). Dalším způsobem podpory buněk vrozené imunity je kombinace s lokální RT. Ta by aktivovala DCs a myeloidní buňky prostřednictvím komplementu (Surace a kol., 2015) a u M1 makrofágů by spustila vylučování faktorů normalizující nádorovou angiogenezi a podporu náboru T buněk do nádorů (Klug a kol., 2013).

Využívání imunitního systému k útokům proti nádorům nebylo jednoduché, avšak v posledních několika desetiletích byla nasazena řada technik. Mezi ně patří zavedení prozánětlivých cytokinů, jako jsou IL-2, IFNα nebo nádorové antigeny, které vyvolávají imunitní odpověď.

Neutrofilová imunoterapie

1. Přenos neutrofilů z předem vyšetřených zdravých dárců - tato imunoterapie by mohla být použita jako účinná nádorová imunoterapie u pacientů s přirozeným deficitem funkčních neutrofilů (Yan a kol., 2014).
2. Přidání mTOR inhibitorů (rapamycin) - přidáním tohoto inhibitoru dojde k zesílení neutrofilní reakce na nádorové buňky, tím se zvyšuje zranitelnost rakovinných buněk vůči útokům netrofilů (Yan a kol., 2014).
3. Kombinovaná terapie β-glukanu s protinádorovou mAb - tato terapie aktivuje neutrofily a vyvolává silnou aktivitu zabíjení proti iC3b opsonizovaným nádorovým buňkám. Protilátka aktivuje klasickou cestou komplement, postupně vznikne iC3b, který se naváže kovalentně na nádorové buňky. β-glukan (produkty jeho štěpení) aktivuje CR3 receptor neutrofilů, kterým neutrofily takto opsonizované nádorové buňky rozpoznávají a následně likvidují (Xiang a kol., 2012).
4. Inhibice receptorové tyrosinkinázy - inhibitor tyrosinkinázy může indukovat neutrofily k zprostředkování účinné protinádorové odpovědi, a tím způsobit následnou regresi nádorů (Patnaik a kol., 2017). Navíc inhibicí tyrosinkinázy dojde ke snížení syntézy iNOS , což má za následek potlačení CD8+ T buněčné odpovědi (Spiegel a kol., 2016).
5. Použití GM-CSF - léčba pomocí GM-CSF zvyšuje funkci neutrofilů a zahájení cytotoxické likvidace nádorových buněk. Byly prokázány případy úplné remise nádoru za použití GM-CSF (Souto a kol., 2011).

Makrofágová imunoterapie

Makrofágy jsou atraktivními cíli pro imunoterapii rakoviny, protože mají jedinečnou schopnost regulovat klíčové prvky onkogeneze a progrese nádorů, včetně životaschopnosti rakovinných buněk, invazivity, angiogeneze a fibrózy.

1. Blokace CSF1/CSF1R zprostředkovaná protilátkami - blokádou dojde k repolarizaci M2 makrofágů na M1 makrofágy u nádorů pankreatu (Zhu a kol., 2014).
2. Použití protilátky specifické pro MARCO - u myšího modelu rakoviny prsu tato léčba posunula rovnováhu makrofágů ve prospěch Ml, podpořila se imunitní

odpověď závislá na T buňkách, omezila se velikost nádorů a snížil se výskyt metastáz (Georgoudaki a kol., 2016).

3. Inhibice náboru makrofágů do nádoru pomocí anti-CCL2 - CCL2 je chemokin, jenž přivádí makrofágy do místa zánětu. Jeho blokací protilátkou anti-CCL2 dojde k inhibici náboru makrofágů do nádoru, a to vede ke zvýšení protinádorové imunity, sníží se růst nádoru a metastáz (Sanford a kol., 2013).
4. Použití liposomálních bisfosfonátů - liposomální bisfosfonáty vykazují cytotoxickou aktivitu vůči makrofágům. To vede k regresi nádorového růstu, angiogeneze a metastáz (Pulaski a kol., 2009).
5. Zesílení NK-κB dráhy - agonisté TLR (např. Poly (I:C), LPS, monofosforyl A, imiquimod a CpG-oligodeoxynukleotid (CpG-ODN)) aktivují dráhu NK-κB. To vede k vyšší transkripci cytokinů Th1 odezvy a produkci TNF-α, IL-12 a IFN-γ. Tímto postupem dojde k repolarizaci M2 makrofágu na M1 (Hennessy a kol., 2010).
6. Blokace SIRPα - použitím protilátky anti-SIRPα dojde k blokaci interakce SIRPα s CD47. Dojde k potlačení tvorby nádorů, avšak protinádorový účinek této protilátky je oslabován úbytkem makrofágů, NK buněk a CD8+ T buněk. Z tohoto důvodu je důležité další studium anti-SIRPα (Yanagita a kol., 2017).
7. Blokace CD47 - blokací CD47 za pomocí antagonistů (Hu5F9-G4, CC-90002, TTI-621) dojde k aktivaci signalizačních cest TLR, jež aktivují fosforylaci tyrosinkynázy, která následně odkrývá kalretikulin na povrchu nádorových buněk. Kalretikulin dává signál „eat me“ makrofágům, ty je rozpoznávají LRP proteinem a dochází k cílené fagocytóze nádorových buněk (Huang a kol., 2017).

NK imunoterapie

1. Stimulace NK buněk cytokiny (IL-2, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21) - stimulací NK buněk dojde ke zvýšené regulaci adhezivních molekul NKp44 (cytotoxický receptor na NK buňkách), perforinu, granzymů a FasL. Navíc dojde ke zvýšené proliferaci a tvorbě cytokinů (Farag a Caligiuri, 2004).
2. NK buněčná cytotoxicita zprostředkovaná protilátkou ADCC (*antibody-dependent cellular cytotoxicity*) - NK buňky mají vyšší cytotoxicitu proti cílovým buňkám označeným antigenem (Sconocchia a kol., 1997). Vazba

FcγRs s protilátkou opsonizuje nádorové buňky a vede k uvolnění cytotoxických granulí, které obsahují perforin a granzym (Weiner a kol., 2010).

3. Genetické modifikace NK buněk - dojde ke zvýšené expresi aktivačních receptorů na povrchu NK buněk (Nagashima a kol., 1998).
4. Modifikace NK buněk pomocí CAR (*chimeric antigen receptor*) - CAR ukotvený na povrchu NK buněk je navádí k nádorům. Zde reaguje CAR s povrchovým nádorovým antigenem a spouští v NK buňkách signalizační dráhy, jež vedou k aktivaci cytotoxických mechanismů (Rezvani a kol., 2017).

DCs imunoterapie

1. Vakcinace dendritickými buňkami - DCs jsou kultivovány *ex vivo* s nádorovými antigeny. Jakmile DCs pohltí nádorové antigeny, jsou aktivovány, maturovány a následně podány pacientovi jako protinádorová vakcína. DCs poté v pacientovi indukují imunitní odpověď prostřednictvím aktivovaných T lymfocytů (Vachelli a kol., 2013).

Například pan doktor Ženka a kolektiv navrhli imunoterapii založenou na vazbě ligandů na nádorové buňky s následnou aktivací nádorové fagocytózy. Kombinací R-848 (TLR7 agonista u myší, TLR7 a TLR8 u lidí) s mananem ukotveným na nádorové buňce melanomu B16-F10 pomocí hydrofobní kotvy BAM, dosáhli výrazného snížení růstu nádoru. Navíc po přidání poly(I:C) (TLR3 agonista) a tepelně usmrcené *Listeria monocytogenes* dosahovaly jejich výsledky 83% zotavených myší. Nejprve došlo k aktivaci vrozené imunity a následně získané imunity (Caisová a kol., 2016).

4 DISKUSE

Myšlenka používání imunitního systému, který vede k likvidaci nádorových buněk, se datuje více než sto let, již od Williama Coley, který injektoval bakteriální lyzáty, aby indukoval protinádorovou odpověď. Více než 18 000 článků bylo vydáno na téma imunoterapie během posledních pouhých tří let, na rozdíl od pouhých 15 000 článků vydaných od roku 1900 do roku 1990 (Sturey a Patnaik, 2017). Tento dramatický nárůst je primárně způsoben odpověďmi na ICB (immune checkpoint blockade) terapie, které inhibují CTLA-4, PD1 nebo PDL1. Checkpoint inhibitory uvolňují zpětnovazebné „brzdy" imunitního systému. To je poměrně nebezpečné, neboť dochází často k rozvoji autoimunitních onemocnění. Navíc je základní podmínkou, aby imunitní reakce na úrovni získané imunity již existovala, jinak není co zesilovat. To však u tzv. „cold" nádorů není splněno, tudíž pouze 10-30% pacientů je schopných reagovat na tuto terapii (Sharma a Allison, 2015). Z tohoto důvodu je velkou výzkumnou prioritou vyvinout mechanismy, jenž zvýší celkový počet vyléčených pacientů.

Imunitní systém tvoří sehranou odezvu buněk vrozené a získané imunity vůči infekčním agens. I přesto se mnoho terapeutických strategií pro posílení imunitní odezvy proti nádorům zaměřilo převážně na stimulaci získané imunity. Nicméně rostoucí přínos buněk vrozené imunity pro protinádorovou imunitu, zejména v kontextu kombinované imunoterapie, vede k novým strategiím využívajících vrozenou imunitní odpověď proti rakovině (Moynihan a Irvine, 2017).

Například výzkumy doktora Ženky a kolektivu byly zaměřeny na komplexní aktivaci imunitní odpovědi vycházející primárně z ataku vrozené imunity s následným zapojením imunity získané. Pro tuto imunoterapii je charakteristická umělá opsonizace nádorových buněk (Caisová a kol., 2018; Caisová a kol., 2016; Janotová a kol., 2014; Waldmannová a kol., 2016). Nedbalová ve své práci využívala kotvení manam-BAM do membrány nádorových buněk s následnou aktivací komplementu iC3b, jež jsou pak rozpoznávány CR3 receptorem buněk vrozené imunity s následnou eliminací nádorových buněk (Nedbalová, 2017). Proč však nevyužít přirozené schopnosti vrozené imunity nádorové buňky rozpoznat a eliminovat.

Tato bakalářská práce shrnuje a zdůrazňuje důležitou úlohu buněk vrozené imunity při rozpoznání a likvidaci nádorových buněk. Cílem mé rešerše bylo najít pro tento směr podklady a porozumět dané problematice. Zjistit, co je známo o schopnostech buněk vrozené imunity v identifikaci nádorových buněk. Zjistili jsme, že tyto schopnosti buňky vrozené imunity mají. Otázka, co identifikují na povrchu nádorových buněk, je ovšem složitá.

Výzkum Fidlera se zaměřoval na *in situ* aktivaci makrofágů interakcí s liposomy obsahujícími imunomodulátory. Opakovaným podáním liposomů zjistil, že došlo k eliminaci metastáz (Fidler, 1988).

Doktor Yan popsal schopnost neutrofilů ze zdravých dárců poznávat a zabíjet nádorové buňky, nicméně neutrofily od různých dárců se těmito schopnostmi velmi lišily. Domnívá se tedy, že na této informaci by mohla být postavena imunoterapie založená na přenosu neutrofilů ze zdravých dárců do těla pacientů s deficitem funkčních neutrofilů. Dalším návrhem je imunoterapie na základě přidání mTOR inhibitorů (rapamycin). Touto cílenou terapií dojde k inhibici signalizační sítě mTOR, která je v mnoha typech rakoviny porušena. Přidáním inhibitoru dojde k zesílení neutrofilní reakce na nádorové buňky a tím se zvyšuje zranitelnost rakovinných buněk vůči útokům netrofilů (Yan a kol., 2014).

Imunoterapie založená na posílení vrozené imunity poskytuje důležitý prostředek k rychlé změně mikroprostředí nádoru prostřednictvím okamžitě reagujících buněk vrozené imunity. S ohledem na tyto skutečnosti, jsem se rozhodla navrhnout cesty vedoucí ke zvýšení imunitní odpovědi prostřednictvím těchto buněk.

