

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA ZOOLOGIE



T-lymfocyty a nádorová imunita

bakalářská práce

Zuzana Vernerová

Biologie a ekologie (B1501)
prezenční studium

vedoucí práce: RNDr. Ivana Fellnerová, Ph.D.

leden 2016

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a použila jen uvedených pramenů a literatury.

V Olomouci dne

.....

Abstrakt

T-lymfocyty jsou vysoce specializované buňky imunitního systému, jejichž úkolem je rozpoznání intracelulárního antigenu a zahájení odpovídající reakce proti exogenním patogenům či vlastním poškozeným buňkám. Díky těmto funkcím T-lymfocytů se zkoumají jejich reakce i na antigeny nádorových buněk a jejich potencionální využití v protinádorové léčbě. Výzkum vztahu T-lymfocytů a nádorových buněk je zaměřen na různé fáze imunitní reakce: vzájemnou interakci T lymfocytů a APC, regulaci aktivity jejich receptorových a koreceptorových molekul i faktory stimulace, či inhibice cílené specifické imunitní odpovědi proti nádorovým antigenům. Dnešní poznatky ukazují, že využití T-lymfocytů pro léčbu onkologických pacientů je vhodnou doplňkovou metodou, která zahrnuje několik různých forem. K léčbě lze využít transplantaci krve s čerstvými T-lymfocyty, geneticky modifikované T-lymfocyty s chimérickými antigenními receptory (CAR), nebo látky, které podporují činnost T-lymfocytů. Práce shrnuje nejen nové poznatky o léčbě pomocí T-lymfocytů, ale také o dalším výzkumu a možnostech biologické cílené léčby zaměřené na dendritické buňky (DC) nebo signalizační molekuly a růstové faktory uplatňující se při rozvoji nádoru.

Klíčová slova: T-lymfocyty, nádorová imunita, dendritické buňky, cílená imunoterapie, biologická léčba

Abstract

T-cells are highly specialized cell of the immune system. Their task is to recognize intracellular antigen and initiate the appropriate reaction against exogenous pathogens or our own damaged cells. Because of this, T-cells are the object of the research – their reaction on antigens of the cancer cells and the potential usage of this in the anticancer therapy. The research of the relationship between T-cells and cancer cells is focused on different phasis of the immune reaction: interaction of T cells and APC, regulation of the receptor and coreceptor molecules activity and the stimulatory or inhibitory factors of the targeted immune response against antigens of the cancer cells. Currently, the reasearch is exploring mostly the interaction of T-cells and antigen presenting cells (APC), the influence of T-cells and substances they produce to influence other cells of the immune system. The intervention against one tumor cell is a complex reaction of the whole immune system. Current findings show, that using T-cells for oncological therapy is a suitable supplementary method consisting of many different forms – blood transplantation with fresh T-cells, genetically modified T-cells with chimeric antigen receptor (CAR), or substances that supports the activity of T-cells. The paper summarize not only the latest findings about treatments using T-cell, but also other researches and possibilities of biological treatment focused on dendritic cells (DC) or signaling molecules and growth factors important for the tumor development.

Key words: T cells, tumour immunity, dendritic cells, targeted immunotherapy, biological treatment

Děkuji RNDr. Ivaně Fellnerové, Ph.D. za odborné vedení bakalářské práce, poskytování rad a cenných připomínek.

V Olomouci dne

.....

Obsah:

1. Úvod	7
2. Cíle práce	8
3. Obecný imunologický úvod	9
3.1 T-lymfocyty a jejich populace	13
4. Biologie nádoru	18
4.1 Interakce nádoru a imunitního systému	21
5. Léčba nádorových onemocnění využívající imunitní reakce	26
5.1 Posílení imunitních reakcí nespecificky	28
5.2 Monoklonální protilátky	30
5.3 Protinádorové vakcíny	33
5.3.1 Vakcíny na bázi DC	34
5.3.2 Geneticky modifikované T-lymfocyty	36
5.3.3 Adoptivní buněčná terapie	38
5.3.4 Doplnkové terapie	39
6. Závěr	40
7. Použité zkratky	41
8. Použitá literatura	44

1. Úvod

Vznik nádorů je zapříčiněn kumulací genetických chyb v DNA, které výrazně ovlivňují replikaci buňky a její následné dělení. Tato skutečnost se může projevit v organismu jako nekontrolovatelné množení buněk, jehož výsledkem je nádorové onemocnění. Nedílnou součástí onkologického výzkumu je nejen sledování vnějších projevů pozorovatelných na tkáních a orgánech, ale také hledání příčin vzniku. Ty mohou být vnější i vnitřní. Nejčastější vnější příčinou vzniku rakovinového bujení je radiace a kontakt člověka se škodlivými látkami ve zhoršujícím se životním prostředí. U vnitřních příčin hraje velkou roli životní styl, stres, výživa, dědičné dispozice, popř. další neznámé faktory.

Zdravý lidský organismus má však vlastní obranné prostředky, které umožňují včas rozpoznat a eliminovat potencionální nádorové buňky. Klíčovou roli zde hraje imunitní systém, jehož úkolem je chránit organismus nejen před vnějšími patogeny, ale také rozpoznat a likvidovat vlastní poškozené buňky, jenž by mohly ohrozit jejich nositele. K tomuto účelu využívá imunitní systém velice propracovaný koloběh komplexních reakcí a odpovědí, jenž následně vyhodnotí. Důležitou součástí tohoto procesu jsou specifické buňky lymfocytární linie rozdělující se do několika tříd (T-lymfocyty, B-lymfocyty a NK buňky). Kromě těchto tří základních skupin existuje celá řada podskupin a přechodných populací. Průběžně jsou objevovány nové a nové populace T-lymfocytů, často právě v souvislosti s onkologickým a autoimunitním výzkumem. To je také hlavní důvod, proč jsou studie věnované léčbě nádorů orientovány na T-lymfocyty a jejich podskupiny. Pochopení jejich role a mechanismu funkce v imunitním systému je stěžejní podmínkou pro další výzkumy v oblasti onkologické léčby.

2. Cíle práce

Cílem práce je představit vztah imunitního systému ke vzniku a rozvoji nádoru a možnosti využití biologické léčby v protinádorové terapii.

Stěžejní úkoly bakalářské práce jsou:