Navrhované cesty:

1/ Instalace molekul, které jsou buňkami vrozené imunity rozpoznávány na povrchu nádorových buněk nebo indukce jejich exprese.

a) Označení nádorové buňky peroxidem vodíku nebo LTB4 - neutrofily rozeznávají peroxid vodíku Src rodinnou kinázou Lyn. Tím dojde k aktivaci neutrofilů, tvorbě NETs a následné likvidaci nádoru. Navíc LTB4 aktivuje neutrofily k migraci do poškozené tkáně (Lämmermann a kol., 2013).

b) Označit nádor bakteriemi, TNF-α nebo DAMPs - tím by byla aktivována imunitní odpověď buňkami vrozené imunity. Avšak imunoterapie využívající usmrcené bakterie a DAMPs je již v dnešní době velmi často využívána (Morales a kol., 1976). I laboratoř doktora Ženky studovala imunoterapeutické využití tepelně usmrcených mikroorganismů nebo jejich složek (Zymosan A). Vazbu mikroorganismů nebo jejich složek na nádorové buňky uskutečnili pomocí hydrofobních řetězců a kovalentních vazeb. Došlo k aktivaci Toll-like receptorů a fagocytárních receptorů a výsledkem bylo smrštění nádoru a jeho dočasné nebo trvalé odstranění (Waldmannová a kol., 2016).
c) Použití inhibitoru SR-A - může být potenciálním lékem v prevenci progrese metastáz u rakoviny, jelikož bylo dokázáno, že exprese SR-A na makrofágách podporuje progresi nádoru. Možným inhibitorem SR-A by mohl být analog sennosidu B: rhein, jenž blokuje funkci SR-A (Yuan a kol., 2015).
d) Označení nádorů houbou *Histoplasma capsulatum* - tato houba interaguje s makrofágovými receptory CR3 a Dectin-1. Touto vazbou dojde k uvolnění TNF-α a fagocytóze nádorových buněk (Huang a kol., 2015).
e) Ukotvit aktivační ligandy na nádorových buňkách (ULBP1-6/MICA-b a PVR/Nectin-2). Tím by došlo ke zvýšení aktivity NK buněk. S kombinací blokace KIR, již zmiňuji níže (3b), by mohlo jít o účinné posilnění NK buněčné cytotoxické aktivity.

2/ Inhibovat mechanismy, které brání rozvoji cytotoxického ataku po interakci receptorů buněk vrozené imunity s přirozenými nebo uměle ukotvenými ligandy na nádorových buňkách.

a) Domnívám se, že inhibice exprese MHC Ib (u lidí HLA-G) molekul na povrchu nádorových buněk by umožnila NK buňkám zahájit cytotoxickou aktivitu. Inhibice MHC Ib by bylo možné dosáhnou jeho genetickou modifikací. MHC Ib interaguje s NK buněčným receptorem Ly49A (Sullivan a kol., 2016). Genetickou modifikací MHC Ib by nedošlo k jeho rozpoznání NK buňkami. Tím by NK buňky přestaly považovat MHC Ib na povrchu nádorových buněk za vlastní a mohla by se zahájit likvidace nádorových buněk.
b) Další možnost, která se nám naskytuje, je blokace KIR, jež ze 70-75% exprimují na svém povrchu NK buňky a jakmile se naváží na MHC (HLA u lidí) ligandy

nádorových buněk, dojde k inhibici NK buněk a tudíž potlačení jejich cytotoxické funkce. Tato blokace by ale zřejmě musela být lokální (v místě nádoru), aby nedošlo k ataku zdravých buněk.

c) Blokovat u pacientů IL-10 - z informací uvedených výše (3.5.2., 3.5.3.3 a 3.5.4.3.) vyplývá, že působení IL-10 na NK buňky a dendritické buňky působí negativně. Navíc napomáhá makrofágům v polarizaci na M2 fenotyp. Ovšem IL-10 přispívá k přežívání B lymfocytů, jejich proliferaci a produkci protilátek. Z tohoto důvodu by byly důležité laboratorní experimenty, aby nedošlo k úmrtí pacienta na základě inhibice IL-10.

3/ Vyvolat přeměnu M2 na M1, N2 na N1.

a) N2->N1 - přeměny N2 na N1 by mohlo být docíleno blokací TGF-β (Fridlender a kol., 2009). Jako inhibitory TGF-β by se mohly použít malé molekuly jako dihydropyrrolpyrazol, imadazol, pyrazolopyridin, pyrazol, imidazopyridin, triazol, pyridopyrimidin nebo galunisertib (jeho použití v imunoterapii je již ale ve druhé fázi výzkumu) (de Gramont a kol., 2017). Blokací TGF-β by navíc nedocházelo k syntéze iNOS a ARG1 neutrofily, jež má za následek potlačení CD8+ T lymfocitární odpověď (Bodogai a kol., 2015).

b) M2->M1 - repolarizace M2 makrofágů na M1 makrofágy by mohla být uskutečněna pomocí inhibitorů STAT6 (*signal transducer and activator of transcription 6*) a IRF4 (*interferon regulatory factor-4*). STAT6 je aktivován IL-13 a jak jsem již zmínila v kapitole 3.5.2., IL-13 se podílí na aktivaci M2 makrofágů. Možným řešením by tedy mohla být inhibice IL-13 pomocí IL-13Rα2, jenž slouží jako blokovací receptor IL-13 (Srinivasan a kol., 2017). Inhibice IRF4 lze zase dosáhnout blokací CD30, který podporuje aktivitu p52 a RqIB (to jsou podjednotky NF-κB). Tyto podjednotky poté podporují expresi IRF4 (Boddicker a kol., 2015).

4/ Ukotvení stresových ligandů (glykolipidů) na povrchu nádorových buněk - imunoterapie založená na ukotvení stresových ligandů by vedla k aktivaci buněk vrozené imunity (NK buňky rozpoznávají tyto ligandy) a lýzi nádorových buněk (Woo a kol., 2015). Tato imunoterapie má potenciál pro zvýšení cytotoxických aktivit T buněk.

5/ Blokace onkostatinu M - blokací by došlo ke snížení produkce VEGF, a tím by se snížila invazivita nádoru. Tento princip by sloužil k prodloužení života pacienta.

6/ Adoptivní transfér buněk vrozené imunity - myslím, že s průlomovou imunoterapií přišel profesor Cui, který vpravil granulocyty od zdravého dárce do těla pacientky, která měla rakovinu v pokročilém stádiu s metastázemi v plicích, játrech, vaječnících a pánvi. Po infuzi chodila pacientka na kontroly a již 4 roky jsou rakovinné buňky ve stejném počtu, dále se nedělí a nerozšiřují (Le a Cui, 2018). Avšak nádorů pacientka nebyla zbavena. Domnívám se tedy, že by bylo ideální spojit více metod dohromady. Myslím, že by bylo dobré tuto terapii kombinovat například se mnou navrhovanou terapií 2a. Blokací MHC Ib by došlo ke zvýšené aktivaci NK buněk a tudíž i eliminaci nádorových buněk.

Pokud by se ale jednalo o pacienta bez zjevných metastáz, tak bych doporučovala místo operativního zákroku, který je v dnešní době stále velmi častý a je zátěží pro organismus, označit nádor houbou *Histoplasma capsulatum*. Tím by došlo k interakci s makrofágovými receptory a uvolnil by se TNF-α. TNF-α má vliv na nábor neutrofilů do nádorového prostředí a na zahájení fagocytózy.

Původně jsem myslela, že by mohla být nádorová imunoterapie založena i na posilnění syntézy cytokinu GM-CSF. Avšak z důvodu jeho rozdílných účinků, kdy jednou působí jako protumorový cytokin (např. u neutrofilů vyvolává produkci onkostatinu M) (Queen a kol., 2005) a jindy jako protitumorový, si myslím, že by nebylo vhodné jej používat jako imunoterapeutikum, jelikož by mohlo dojít k autoimunitním poruchám a možné smrti.

V této rešeršní práci jsem shrnula, jak jednotlivé buňky vrozené imunity rozeznávají nádorové buňky a na základě jakých receptorů, či faktorů je likvidují a z jakého důvodu se tak v některých případech neděje.

Domnívám se, že s nabytými vědomostmi o principech rozpoznávání a likvidace nádorových buněk buňkami vrozené imunity není takový problém označit primární nádor pro buňky vrozené imunity, aby došlo k jeho likvidaci. Dnes je to poměrně běžným principem imunoterapie, avšak většina navrhovaných imunoterapií se v dnešní době zaměřuje především na aktivaci buněk získané imunity. Nicméně si myslím, že

problém může nastat v pokročilém stádiu rakoviny, kdy je již běžný výskyt metastázových ložisek. Jelikož metastáze jsou roznášeny po těle krví, nemůžeme je tak snadno označit jako centrální nádor. Z tohoto důvodu usuzuji, že by bylo dobré se zaměřit na výzkum kultivace zdravých buněk vrozené imunity *in vitro* a jejich vložení do pacientova těla. Nebo se zaměřit, jak aktivovat apoptózu u poškozených buněk. Pokud by se podařilo chemickou sloučeninou aktivovat u poškozených buněk apoptózu, došlo by k automatickému nastartování vrozené i získané imunitní odpovědi, k likvidaci nádoru a metastáz a uzdravení pacienta.

Na závěr bych chtěla shrnout, že buňky vrozené imunity rozeznávají nádory mnoha receptory. Ovšem největším problémem je, že nádory negativně ovlivňují jejich rozeznávací funkce (ukrývají se před nimi) a mají vliv i na jejich změnu fenotypu, kdy je přeměňují, aby fungovaly ku nádorovému prospěchu.

5 ZÁVĚR

- Buňky vrozené imunity jsou slibnými kandidáty při nádorové imunoterapii.

- Byla shrnuta úloha vrozené imunity v protinádorové obraně organismu.

- Vypracovala jsem rešeršní práci s cílem využít získané informace o mechanismech rozpoznávání a likvidování nádorových buněk buňkami vrozené imunity k porozumnění a vylepšení postupů imunoterapie za pomoci právě těchto buněk.

- Navrhla jsem potencionální cesty imunoterapie založené na posilnění imunitní odpovědi prostřednictvím buněk vrozené imunity.

- Za největšího kandidáta imunoterapie založené na buňkách vrozené imunity považuji transfer těchto buněk od zdravého jedince do těla pacienta v kombinací s aktivací NK buněk prostřednictvím blokace MHC Ib molekul.

6 LITERATURA

Abrahámová, J., Povýšil, C., Dušek, L. (2008). Nádory varlat. *Grada Publishing*. 307s.

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

Acharyya, S., Oskarsson, T., Vanharanta, S., Malladi, S., Kim, J., Morris, P. G., Manova-Todorova, K., Leversha, M., Hogg, N., Seshan, V. E., Norton, L., Brogi, E., Massagué, J. (2012). A CXCL1 paracrine network links cancer chemoresistance and metastasis. *Cell*. 150:165-178.

Ames, B. N., Gold, L. S., Willett, W. C. (1995). The causes and prevention of cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 92:5258-5265.

Anand, P., Kunnumakara, A., B., Sundaram, C., Harikumar, K. B., Tharakan, S. T., Lai, O. S., Sung, B., Aggarwal, B. B. (2008). Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharmaceutical Research*. 25(9):2097-2116.

Anzai, A., Shimoda, M., Endo, J., Kohno, T., Katsumata. Y., Matsuhashi, T., Yamamoto, T., Ito, K., Yan, X., Shirakawa, K., Shimizu-Hirota, R., Yamada, Y., Ueha, S., Shinmura, K., Okada, Y., Fukuda, K., Sano, M. (2015). Adventitial CXCL1/G-CSF expression in response to acute aortic dissection triggers local neutrophil recruitment and activation leading to aortic rupture. *Circulation Research*. 116:612-623.

Arellano, M., Lonial, S. (2008). Clinical uses of GM-CSF, a critical appraisal and update. *Biologics*. 2:13-27.

Avalos, B. R. a kol. (1990). Human granulocyte colony-stimulating factor: Biologic activities and receptor characterization on hematopoietic cells and small cell lung cancer cell lines. *Blood*. 75:851-857.

Bachanova, V., Cooley, S., Defor, T. E., Verneris, M. R., Zhang, B., McKenna, D. H., Curtsinger, J., Panoskaltsis-Mortari, A., Lewis, D., Hippen, K., McGlave, P.,

Weisdorf, D. J., Blazar, B. R., Miller, J. S. (2014). Clearance of acute myeloid leukemia by haploidentical natural killer cells is improved using IL-2 diphtheria toxin fusion protein. *Blood*. 123(25):3855-63.

Bak, S. P., Walters, J. J., Takeya, M., Conejo-Garcia, J. R., Berwin, B. L. (2007). Scavenger receptor-A-targeted leukocyte depletion inhibits peritoneal ovarian tumor progression. *Cancer Research*. 67:4783-4789.

Banchereau, J., Steinman, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 392(6673):245-52.

Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y. J., Pulendran, B., Palucka, K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annual Review of Immunology*. 18:767-811.

Bartůňková, J., Vernerová, E. (2002). *Imunologie a alergologie*. Praha: Nakladatelství Triton. 83s.

Braumüller, H., Wieder, T., Brenner, E., Aßmann, S., Hahn, M., Alkhaled, M., Schilbach, K., Essmann, F., Kneilling, M., Griessinger, C., Ranta, F., Ullrich, S., Mocikat, R., Braungart, K., Mehra, T., Fehrenbacher, B., Berdel, J., Niessner, H., Meier, F., van den Broek, M., Häring, H. U., Handgretinger, R., Quintanilla-Martinez, L., Fend, F., Pesic, M., Bauer, J., Zender, L., Schaller, M., Schulze-Osthoff, K., Röcken, M. (2013). T-helper-1-cell cytokines drive cancer into senescence. *Nature*. 494(7437):361-5.

Bekes, E. M., Schweighofer, B., Kupriyanova, T. A., Zajac, E., Ardi, V. C., Quigley, J. P., Deryugina, E. I. (2011). Tumor-recruited neutrophils and neutrophil TIMP-free MMP-9 regulate coordinately the levels of tumor angiogenesis and efficiency of malignant cell intravasation. *The AmericanJournal of Pathology*. 179:1455-1470.

Benevides, L., da Fonseca, D. M., Donate, P. B., Tiezzi, D. G., De Carvalho, D. D., de Andrade, J. M., Martins, G. A., Silva, J. S. (2015). IL-17 Promotes Mammary

Tumor Progression by Changing the Behavior of Tumor Cells and Eliciting Tumorigenic Neutrophils Recruitment. *Cancer Research*. 75:3788-3799.

Betts, G., Jones, E., Junaid, S., El-Shanawany, T., Scurr, M., Mizen, P., Kumar, M., Jones, S., Rees, B., Williams, G., Gallimore, A., Godkin, A. (2012). Suppression of tumour-specific CD4(+) T cells by regulatory T cells is associated with progression of human colorectal cancer. *Gut*. 61(8):1163-71.

Beutler, B. (2004). Innate immunity: an overview. *Molecular Immunology*. 40:845-859.

Biswas, S. K., Mantovani, A. (2010). Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nature Immunology*. 11(10):889-896.

Biswas, S. K., Allavena, P., Mantovani, A. (2013). Tumor-associated macrophages: functional diversity, clinical significance, and open questions. *Seminars in Immunopathology*. 35(5):585-600.

Blattman, J. N., Greenberg, P. D. (2004). Cancer immunotherapy: a treatment for the masses. *Science*. 305(5681):200-205.

Boddicker, L. R., Sertac Kip, N., Xing, X., Zeng, Y., Yang, Z-Z., Lee, J-H., Almada,6 L. L., Elsawa, F. S., Knudson, A. R., Law, E. M., Ketterling, P. R., Cunningham, M. J., Wu, Y. a kol. (2015). The oncogenic transcription factor IRF4 is regulated by a novel CD30/NF-κB positive feedback loop in peripheral T-cell lymphoma. *Blood*. 125(20):3118-3127.

Bodogai, M., Moritoh, K., Lee-Chang, C. a kol. (2015). Immunosuppressive and Prometastatic functions of myeloid-derived suppressive cells rely upon education from tumor-associated B cells. *Cancer Research*. 75:3456-3465.

Bollrath, J., Phesse, T. J., von Burstin, V. A., Putoczki, T., Bennecke, M., Bateman, T., Nebelsiek, T., Lundgren-May, T., Canli, O., Schwitalla, S., Matthews, V., Schmid, R. M., Kirchner, T., Arkan, M. C., Ernst, M., Greten, F. R. (2009). gp130-Mediated Stat3 activation in enterocytes regulates cell survival and cell-cycle progression during colitis-associated tumorigenesis. *Cancer Cell*. 15(2):91-102.

Bonilla, F. A., Oettgen, H. C. (2010). Adaptive immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 125:S33-40.

Brada, M., Ford, D., Ashley, S., Bliss, J. M., Crowley, S., Mason, M., Rajan, B., Traish, D. (1992). Risk of second brain tumour after conservative surgery and radiotherapy for pituitary adenoma. *BMJ*. 304(6838):1343-1346.

Branzk, N., Lubojemska, A., Hardison, S. E., Wang, Q., Gutierrez, M. G., Brown, G. D., Papayannopoulos, V. (2014). Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens: Is immunity the second function of chromatin? *Nature Immunology*. 15:1017-1025.

Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram I., Siegel, L. R., Torre, A. R., Jemal A. (2018). *Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*.

Brill, A. a kol. (2011). Neutrophil extracellular traps promote deep vein thrombosis in mice. *Journal of Thrombosis and HaemostasisI*. 10:136-144.

Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, Ch., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D. S., Weinrauch, Y., Zychlinsky, A. (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 303:1532-1535.

Brinkmann, V., Zychlinsky, A. (2012). Neutrophil extracellular traps: Is immunity the second function of chromatin? *The Journal of Cell Biology*. 198:773-783.

Bryceson, Y. T., March, M. E., Ljunggren, H. G., Long, E. O. (2006). Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion. *Blood*. 107(1):159–66.

Caisová, V., Vieru, A., Kumžáková, Z., Glaserová, S., Husníková, H., Vácová, N., Krejčová, G., Paďouková, L., Jochmanová, I., Wolf, I. K., Chmelař, J., Kopecký, J., Ženka, J. (2016). Innate immunity based cancer immunotherapy: B16-F10 murine melanoma model. *BMC Cancer*. 16:940.

Caisová, V., Uhera, O., Nedbalová, P., Jochmanová, I., Kvardová, K., Masáková, K., Krejčová, G., Paďouková, L., Chmelař, J., Kopecký, J., Ženka, J. (2018). Effective cancer immunotherapy based on combination of TLR agonists with stimulation of phagocytosis. *International Immunopharmacology*. 59:86-96.

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

Cerboni, C., Zingoni, A., Cippitelli, M., Piccoli, M., Frati, L., Santoni, A. (2007). Antigen-activated human T lymphocytes express cell-surface NKG2D ligands via an ATM/ATR-dependent mechanism and become susceptible to autologous NK- cell lysis. *Blood*. 110(2):606-15.

Cisse, B. a kol. (2008). Transcription factor E2-2 is an essential and specific regulator of plasmacytoid dendritic cell development. *Cell*. 135(1):37-48.

Clark, R., Kupper, T. (2005). Old meets new: the interaction between innate and adaptive immunity. *Journal of Investigative Dermatology*. 125(4):629-637.

Coca, S., Perez-Piqueras, J., Martinez, D., Colmenarejo, A., Saez, M. A., Vallejo, C., Martos, J. A., Moreno, M. (1997). The prognostic significance of intratumoral natural killer cells in patients with colorectal carcinoma. *Cancer*. 79(12):2320-8.

Coffelt, S. B., Kersten, K., Doornebal, C. W., Weiden, J., Vrijland, K., Hau, C. S., Verstegen, N. J. M., Ciampricotti, M., Hawinkels, L. J. A. C., Jonkers, J., de Visser, K. E. (2015). IL-17-producing gammadelta T cells and neutrophils conspire to promote breast cancer metastasis. *Nature*. 522:345-348.

Coffelt, S. B., Wellenstein, M. D., de Visser, K. E. (2016). Neutrophils in cancer: neutral no more. *Nature Reviews Cancer*.16:431-446.

Colegio, O. R., Chu, N. Q., Szabo, A. L., Chu, T., Rhebergen, A. M., Jairam, V., Cyrus, N., Brokowski, C. E., Eisenbarth, S. C., Phillips, G. M., Cline, G. W., Phillips, A. J., Medzhitov, R. (2014). Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. *Nature*. 513(7519):559-563.

Comings, D. E. (1973). A general theory of carcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 70:3324-3328.

Cooper, M. A., Fehniger, T. A., Caligiuri, M. A. (2001). The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends in Immunology*. 22(11):633-40.

Croxford, J. L., Tang, M. L., Pan, M. F., Huang, C. W., Kamran, N., Phua, C. M., Chng, W. J., Ng, S. B., Raulet, D. H., Gasser, S. (2013). ATM-dependent spontaneous regression of early Emu-myc-induced murine B-cell leukemia depends on natural killer and T cells. *Blood*. 121(13):2512-21.

Cui, Z., Willingham, M. C., Hicks, A. M., Alexander-Miller, M. A., Howard, D., Hawkins, G. A., Miller, M. S., Weir, H. M., Du, W., DeLong, C. J. (2003). Spontaneous regression of advanced cancer: Identification of a unique genetically determined, age-dependent trait in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100(11):6682-6687.

Curiel, T. J., Coukos, G., Zou, L., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P. a kol. (2004). Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nature Medicine*. 10(9):942-949.

Dandekar, C. R., Kingaonkar, V. A., Dhabekar, S. G. (2011). Role of macrophages in malignancy. *Annals of Maxillofacial Surgery*. 1(2):150-154.

Davies, F. E., Raje, N., Hideshima, T., Lentzsch, S., Young, G., Tai, Y. T., Lin, B., Podar, K., Gupta, D., Chauhan, D., Treon, S. P., Richardson, P. G., Schlossman, R. L., Morgan, G. J., Muller, G. W., Stirling, D. I., Anderson, K. C. (2001). Thalidomide and immunomodulatory derivatives augment natural killer cell cytotoxicity in multiple myeloma. *Blood*. 98(1):210-6.

Davis, Z. B., Vallera, D. A., Miller, J. S., Felices, M. (2017). Natural killer cells unleashed: Checkpoint receptor blockade and BiKE/TriKE utilization in NK-mediated anti-tumor immunotherapy. *Seminars in Immunology*. 31:64-75.

de Gramont, A., Faivre, S., Raymond, E. (2017). Novel TGF-β inhibitors ready for prime time in onco-immunology. *Oncoimmunology*. 6(1):e1257453.

DeLeo, F. R., Allen, L. H., Apicella, M., Nauseef, W. M. (1999). NADPH oxidase activation and assembly during phagocytosis. *The Journal of Immunology*. 163:6732-6740.

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

Demers, M., Krause, D. S., Schatzberg, D., Martinod, K., Voorhees, J. R., Fuchs, A. T., Scadden, T. D., Wagner, D. D. (2012). Cancers predispose neutrophils to release extracellular DNA traps that contribute to cancer-associated thrombosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 109(32):13076-13081.

de Oliveira, S., Reyes-Aldasoro, C. C., Candel, S., Renshaw, S. A., Mulero, V., Calado, A. (2013). Cxcl8 (IL-8) mediates neutrophil recruitment and behavior in the zebrafish inflammatory response. *Journal of Immunology*. 190:4349-4359.

Di Carlo, E., Bastholt, L., Geertsen, P., Christensen, I. J., Larsen, S., Gehl, J., von der Maase, H. Albelda, S. M. (2005). The intriguing role of polymorphonuclear neutrophils in antitumor reactions: a prognostic model. *Blood*. 97:339-345.

Diefenbach, A., Jensen, E. R., Jamieson, A. M., Raulet, D. H. (2001). Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity. *Nature*. 413(6852):165-71.

Dunn, G., P., Old, L., J., Schreiber, R., D. (2004). The Immunobiology Review of Cancer Immunosurveillance and Immunoediting. *Immunity*. 21:137-148.

Dusek, L., Muzik, J., Maluskova, D., Májek, O., Pavlík, T., Koptíková, J., Melichar, B., Büchler, T., Fínek, J., Cibula, D., Babjuk, M., Svoboda, M., Vyzula, R., Ryska, A., Ryska, M., Petera, J., Abrahámová, J. (2014). Cancer incidence and mortality in the Czech Republic. *Klinická Onkologie*. 27:406-23.

Eruslanov, E. B., Bhojnagarwala, P. S., Quatromoni, J. G., Stephen, T. L., Ranganathan, A., Deshpande, C., Akimova, T., Vachani, A., Litzky, L., Hancock, W. W., Conejo-Garcia, J. R., Feldman, M., Albelda, S. M., Singhal, S. (2014). Tumor-associated neutrophils stimulate T cell responses in early-stage human lung cancer. *The Journal of clinical investigation*. 124:5466-5480.

Facciabene, A., Motz, G. T., & Coukos, G. (2012). T-regulatory cells: key players in tumor immune escape and angiogenesis. *Cancer Researchearch*. 72(9):2162-2171.

Fanger, N. A., Maliszewski, C. R., Schooley, K., Griffith, T. S. (1999). Human dendritic cells mediate cellular apoptosis via tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *The Journal of Experimental Medicine*. 190(8):1155-64.

Farag, S. S., Caligiuri, M. A. (2004). Cytokine modulation of the innate immune system in the treatment of leukemia and lymphoma. *Advances in Pharmacology*. 51:295-318.

Feng, Y., Santoriello, C., Mione, M., Hurlstone, A., Martin, P. (2010). Live imaging of innate immune cell sensing of transformed cells in zebrafish larvae: parallels between tumor initiation and wound inflammation. *PLoS biology*. 8:e1000562.

Feng, Y., Renshaw, S., Martin, P. (2012). Live imaging of tumor initiation in zebrafish larvae reveals a trophic role for leukocyte-derived PGE_2. *Current biology: CB*. 22:1253-1259.

Fialkow, L., Wang, Y., Dawney, G. P. (2007). Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. *Free Radical Biology and Medicin*e. 42:153-164.

Fidler, I. J. (1988). Macrophage therapy of cancer metastasis. *Ciba Foundation symposium*. 141:211-22.

Figdor, C. G., van Kooyk, Y., Adema, G. J. (2002). C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells. *Nature Reviews Immunology*. 2:77-84.

Finisguerra, V., Di Conza, G., Di Matteo, M., Serneels, J., Costa, S., Thompson, A. A., Wauters, E., Walmsley, S., Prenen, H., Granot, Z., Casazza, A., Mazzone, M. (2015). MET is required for the recruitment of anti-tumoural neutrophils. *Nature*. 522:349-353.

Fogg, D. K., a kol. (2006). A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells. *Science*. 311(5757):83-7.

Freisinger, C. M., Huttenlocher, A. (2014). Live Imaging and Gene Expression Analysis in Zebrafish Identifies a Link between Neutrophils and Epithelial to Mesenchymal Transition. *PLoS one*. 9:e112183.

Fridlender, Z. G., Sun, J., Kim, S., Kapoor, V., Chang, G., Link, L., Worthen, G. S., Albelda, S. M. (2009). Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-β: "N1" versus "N2" TAN. *Cancer Cell*. 16:183-94.

Fridlender, Z. G., Albelda, S. M. (2012). Tumor-associated neutrophils: friend or foe? *Carcinogenesis*. 33:949-955.

Fuchs, E. J., Matzinger, P. (1996). Is cancer dangerous to the immune system? *Seminars in Immunology*. 8:271-80.

Fuchs, T. A., Abed, U., Goosmann, CH., Hurwitz, R., Schulze, I., Wahn, V., Weinrauch, Y., Brinkmann, V., Zychlinsky, A. (2007). Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *The Journal of Cell Biology*. 176:231-241.

Futosi, K., Fodor, S., Mócsai, A. (2013). Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. *International Immunopharmacology*. 17(3):638-650.

Gabrilovich, D., Abe, M., Onishi, C., Taketani, T., Purevsuren, J., Yamaguchi, S. a kol. (2004). Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects: „N1“ versus „N2“ TAN. *Nature Reviews Immunology*. 4(12):941-952.

Gardai, S. J., McPhillips, K. A., Frasch, S. C., Janssen, W. J., Starefeldt, A., Murphy-Ullrich, J. E., Bratton, D. L., Oldenborg, P. A., Michalak, M., Henson, P. M. (2005). Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte. *Cell*. 123(2):321-334.

Garlanda, C., Bottazzi, B., Bastone, A., Mantovani, A. (2005). Pentraxins at the crossroads between innate immunity, inflammation, matrix deposition, and female fertility. *Annual Review of Immunology*. 23:337-366.

Gasteiger, G., Hemmers, S., Firth, M. A., Le Floc'h, A., Huse, M., Sun, J. C., Rudensky, A. Y. (2013). IL-2-dependent tuning of NK cell sensitivity for target cells is controlled by regulatory T cells. *The Journal of Experimental Medicine*. 210(6):1167-78.

Georgoudaki, A. M., Prokopec, E. K., Boura, F. V., Hellqvist, E., Sohn, S., Östling, J., Dahan, R., Harris, A. R., Rantalainen, M., Klevebring, D., Sund, M., Brage, E. S., Fuxe, J. a kol. (2016). Reprogramming tumor-associated macrophages by antibody targeting inhibits cancer progression and metastasis. *Cell Reports*. 15:2000-11.

Gerlinger, M., Rowan, A. J., Horswell, S., Larkin, J., Endesfelder, D., Gronroos, E., Martinez, P., Matthews, N., Stewart, A., Tarpey, P., Varela, I., Phillimore, B., Begum, S., McDonald, N. Q., Butler, A., Jones, D., Raine, K., Latimer, C., Santos, C. R., Nohadani, M., Eklund, A. C., Spencer-Dene, B., Clark, G., Pickering, L., Stamp, G., Gore, M., Szallasi, Z., Downward, J., Futreal, P. A., Swanton, C. (2012). Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *The New England Journal of Medicine*. 366(10):883-92.

Gijsbers, K. a kol. (2005). GCP-2/CXCL6 synergizes with other endothelial cell-derived chemokines in neutrophil mobilization and is associated with angiogenesis in gastrointestinal tumors. *Experimental Cell Research*. 303:331-342

Gineau, L., Cognet, C., Kara, N., Lach, F. P., Dunne, J., Veturi, U., Picard, C., Trouillet, C., Eidenschenk, C., Aoufouchi, S., Alcais, A., Smith, O., Geissmann, F., Feighery, C., Abel, L., Smogorzewska, A., Stillman, B., Vivier, E., Casanova, J. L., Jouanguy, E. (2012). Partial MCM4 deficiency in patients with growth retardation adrenal insufficiency, and natural killer cell deficiency. *Journal of Clinical Investigation*. 122(3):821-32.

Gonzalez, A., Rebmann, V., LeMaoult, J., Horn, P. A., Carosella, E. D., Alegre, E. (2012). The immunosuppressive molecule HLA-G and its clinical implications. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*. 49(3):63-84.

Gordon, S. (2003). Macrophages and theimmune response. *In Fundamental Immunology*. 481-95.

Grivennikov, S., Karin, E., Terzic, J., Mucida, D., Yu, G. Y., Vallabhapurapu, S., Scheller, J., Rose-John, S., Cheroutre, H., Eckmann, L., Karin, M. (2009). IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. *Cancer Cell*. 15(2):p.241.

Grivennikov, S. I., Greten, F. R., Karin, M. (2010). Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell*. 140(6):883-899.

Grugan, K. D., McCabe, F. L., Kinder, M., Greenplate, A. R., Harman, B. C., Ekert, J. E., van Rooijen, N., Anderson, G. M., Nemeth, J. A., Strohl, W. R. a kol. (2012). Tumor-associated macrophages promote invasion while retaining Fc-dependent anti-tumor function. *The Journal of Immunology*. 189:5457-66.

Guillerey, C., Smyth, M. J. (2016). NK Cells and Cancer Immunoediting. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 395:115-45.

Gumperz, J. E., Litwin, V., Phillips, J. H., Lanier, L. L., Parham, P. (1995). The Bw4 public epitope of HLA-B molecules confers reactivity with natural killer cell clones that express NKB1, a putative HLA receptor. *Journal of Experimental Medicine*. 181(3):1133-44.

Güngör, N., Knaapen, A. M., Munnia, A., Peluso, M., Haenen, G. R., Chiu, R. K., Godschalk, R. W. L., van Schooten, F. J. (2010). Genotoxic effects of neutrophils and hypochlorous acid. *Mutagenesis*. 25:149-154.

Hagemann, T., Wilson, J., Burke, F., Kulbe, H., Li, N. F., Plüddemann, A., Charles, K., Gordon, S., Balkwill, F. R. (2006). Ovarian cancer cells polarize macrophages toward a tumor-associated phenotype. *Journal of Immunol*. 176:5023-5032.

Hanahan, D., Weinberg, R. A., Kleijmeer, M., Davoust, J., van Endert, P., Amigorena, S. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 144(5):646-674.

Hardy, A. W., Graham, D. R., Shearer, G. M., Herbeuval, J. P. (2007). HIV turns plasmacytoid dendritic cells (pDC) into TRAIL-expressing killer pDC and down-

regulates HIV coreceptors by Toll-like receptor 7-induced IFN-alpha. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*. 104(44):17453-8.

Hatina, J. (2005). Imunologie nádorů - současný stav a poznatky z 1. mezinárodní konference základní a klinické imunogenomiky. Část I - interakce nádoru a imunitního systému. *Klinická Onkologie*. 18:119-125.

Haynes-Gilmore, N., Banach, M., Edholm, E. S., Lord, E., Robert, J. (2014). A critical role of non-classical MHC in tumor immune evasion in the amphibian Xenopus model. *Carcinogenesis*. 100s.

He, S., Lamers, G. E., Beenakker, J. W., Cui, C., Ghotra, V. P., Danen, E. H., Meijer, A. H., Spaink, H. P., Snaar-Jagalska, B. E. (2012). Neutrophil-mediated experimental metastasis is enhanced by VEGFR inhibition in a zebrafish xenograft model. *The Journal of pathology*. 227:431-445.

Heidenreich, S., Zu Eulenburg, C., Hildebrandt, Y., Stubig, T., Sierich, H., Badbaran, A., Eiermann, T. H., Binder, T. M., Kroger, N. (2012). Impact of the NK cell receptor LIR-1 (ILT-2/CD85j/LILRB1) on cytotoxicity against multiple myeloma. *Clinical and Developmental Immunology*. 2012:652130.

Hejmadi, M. (2010). Introduction to Cancer Biology. Dánsko: *Ventus Publishing ApS*.

Hennessy, E. J., Parker, A. E., O'Neill, L. A. (2010). Targeting Toll-like receptors: emerging therapeutics? *Nature Reviews Drug Discovery*. 9(4):293-307.

Herant, M., Heinrich, V., Demo, M. (2006). Mechanics of neutrophil phagocytosis: experiments and quantitative models. *Journal of Cell Science*. 119:279-289.

Hettinger, J. a kol. (2013). Origin of monocytes and macrophages in a committed progenitor. *Natural Immunology*. 14(8):821-30.

Hicks, A. M., Riedlinger, G., Willingham, M. C., Alexander-Miller, M. A., Von Kap-Herr, C., Pettenati, M. J., Sanders, A. M., Weir, H. M., Du, W., Kim, J., Simpson, A. J. G., Old, L. J., Cui, Z. (2006). Transferable anticancer innate immunity

in spontaneous regression/complete resistance mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103(20):7753-7758.

Hirose, Y., Saijou, E., Sugano, Y., Takeshita, F., Nishimura, S., Nonaka, H., Chen, Y. R., Sekine, K., Kido, T., Nakamura, T. a kol. (2012). Inhibition of Stabilin-2 elevates circulating hyaluronic acid levels and prevents tumor metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 109:4263-4268.

Holtan, S. G., Creedon, D. J., Haluska, P., Markovic, S. N., Becker, J. C., Eggert, A. O. a kol. (2009). Cancer and Pregnancy: Parallels in Growth, Invasion, and Immune Modulation and Implications for Cancer Therapeutic Agents. *Mayo Clinic Proceedings*. 84(11):985-1000.

Hořejší, V., Bartůňková, J. (2009). *Základy imunologie* (4. vyd.). Praha: Triton.

Hořejší, V., Bartůňková, J., Brdička, T., Špíšek, R. (2017). *Základy imunologie* (6. aktualizované vydání). Praha: Triton.

Houghton, A. M., Rzymkiewicz, D. M., Ji, H., Gregory, A. D., Egea, E. E., Metz, H. E., Stolz, D. B., Land, S. R., Marconcini, L. A., Kliment, C. R., Jenkins, K. M., Beaulieu, K. A., Mouded, M., Frank, S. J., Wong, K. K., Shapiro, S. D. (2010). Neutrophil elastase-mediated degradation of IRS-1 accelerates lung tumor growth. *Nature Medicine*. 16:219-223.

Huang, J-H., Lin, Ch. Y., Wu, S-Y., Chen, W-Y., Chu, Ch-L., Brown D. G, Chuu, Ch-P., Wu-Hsieh, A. B. (2015). CR3 and Dectin-1 Collaborate in Macrophage Cytokine Response through Association on Lipid Rafts and Activation of Syk-JNK-AP-1 Pathway. *PLoS Pathogens*. 11(7):e1004985.

Huang, Y., Ma, Y., Gao, P., Yao, Z. (2017). Targeting CD47: the achievements and concerns of current studies on cancer immunotherapy. *Journal of Thoracic Disease*. 9(2):E168-E174.

Hughes, D. A., Fraser, I. P., Gordon, S. (1995). Murine macrophage scavenger receptor: *in vivo* expression and function as receptor for macrophage adhesion in lymphoid and non-lymphoid organs. *European Journal of Immunology*. 25:466-473.

Hume, D. A. (2015). The many alternative faces of macrophage activation. *Front Immunology*. 6:370.

Hynková, L., Doleželová, H. (2008). Nežádoucí účinky radioterapie a podpůrná léčba u radioterapie nádorů hlavy a krku. *Onkologie*. 2(2):88-90.

Chabner, B. A., Chabner Thompson, E. (2013). Overview of Cancer: Introduction to Overview of Cancer. *Merck Manual*. 1.

Chain, B. M. (2003). Current issues in antigen presentation-focus on the dendritic cell. *Immunology Letters*. 89(2-3):237-241.

Champlin, R. E., Golde, D. W. (1985). Chronic myelogenous leukemia: Recent advances. *Blood*. 65:1039-1047.

Chang, C. L., Hsu, H. Y., Lin, H. Y., Chiang, W., Lee, H. (2008). Lysophosphatidic acid-induced oxidized low-density lipoprotein uptake is class A scavenger receptor-dependent in macrophages. *Prostaglandins Other Lipid Mediators*. 87:20-25.

Chao, M. P., Majeti, R., Weissman, I. L. (2012). Programmed cell removal: A new obstacle in the road to developing cancer. *Nature Reviews Cancer*. 12(1):58-67.

Chaplin, D. D. (2010). Overview of the immune response. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 125(2):3-23.

Chen, D. S., Mellman, I. (2013). Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity*. 39:1-10.

Chitadze, G., Bhat, J., Lettau, M., Janssen, O., Kabelitz, D. (2013). Generation of soluble NKG2D ligands: proteolytic cleavage, exosome secretion and functional implications. *Scand The Journal of Immunology*. 78(2):120-9.

Chiurchiù, V., Maccarrone, M. (2011). Chronic inflammatory disorders and their redox control: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxidants & Redox Signaling*. 15:2605-2641.

Christoffersson, G., Vågesjö, E., Vandooren, J., Lidén, M., Massena, S., Reinert, R. B., Brissova, M., Powers, A. C., Opdenakker, G., Phillipson, M. (2012). VEGF-A recruits a proangiogenic MMP-9-delivering neutrophil subset that induces angiogenesis in transplanted hypoxic tissue. *Blood*. 120:4653-4662.

Imai, K., Matsuyama, S., Miyake, S., Suga, K., Nakachi, K. (2000). Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. *The Lancet*. 356(9244):1795-9.

Ishigami, S., Natsugoe, S., Tokuda, K., Nakajo, A., Che, X., Iwashige, H., Aridome, K., Hokita, S., Aikou, T. (2000). Prognostic value of intratumoral natural killer cells in gastric carcinoma. *Cancer*. 88(3):577-83.

Janeway, C. A. Jr., Travers, P., Walport, M. (2001). Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th edition. New York: *Garland Science*.

Janjic, B. M., Lu, G., Pimenov, A., Whiteside, T. L., Storkus, W. J., Vujanovic, N. L. (2002). Innate direct anticancer effector function of human immature dendritic cells. I. Involvement of an apoptosis-inducing pathway. *The Journal of Immunology*. 168(4):1823-30.

Janotová, T., Jalovecká, M., Auerová, M., Švecová, I., Bruzlová, P., Maierová, V., Kumžáková, Z., Čunátová, Š., Vlčková, Z., Caisová, V., Rozsypalová, P., Lukáčová, K., Vácová, N., Wachtlová, M., Salát, J., Lieskovská, J., Kopecký, J., Ženka, J. (2014). The Use of Anchored Agonists of Phagocytic Receptors for Cancer Immunotherapy: B16-F10 Murine Melanoma Model. *PLoS one*. 9(1):e85222.

Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E., Forman, D. (2011). Global cancer statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 61(2):69-90.

Jiang X, Lopez A, Holyoake T, Eaves A, Eaves C. (1999). Autocrine production and action of IL-3 and granulocyte colony-stimulating factor in chronic myeloid leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 96:12804-12809.

Joshita, S. a kol. (2009). Granulocyte-colony stimulating factor-producing pancreatic adenosquamous carcinoma showing aggressive clinical course. *Internal Medicine*. 48:687.691.

Józefowski, S., Arredouani, M., Sulahian, T., Kobzik, L. (2005). Disparate regulation and function of the class A scavenger receptors SR-AI/II and MARCO. *The Journal of Immunology*. 175:8032–8041.

Kaufmann, H., Medzhitov, R., Gordon, S. (2004). The Innate Immune Response To Infection. *ASM Press*. 465.

Keefe, D., Shi, L., Feske, S., Massol, R., Navarro, F., Kirchhausen, T., Lieberman, J. (2005). Perforin triggers a plasma membrane-repair response that facilitates CTL induction of apoptosis. *Immunity*.23(3):249-62.

Kim, D., Wang, J., Willingham, S. B., Martin, R., Wernig, G., Weissman, I. L. (2012). Anti-CD47 antibodies promote phagocytosis and inhibit the growth of human myeloma cells. *Leukemia*. 26(12):2538-2545.

Kim, R., Emi, M., Tanabe, K. (2007). Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology*. 121:1-14.

Klabusay, M. (2015). The Role of Regulatory T-cells in Antitumor Immune Response. *Klinická Onkologie*. 28:23-27.

Klener, P., Klener, P. jr. (2010). Nová protinádorová léčiva a léčebné strategie v onkologii. *Grada Publishing*. 209s.

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

Kowanetz, M. a kol. (2010). Granulocyte-colony stimulating factor promotes lung metastasis through mobilization of Ly6G+Ly6C+ granulocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107:21248-21255.

Krejsek, J., Kopecký, O. (2004). Klinická imunologie. Hradec Králové: *Nucleus HK*.

Krejsek, J., Andrýs, C., Krčmová, I. (2016). Imunologie člověka. Hradec Králové: *Garamon*.

Labrousse, A., Meunier, E., Rekord, J., Labernadie, A., Beder, A., Vieu, C., Safra, T., Maridonneau-Parini, I. (2011). Frustrated phagocytosis on micropatterned immune complexes to characterize lysosome movements in live macrophages. *Frontiers in Immunology*. 2:51.

Lakomy, D., Janikashvili, N., Fraszczak, J., Trad, M., Audia, S., Samson, M., Ciudad, M., Vinit, J., Vergely, C., Caillot, D., Foucher, P., Lagrost, L., Chouaib, S., Katsanis, E., Larmonier, N., Bonnotte, B. (2011). Cytotoxic dendritic cells generated from cancer patients. *The Journal of Immunology*. 187(5):2775-82.

Lammermann, T., Afonso, P. V., Angermann, B. R., Wang, J. M., Kastenmüller, W., Parent, C. A., Germain, R. N. (2013). Neutrophil swarms require LTB4 and integrins at sites of cell death *in vivo*. *Nature*. 498:371-375.

Lanier, L. L. (2008). Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Natural Immunology*. 9(5):495-502.

Lanza, F. (1998). Clinical manifestation of myeloperoxidase deficiency. *Journal of Molecular Medicine*. 76:676-81.

Laoui, D., Van Overmeire, E., Conza, G. D., Aldeni, C., Keirsse, J., Morias, Y., Movahedi, K., Houbracken, I., Schouppe, E., Elkrim, Y., Karroum, O., Jordan, B., Carmeliet, P., Gysemans, C., De Baetselier, P., Mazzone, M., Van Ginderachter, J. A. (2014). Tumor hypoxia does not drive differentiation of tumor-associated macrophages but rather fine-tunes the M2-like macrophage population. *Cancer Researchearch*. 74(1):24-30.

Lawrence, T., Natoli, G. (2011). Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. *Nature Reviews Immunology*. 11:750-61.

Le, W., Cui, Z. (2018). Natural cancer-killing activity of human granulocytes. *Integrative Cancer Science and Therapeutics*. 5(1):1-7.

LeBert, D. C., Squirrell, J. M., Rindy, J., Broadbridge, E., Lui, Y., Zakrzewska, A., Eliceiri, K. W., Meijer, A. H., Huttenlocher, A. (2015). Matrix metalloproteinase 9 modulates collagen matrices and wound repair. *Development*. 142:2136-2146.

Levin, S. D., Taft, D. W., Brandt, C. S., Bucher, C., Howard, E. D., Chadwick, E. M., Johnston, J., Hammond, A., Bontadelli, K., Ardourel, D., Hebb, L., Wolf, A., Bukowski, T. R., Rixon, M. W., Kuijper, J. L., Ostrander, C. D., West, J. W., Bilsborough, J., Fox, B., Gao, Z., Xu, W., Ramsdell, F., Blazar, B. R., Lewis, K. E. (2011). Vstm3 is a member of the CD28 family and an important modulator of T-cell function. *European Journal of Immunology*. 41(4):902-15.

Lin, E. Y., Li, J.-F., Gnatovskiy, L., Deng, Y., Zhu, L., Grzesik, D. A., Qian, H., Xue, X. N., Pollard, J. W. (2006). Macrophages regulate the angiogenic switch in a mouse model of breast cancer. *Cancer Researchearch*. 66(23):11238-11246.

Lin, A., Yan, W. H. (2015). HLA-G expression in cancers: roles in immune evasion. metastasis and target for therapy. *Molecular Medicine Reports.* 21(1):782-791.

Liu, M., Chen, K., Yoshimura, T., Liu, Y., Gong, W., Le, Y., Gao, J. L., Zhao, J., Wang, J. M., Wang, A. (2014). Formylpeptide receptors mediate rapid neutrophil mobilization to accelerate wound healing. *PLoS one*. 9:e90613.

Ljunggren, H. G., Kärre, K. (1985). Host resistance directed selectively against H-2-deficient lymphoma variants. Analysis of the mechanism. *The Journal of Experimental Medicine*. 162(6):1745-59.

Ljunggren, H. G., Karre, K. (1990). In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunology Today*. 11(7):237-44.

Long, B. K., Beatty, L. G. (2013). Harnessing the antitumor potential of macrophages for cancer immunotherapy. *Oncoimmunology*. 2(12):e26860.

Long, E. O., Kim, H. S., Liu, D., Peterson, M. E., Rajagopalan, S. (2013). Controlling natural killer cell responses: integration of signals for activation and inhibition. *Annual Review of Immunology*. 31:227-58.

Lu, H., Ouyang, W., Huang, Ch. (2006). Inflammation, a Key Event in Cancer Development. *Molecular Cancer Researchearch*. 4:221.

Lu, Y. C., Robbins, P. F. (2016). Cancer immunotherapy targeting neoantigens. *Seminars in Immunology*. 28(1):22-27.

Lundholm, M., Schroder, M., Nagaeva, O., Baranov, V., Widmark, A., Mincheva-Nilsson, L., Wikstrom, P. (2014). Prostate tumor-derived exosomes down-regulate NKG2D expression on natural killer cells and CD8+ T cells: mechanism of immune evasion. *PLoS one*. 9(9):e108925.

Malnati, M. S., Peruzzi, M., Parker, K. C., Biddison, W. E., Ciccone, E., Moretta, A., Long, E. O. (1995). Peptide specificity in the recognition of MHC class I by natural killer cell clones. *Science*. 267(5200):1016-8.

Mantovani, A., Sica, A. (2010). Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. *Current Opinion in Immunology*. 22(2):231-237.

Mantovani, A., Cassatella, M. A., Costantini, C., Jaillon, S. (2011). Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology*. 11:519-531.

Marcus, A., Gowen, B. G., Thompson, T. W. a kol. (2014). Recognition of tumors by the innate immune system and natural killer cells. *Advances in Immunology*. 122:91-128.

Martinez, F. O., Helming, L., Milde, R., Varin, A., Melgert, B. N., Draijer, C., Thomas, B., Fabbri, M., Crawshaw, A., Ho, L. P., Ten Hacken, N. H., Cobos Jiménez, V., Kootstra, N. A., Hamann, J., Greaves, D. R., Locati, M., Mantovani, A., Gordon, S. (2013). Genetic programs expressed in resting and IL-4 alternatively activated mouse and human macrophages: similarities and differences. *Blood*. 121:e57-69.

Martin-Fontecha, A., Thomsen, L. L., Brett, S., Gerard, C., Lipp, M., Lanzavecchia, A., Sallusto, F. (2004). Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming. *Nature immunology*. 5(12):1260-5.

Martins, F. C., de Oliveira, C. F. (2008). Chemotherapy and the future: microdialysis as a local administration technique. *European Journal of Gynaecological Oncology*. 30(1):5-8.

Marvel, D., Gabrilovich, D. I. (2015). Myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment: expect the unexpected. *Journal of Clinical Investigation*. 125(9):3356-64.

Massberg, S. a kol. (2010). Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases. *Nature Medicine*. 16:887-896.

Maxeiner, H., Husemann, J., Thomas, C. A., Loike, J. D., El Khoury, J., Silverstein, S. C. (1998). Complementary roles for scavenger receptor A and CD36 of human monocyte-derived macrophages in adhesion to surfaces coated with oxidized low-density lipoproteins and in secretion of H2O2. *The Journal of Experimental Medicine*. 188:2257-2265.

Mazzieri, R., Pucci, F., Moi, D., Zonari, E., Ranghetti, A., Berti, A., Politi, L. S., Gentner, B., Brown, J. L., Naldini, L., De Palma, M. (2011). Targeting the ANG2/TIE2 axis inhibits tumor growth and metastasis by impairing angiogenesis and disabling rebounds of proangiogenic myeloid cells. *Cancer Cell*. 19(4):512-526.

McCann, F. E, Eissmann, P., Onfelt, B., Leung, R., Davis, D. M. (2007). The activating NKG2D ligand MHC class I-related chain A transfers from target cells to NK cells in a manner that allows functional consequences. *Journal of Immunology*. 178(6):3418-26.

McDonald, B., Pittman, K., Menezes, G. B., Hirota, S. A., Slaba, I., Waterhouse, C. C., Beck, P. L., Muruve, D. A., Kubes, P. (2010). Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. *Science*. 330:362-366.

Medzhitov, R., Janeway, C. A. (1997). Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Current Opinion in Structural Biology*. 9:4-9.

Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., Janeway Jr., C. A. (1997). A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*. 388:394-397.

Medzhitov, R., Janeway, C. A. (2000). Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunological Reviews*. 173(1):89-97.

Meiliana, A., Dewi, N. M., Wijaya, A. (2016). Cancer Immunotherapy: A Review. *The Indonesian Biomedical Journal*. 8(1):1-21.

Mendelsohn, C. L., Wimmer, E., Racaniello, V. R. (1989). Cellular receptor for poliovirus: molecular cloning nucleotide, sequence and expression of a new member of the immunoglobulin superfamily. *Cell*. 56(5):855-65.

Merad, M. a kol. (2013). The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annual Review of Immunology*. 31:563-604.

Millard, P. J., Henkart, M. P., Reynolds, C. W., Henkart, P. A. (1984). Purification and properties of cytoplasmic granules from cytotoxic rat LGL tumors. *Journal of Immunology*. 132(6):3197-204.

Miller, J. D., Weber, D. A., Ibegbu, C., Pohl, J., Altman, J. D., Jensen, P. E. (2003). Analysis of HLA-E peptide-binding specificity and contact residues in bound peptide required for recognition by CD94/NKG2. *Journal of Immunology*. 171(3):1369-75.

Mingye, F., Chen, J. Y., Weissman-Tsukamoto, R., Volkmer, J. P., Ho, P. Y., McKenna, K. M., Cheshier, S., Zhang, M., Guo, N., Gip, P., Mitra, S. S., Weissman, I. L. (2015). Macrophages eat cancer cells using their own calreticulin as a guide: Roles of TLR and Btk. *PNAS*. 112(7):2145-2150.

Miyanishi, M., Tada, K., Koike, M., Uchiyama, Y., Kitamura, T., Nagata, S. (2007). Identification of Tim4 as a phosphatidylserine receptor. *Nature*. 450:435-9.

Moles, A., Murphy, L., Wilson, C. L., Chakraborty, J. B., Fox, C., Park, E. J., Mann, J., Oakley, F., Howarth, R., Brain, J., Masson, S., Karin, M., Seki, E.,

Mann, D. A. (2014). A TLR2/S100A9/CXCL-2 signaling network is necessary for neutrophil recruitment in acute and chronic liver injury in the mouse. *Journal of Hepatology*. 60:782-791.

Moore, R. J., Owens, D. M., Stamp, G., Arnott, C., Burke, F., East, N., Holdsworth, H., Turner, L., Rollins, B., Pasparakis, M., Kollias, G., Balkwill, F. (1999). Mice deficient in tumor necrosis factor-alpha are resistant to skin carcinogenesis. *Nature Medicine*. 5:828-831.

Morales, A., Eidinger, D., Bruce, A. W. (1976). Intracavitary Bacillus Calmette Guerin in the treatment of superficial bladder tumors. *Journal of Urology*. 2:180-183.

Moretta, A., Marcenaro, E., Sivori, S., Della Chiesa, M., Vitale, M., Moretta, L. (2005). Early liaisons between cells of the innate immune system in inflamed peripheral tissues. *Trends Immunol*. 26(12):668-75.

Motz, G. T., Coukos, G. (2013). Deciphering and Reversing Tumor Immune Suppression. *Immunity*. 39:61-73.

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

Moynihan, K. D., Irvine, J. D. (2017). Roles for Innate Immunity in Combination Immunotherapies. *Cancer Researchearch*. 77:5215-5221.

Murphy, P. M. (1997). Neutrophil receptors for interleukin-8 and related CXC chemokines. *Seminars in hematology*. 34:311-318.

Murphy, T. L. a kol. (2016). Transcriptional Control of Dendritic Cell Development. *Annual Review of Immunology*. 34:93-119.

Murray, P., Allen, J., Biswas, S., Fisher, E. A., Gilroy, D. W., Goerdt, S., Gordon, S., Hamilton, J. A., Ivashkiv, L. B., Lawrence, T., Locati, M., Mantovani, A., Martinez, F. O., Mege, J. L., Mosser, D. M., Natoli, G., Saeij, J. P., Schultze, J. L., Shirey, K. A., Sica, A., Suttles, J., Udalova, I., van Ginderachter, J. A., Vogel, S. N.,

Wynn, T. A. (2014). Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity*. 41(1):14-20.

Nagashima, S., Mailliard, R., Kashii, Y., Reichert, T. E., Herberman, R. B., Robbins, P. a kol. (1998). Stable transduction of the interleukin-2 gene into human natural killer cell lines and their phenotypic and functional characterization *in vitro* and *in vivo*. *Blood*. 91:3850-3861.

Nathan, C. F. (1987). Secretory products of macrophages. *Journal of Clinical Investigation*. 79:319-26.

Nedbalová, P. (2017). Úloha vrozené a získané imunity v imunoterapii melanomu a pankreatického adenokarcinomu. Diplomová práce.

Neth, O. W., Bajaj-Elliott, M., Turner, M. W., Klein, N. J. (2005). Susceptibility to infection in patients with neutropenia: The role of innate immune system. *British Journal of Haematology*. 129(6):713-722.

Neyen, C., Plüddemann, A., Mukhopadhyay, S., Maniati, E., Bossard, M., Gordon, S., Hagemann, T. (2013). Macrophage scavenger receptor a promotes tumor progression in murine models of ovarian and pancreatic cancer. *The Journal of Immunology*. 190(7):3798-805.

Niethammer, P., Grabher, C., Look, A. T., Mitchison, T. J. (2009). A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish. *Nature*. 459:996-999.

Nozawa, H., Chiu, C., Hanahan, D. (2006). Infiltrating neutrophils mediate the initial angiogenic switch in a mouse model of multistage carcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103:12493-12498.

Onai, N. a kol. (2007). Identification of clonogenic common Flt3+M-CSFR+ plasmacytoid and conventional dendritic cell progenitors in mouse bone marrow. *Natural Immunology*. 8(11):1207-16.

Opdenakker, G., Van Damme, J. (2004). The countercurrent principle in invasion and metastasis of cancer cells. Recent insights on the roles of chemokines. *The International Journal of Developmental Biology*. 48:519-527.

Orentas, R. J., Kohler, M. E., Johnson, B. D. (2006). Suppression of anti-cancer immunity by regulatory T cells: back to the future. *Seminars in Cancer Biology*. 16(2):137-49.

Ostrand-Rosenberg, S., Sinha, P. (2009). Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer. *The Journal of Immunology*. 182(8):4499-506.

O'Sullivan, T., Saddawi-Konefka, R., Vermi, W., Koebel, C. M., Arthur, C., White, J. M., Uppaluri, R., Andrews, D. M., Ngiow, S. F., Teng, M. W., Smyth, M. J., Schreiber, R. D., Bui, J. D. (2012). Cancer immunoediting by the innate immune system in the absence of adaptive immunity. *The Journal of Experimental Medicine*. 209(10):1869-82.

Park, J., Wysocki, R. W., Amoozgar, Z., Maiorino, L., Fein, M. R., Jorns, J., Schott, N. F., Kinugasa-Katayama, Y., Lee, Y., Won, N. H., Nakasone, E. S., Hearn, S. A., Küttner, V., Qiu, J., Almeida, A. S., Perurena, N., Kessenbrock, K., Goldberg, M. S., Egeblad, M. (2016). Cancer cells induce metastasis-supporting neutrophil extracellular DNA traps. *Science Transplational Medicine*. 8:1-12.

Parker, K. H., Beury, D. W., Ostrand-Rosenberg, S. (2015). Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Immunotherapy of Cancer*. 95-139.

Parkin, J., Cohen, B., Ostrand-Rosenberg, S., Li, F., Zhang, H., Villa, A. a kol. (2001). An overview of the immune system. *The Lancet*. 357(9270):1777-1789.

Patnaik, A., Swanson, K. D., Csizmadia, E., Solanki, A., Landon-Brace, N., Gehring, M. P., Helenius, K., Olson, B. M., Pyzer, A. R., Wang, L. C., Elemento, O., Novak, J. a kol. (2017). Cabozantinib Eradicates Advanced Murine Prostate Cancer by Activating Antitumor Innate Immunity. *Cancer Discovery*. 7(7):750-765.

Pedroza-Pacheco, I., Madrigal, A., Saudemont, A. (2013). Interaction between natural killer cells and regulatory T cells: perspectives for immunotherapy. *Cellular & Molecular Immunology*. 10(3):222-9.

Perez-Gracia, J. L., Labiano, S., Rodriguez-Ruiz, M. E., Sanmamed, M. F., Melero, I., Ryska, M. a kol. (2014). Orchestrating immune check-point blockade for cancer immunotherapy in combinations. *Cancer Epidemiology*. 38(1):28-34.

Peter, M. E., Krammer, P. H. (2003). The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ*. 10(1):26-35.

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

Petrie, E. J., Clements, C. S., Lin, J., Sullivan, L. C., Johnson, D., Huyton, T., Heroux, A., Hoare, H. L., Beddoe, T., Reid, H. H., Wilce, M. C., Brooks, A. G., Rossjohn, J. (2008). CD94-NKG2A recognition of human leukocyte antigen (HLA)-E bound to an HLA class I leader sequence. *The Journal of experimental medicine*. 205(3):725-35.

Powell, R. D., Huttenlocher, A. (2016). Neutrophils in the tumor microenvironment. *Trends in Immunology*. 37(1):41-52.

Pulaski, H. L., Spahlinger, G., Silva, I. A., McLean, K., Kueck, A. S., Reynolds, R. K., Coukos, G., Conejo-Garcia, J. R., Buckanovich, R. J. (2009). Identifying alemtuzumab as an anti-myeloid cell antiangiogenic therapy for the treatment of ovarian cancer. *Journal of Translational Medicine*. 7: 49.

Queen, M. M., Ryan, R.E., Holzer, R. G., Keller-Peck, C. R., Jorcyk, CH. L. (2005). Breast Cancer Cells Stimulate Neutrophils to Produce Oncostatin M: Potential Implications for Tumor Progression. *Cancer Researchearch*. 65:8896-8904.

Raccosta, L., Fontana, R., Maggioni, D., Lanterna, C., Villablanca, E. J., Paniccia, A., Musumeci, A., Chiricozzi, E., Trincavelli, M. L., Daniele, S., Martini, C., Gustafsson, J. A., Doglioni, C., Feo, S. G., Leiva, A., Ciampa, M. G., Mauri, L., Sensi, C., Prinetti, A., Eberini, I., Mora, J. R., Bordignon, C., Steffensen, K. R.,

Sonnino, S., Sozzani, S., Traversari, C., Russo, V. (2013). The oxysterol-CXCR2 axis plays a key role in the recruitment of tumor-promoting neutrophils. The *Journal of experimental medicine*. 210:1711-1728.

Raulet, D. H., Guerra, N. (2009). Oncogenic stress sensed by the immune system: role of natural killer cell receptors. *Nature Reviews Immunology*. 9(8):568-80.

Raval, R. R., Sharabi, A. B., Walker, A. J., Drake, C. G., Sharma, P. (2014). Tumor immunology and cancer immunotherapy: summary of the 2013 SITC primer. *Journal for Immunotherapy of Cancer*. 2(1):1-11.

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

Rezvani, K., Rouce, R., Liu, E., Shpall, E. (2017). Engineering Natural Killer Cells for Cancer Immunotherapy. *Molecular Therapy*. 25(8):1769-1781.

Rickles, F. R., Levine, M., Edwards, R. L. (1992). Hemostatic alterations in cancer patients. *Cancer and Metastasis Reviews*. 11:237-248.

Roder, J. C., Haliotis, T., Klein, M., Korec, S., Jett, J. R., Ortaldo, J., Heberman, R. B., Katz, P., Fauci, A. S. (1980). A new immunodeficiency disorder in humans involving NK cells. *Nature*. 284(5756):553-5.

Rotondo, R., Barisione, G., Mastracci, L., Grossi, F., Orengo, A. M., Costa, R., Truini, M., Fabbi, M., Ferrini, S., Barbieri, O. (2009). IL-8 induces exocytosis of arginase 1 by neutrophil polymorphonuclears in nonsmall cell lung cancer. International journal of cancer. *International Journal of Cancer*. 125:887-893.

Rouce, R. H., Shaim, H., Sekine, T., Weber, G., Ballard, B., Ku, S., Barese, C., Murali, V., Wu, M. F., Liu, H., Shpall, E. J., Bollard, C. M., Rabin, K. R., Rezvani, K. (2016). The TGF-beta/SMAD pathway is an important mechanism for NK cell immune evasion in childhood B-acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 30(4):800-11.

Rovere, P., Manfredi, A. A., Vallinoto, C., Zimmermann, V. S., Fascio, U., Balestrieri, G., Ricciardi-Castagnoli, P., Rugarli, C., Tincani, A., Sabbadini, M. G.

(1998). Dendritic cells preferentially internalize apoptotic cells opsonized by anti-β2-glycoprotein I antibodies. *Journal of Autoimmunity*. 11:403-411.

Ruffell, B. a kol. (2014). Macrophage IL-10 blocks CD8+ T cell-dependent responses to chemotherapy by suppressing IL-12 expression in intratumoral dendritic cells. *Cancer Cell*. 26(5):623-37.

Ruffell, B., Coussens, L. M. (2015). Macrophages and therapeutic resistance in cancer. *Cancer Cell*. 27(4):462-472.

Salih, H. R., Goehlsdorf, D., Steinle, A. (2006). Release of MICB molecules by tumor cells: mechanism and soluble MICB in sera of cancer patients. *Human Immunology*. 67(3):188-95.

Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C., Lanzavecchia, A. (1995). Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *The Journal of Experimental Medicine*. 182:389-400.

Sanford, D. E., Belt, B. A., Panni, R. Z., Mayer, A., Deshpande, A. D., Carpenter, D., Mitchem, J. B., Plambeck-Suess, S. M., Worley, L. A., Goetz, B. D., Wang-Gillam, A., Eberlein, T. J., Denardo, D. G., Goedegebuure, S. P., Linehan, D. C. (2013). Inflammatory monocyte mobilization decreases patient survival in pancreatic cancer: a role for targeting the CCL2/CCR2 axis. *Clinical Cancer Research*. 19(13):3404-15.

Sarhan, D., Cichocki, F., Zhang, B., Yingst, A., Spellman, S. R., Cooley, S., Verneris, M. R., Blazar, B. R., Miller, J. S. (2016). Adaptive NK Cells with Low TIGIT Expression Are Inherently Resistant to Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer Research*. 76(19):5696-5706.

Sarma, J. V., Ward, P. A., Lambris, J. D., Jaillon, S. (2011). The complement system: balance, tolerance, and diversity. *Cell and Tissue Research*. 343(1):227-235.

Sato, J., Takahashi, I., Umeda, T., Matsuzaka, M., Danjyo, K., Tsuya, R., Kida, K., Takami, H., Nakaji, S. (2011). Effect of alcohol drinking and cigarette smoking on

neutrophil functions in adults. *Luminescence: the journal of biological and chemical luminescence*. 26:557-64.

Sconocchia, G., Titus, J. A., Segal, D. M. (1997). Signaling pathways regulating CD44-dependent cytolysis in natural killer cells. *Blood*. 90:716-725.

Seaman, W. E., Sleisenger, M., Eriksson, E., Koo, G. C. (1987). Depletion of natural killer cells in mice by monoclonal antibody to NK-1.1. Reduction in host defense against malignancy without loss of cellular or humoral immunity. *The Journal of Immunology*. 138(12):4539-44.

Segura, E., Amigorena, S. (2013). Identification of human inflammatory dendritic cells. *Oncoimmunology*. 2(5):e23851.

Sell, S. (2004). Stem cell origin of cancer and differentiation therapy. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 51(1):1-28.

Sharma, P., Allison, P. J. (2015). Immune Checkpoint Targeting in Cancer Therapy: Towards Combination Strategies with Curative Potential. *Cell*. 161(2):205-214.

Shiroishi, M., Tsumoto, K., Amano, K., Shirakihara, Y., Colonna, M., Braud, V. M., Allan, D. S., Makadzange, A., Rowland-Jones, S., Willcox, B., Jones, E. Y., van der Merwe, P. A., Kumagai, I., Maenaka, K. (2003). Human inhibitory receptors Ig-like transcript 2 (ILT2) and ILT4 compete with CD8 for MHC class I binding and bind preferentially to HLA-G. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*. 100(15):8856-61.

Shortman, K., Naik, S. H. (2007). Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nature Reviews Immunology*. 7(1):19–30.

Schmidt, H., Bastholt, L., Geertsen, P., Christensen, I. J., Larsen, S., Gehl, J., von der Maase, H., Albelda, S. M. (2005). Elevated neutrophil and monocyte counts in peripheral blood are associated with poor survival in patients with metastatic melanoma: a prognostic model. *British Journal of Cancer*. 93:273-278.

Schmitz, M., Zhao, S., Deuse, Y., Schakel, K., Wehner, R., Wohner, H., Holig, K., Wienforth, F., Kiessling, A., Bornhauser, M., Temme, A., Rieger, M. A., Weigle, B., Bachmann, M., Rieber, E. P. (2005). Tumoricidal potential of native blood dendritic cells: direct tumor cell killing and activation of NK cell-mediated cytotoxicity. *The Journal of Immunology*. 174(7):4127-34.

Schroder, K., Hertzog, P. J., Ravasi, T., Hume, D. A. (2004). Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of Leukocyte Biology*. 75:163-89.

Schreiber, R. D., Old, L. J., Smyth, M. J. (2011). Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*. 331:1565-70.

Singel, L. K. a Segal, H. B. (2016). Neutrophils in the tumor microenvironment: trying to heal the wound that cannot heal. *Immunological Reviews*. 273(1):329-343.

Souto, J. C., Vila, L., Bru, A. (2011). Polymorphonuclear neutrophils and cancer: intense and sustained neutrophilia as a treatment against solid tumors. *Medicinal Research Reviews*. 31:311-63.

Spiegel, A., Brooks, M. W., Houshyar, S. a kol. (2016). Neutrophils suppress Intraluminal NK cell-mediated tumor cell clearance and enhance Extravasation of disseminated carcinoma cells. *Cancer Discovery*. 6:630-649.

Spiel, A. O. a kol. (2011). Increased platelet aggregation and *in vivo* platelet activation after granulocyte colony-stimulating factor administration. A randomised controlled trial. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 105:655-662.

Srinivasan, L., Harris, CH. M., Kilpatrick, E. L. (2017). Cytokines and Inflammatory Response in the Fetus and Neonate. *Frontiers in Immunology*. 2:1241-1254.

Stary, G., Bangert, C., Tauber, M., Strohal, R., Kopp, T., Stingl, G. (2007). Tumoricidal activity of TLR7/8-activated inflammatory dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine*. 204(6):1441-51.

Steer, H. J., Lake, R. A., Nowak, A. K., Robinson, B. W. (2010). Harnessing the immune response to treat cancer. *Oncogene*. 29:6301-13.

Stefater, J. A., III., Lewkowich, I., Rao, S., Mariggi, G., Carpenter, A. C., Burr, A. R., Fan, J., Ajima, R., Molkentin, J. D., Williams, B. O., Wills-Karp, M., Pollard, J. W., Yamaguchi, T., Ferrara, N., Gerhardt, H., Lang, R. A. (2013). Regulation of angiogenesis by a non-canonical Wnt—Flt1 pathway in myeloid cells. *Nature*. 474(7352):511-516.

Steinman, R. M., Turley, S., Mellman, I., Inaba, K. (2000). The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *The Journal of Experimental Medicine*. 191:411-416.

Steinman, R. M., Hawiger, D., Nussenzweig, M. C. (2003). Tolerogenic dendritic cells. *Annual Review of Immunology*. 21:685-711.

Sternberg-Simon, M., Brodin, P., Pickman, Y., Onfelt, B., Karre, K., Malmberg, K. J., Hoglund, P., Mehr, R. (2013). Natural killer cell inhibitory receptor expression in humans and mice: a closer look. *Frontiers in Immunology*. 4:65.

Stewart, B. W., Wild, Ch. P. (2014). *World cancer report: International Agency for Research on Cancer*. Lyon, France.

Sturey, R., Patnaik, A. (2017). Neutrophils and anti-cancer immunity: a paradigm shift in cancer immunotherapy. *Oncoscience*. 4(11-12):164-165.

Sudhakar, A. (2009). History of cancer, ancient and modern treatment methods. *Journal of Cancer Science & Therapy*. 1(2):1.

Sullivan, C. L., Berry, R., Sosnin, N., Widjaja, M. L. J., Deuss, A. F., Balaji, R. G., LaGruta, L. N., Mirams, M., Trapani, A. J., Rossjohn, J., Brooks, G. A., Andrews, M. D. (2016). Recognition of the Major Histocompatibility Complex (MHC) Class Ib Molecule H2-Q10 by the Natural Killer Cell Receptor Ly49C. *Journal of Biological Chemistry*. 291(36):18740-18752.

Sutterwala, F. S., Noel, G. J., Salgame, P., Mosser, D. M. (1998). Reversal of proinflammatory responses by ligating the macrophage Fcγ receptor type I. *The Journal of Experimental Medicine*. 188:217-222.

Swain, S. L., Bradley, L. M., Croft, M., Tonkonogy, S., Atkins, G., Weinberg, A. D. a kol. (1991). Helper T-Cell Subsets: Phenotype, Function and the Role of Lymphokines in Regulating their Development. *Immunological Reviews*. 123(1):115-144.

Šťastný, M., Falconi, M., Bassi, C., Sartori, N., Salvia, R., Caldiron, E. a kol. (2015). Escape Strategies of Tumors from Immune Surveillence. *Klinická Onkologie*. 28(4):28-37.

Takeda, K., Kaisho, T., Akira, S. (2003). Toll-like receptors. *Annual Review of Immunology*. 21:335-376.

Takeuchi, O., Akira, S. (2010). Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell*. 140(6):805-820.

Taylor, P. R., Martinez-Pomares, L., Stacey, M., Lin, H. H., Brown, G. D., Gordon, S. (2005). Macrophage receptors and immune recognition. *Annual Review of Immunology*. 23(1):901-44.

Tel, J., Smits, E. L., Anguille, S., Joshi, R. N., Figdor, C. G., de Vries, I. J. (2012). Human plasmacytoid dendritic cells are equipped with antigen-presenting and tumoricidal capacities. *Blood*. 120(19):3936-44.

Timonen, T., Ortaldo, J. R., Herberman, R. B. (1981). Characteristics of human large granular lymphocytes and relationship to natural killer and K cells. *Journal of experimental medicine*. 153(3):569-82.

Trombetta, E. S., Mellman, I. (2005). Cell biology of antigen processing *in vitro* and *in vivo*. *Annual Review of Immunology*. 23:975-1028.

Ueno, H., Klechevsky, E., Morita, R., Aspord, C., Cao, T., Matsui, T., Di Pucchio, T., Connolly, J., Fay, J. W., Pascual, V., Palucka, A. K., Banchereau, J. (2007). Dendritic cell subsets in health and disease. *Immunological Reviews*. 219:118-42.

Urban, C. F., Reichard, U., Brinkmann, V., Zychlinsky, A. (2006). Neutrophil extracellular traps capture and kill Candida albicans yeast and hyphal forms. *Cellular Microbiology*. 8:668-676.

Urruticoechea, A., Alemany, R., Balart, J., Villanueva, A., Vinals, F., Capella, G. a kol. (2010). Recent Advances in Cancer Therapy: An Overview. *Current Pharmaceutical Design*. 16(1):3-10.

Vachelli, E., Vitale, I., Eggermont, A. (2013). Trial watch: Dendritic cell-based interventions for cancer therapy. *Oncoimmunology*. 2:e25771.

van den Broek, M. E., Kägi, D., Ossendorp, F., Toes, R., Vamvakas, S., Lutz, W. K., Melief, C. J., Zinkernagel, R. M., Hengartner, H. (1996). Decreased tumor surveillance in perforin-deficient mice. *The Journal of Experimental Medicine*. 184(5):1781-90.

Vanharanta, S., Massagué, J. (2013). Origins of metastatic traits. *Cancer Cell*. 24(4):410–421.

Veglia, F., Gabrilovich, I. A. (2017). Dendritic cells in cancer: the role revisited. *Current Opinion in Immunology*. 45:43-51.

Verbeke, H., Struyf, S., Berghmans, N., Van Coillie, E., Opdenakker, G., Uyttenhove, C., Van Snick, J., Van Damme, J. (2011). Isotypic neutralizing antibodies against mouse GCP-2/CXCL6 inhibit melanoma growth and metastasis. *Cancer letters*. 302:54-62.

Vigneron, N., Ryan, E. P., Pawelec, G., Talib, W. H., Stagg, J., Elkord, E. a kol. (2015). Human Tumor Antigens and Cancer Immunotherapy: Mechanistic basis and therapeutic strategies. *Biomed Research International*. 2015(14):1-17.

Villalba, M., Rathore, M. G., Lopez-Royuela, N., Krzywinska, E., Garaude, J., Allende-Vega, N. (2013). From tumor cell metabolism to tumor immune escape. *The International Journal of Biochemistry & Cell biology*. 45(1):106-113.

Vinay, D. S., Ryan, E. P., Pawelec, G., Talib, W. H., Stagg, J., Elkord, E. a kol. (2015). Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. *Seminars in Cancer Biology*. 35(4):185-198.

Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T., Ugolini, S. (2008). Functions of natural killer cells. *Natural Immunology*. 9(5):503-10.

Vivier, E., Raulet, D. H., Moretta, A., Caligiuri, M. A., Zitvogel, L., Lanier, L. L., Yokoyama, W. M., Ugolini, S. (2011). Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science*. 331(6013):44-9.

Vorlíček, J., Abrahámová, J., Vorlíčková, H. a kol. (2016). Klinická Onkologie pro sestry. Praha: *Grada*.

Waldmannová, E., Caisová, V., Fáberová, J., Sváčková, P., Kovářová, M., Sváčková, D., Kumžáková, Z., Jačková, A., Vácová, N., Nedbalová, P., Horká, M., Kopecký, J., Ženka, J. (2016). The use of Zymosan A and bacteria anchored to tumor cells for effective cancer immunotherapy: B16-F10 murine melanoma model. *International Immunopharmacology*. 295-306.

Wallach, D., Fellous, M., Revel, M. (1982). Preferential effect of gamma interferon on the synthesis of HLA antigens and their mRNAs in human cells. *Nature*. 299(5886):833-6.

Wan, A. M., Ennis, P., Parham, P., Holmes, N. (1986). The primary structure of HLA-A32 suggests a region involved in formation of the Bw4/Bw6 epitopes. *Journal of Immunology*. 137(11):3671-4.

Wang, B., Niu, D., Lai, L., Ren, E. C. (2013). p53 increases MHC class I expression by upregulating the endoplasmic reticulum aminopeptidase ERAP1. *Nature Communications*. 4:2359.

Wislez, M., Rabbe, N., Marchal, J., Milleron, B., Crestani, B., Mayaud, C., Antoine, M., Soler, P., Cadranel, J. (2003). Hepatocyte growth factor production by neutrophils infiltrating bronchioloalveolar subtype pulmonary adenocarcinoma: role in tumor progression and death. *Cancer Researchearch*. 63:1405-1412.

Wong, S. L., Demers, M., Martinod, K., Gallant, M., Wang, Y., Goldfine, A. B., Kahn, C. R., Wagner, D. D. (2015). Diabetes primes neutrophils to undergo NETosis, which impairs wound healing. *Nature Medicine*. 21:815-819.

Woodfin, A., Voisin, M. B., Imhof, B. A., Dejana, E., Engelhardt, B., Nourshargh, S. (2009). Endothelial cell activation leads to neutrophil transmigration as supported by the sequential roles of ICAM-2, JAM-A, and PECAM-1. *Blood*. 113:6246-6257.

Xiang, D., Sharma, V. R., Freter, C. E., Yan, J. (2012). Anti-tumor monoclonal antibodies in conjunction with β-glucans:a novel anti- cancer immunotherapy. *Current Medicinal Chemistry*. 19:4298-305.

Yamagiwa, S., Gray, J. D., Hashimoto, S., Horwitz, D. A. (2001). A role for TGF-β in the generation and expansion of CD4+ CD25+ regulatory T cells from human peripheral blood. *The Journal of Immunology*. 166(12):7282-7289.

Yamaguchi, K., Chikumi, H., Shimizu, A., Takata, M., Kinoshita, N., Hashimoto, K., Nakamoto, M., Matsunaga, S., Kurai, J., Miyake, N., Matsumoto, S., Watanabe, M., Yamasaki, A., Igishi, T., Burioka, N., Shimizu, E. (2012). Diagnostic and prognostic impact of serum-soluble UL16-binding protein 2 in lung cancer patients. *Cancer Science*. 103(8):1405-13.

Yan, J., Kloecker, G., Fleming, Ch., Bousamra, M., Hansen, R., Hu, X., Ding, Ch., Cai, Y., Xiang, D., Donninger, H., Eaton, W. J., Clark, J. G. (2014). Human polymorphonuclear neutrophils specifically recognize and kill cancerous cells. *Oncoimmunology*. 3(7):e950163.

Yanagita, T., Murata, Y., Tanaka, D., Motegi, S., Arai, E., Daniwijaya W. E., Hazama, D., Washio, K., Saito, Y., Kotani, T., Ohnishi, H., Oldenborg, P-A.,

Garcia, V. N. (2017). Anti-SIRPα antibodies as a potential new tool for cancer immunotherapy. *JCI Insight*. 2(1):e89140.

Yoo, S. K., Starnes, T. W., Deng, Q., Huttenlocher, A. (2011). Lyn is a redox sensor that mediates leukocyte wound attraction *in vivo*. *Nature*. 480:109-112.

Yousefi, S., Mihalache, C., Kozlowski, E., Schmid, I., Simon, H. U. (2009). Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. *Cell Death & Differentiation*. 16:1438-1444.

Yuan, Y., Li, X., Zaidi, A. S., Arnatt, Ch. K., Yu, X., Guo, Ch., Wang, X-Y., Zhanga, Y. (2016). Small Molecule Inhibits Activity of Scavenger Receptor A: Lead Identification and Preliminary Studies. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 25(16):3179-3183.

Zhang, J. M., An, J. (2007). Cytokines, Inflammation, and Pain: the origin, evolution, and impact of doi moi. *International Anesthesiology Clinics*. 45(2):27-37.

Zhou, S. L., Dai, Z., Zhou, Z. J., Wang, X. Y., Yang, G. H., Wang, Z., Huang, X. W., Fan, J., Zhou, J. (2012). Overexpression of CXCL5 mediates neutrophil infiltration and indicates poor prognosis for hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 56:2242-2254.

Zhou, S. L., Zhou, Z. J., Hu, Z. Q., Li, X., Huang, X. W., Wang, Z., Fan, J., Dai, Z., Zhou, J. (2015). CXCR2/CXCL5 axis contributes to epithelial-mesenchymal transition of HCC cells through activating PI3K/Akt/GSK-3beta/Snail signaling. *Cancer letters*. 358:124-135.

Zitvogel, L., Tesniere, A., Kroemer, G. (2006). Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nature Reviews Immunology*. 6(10):715-27.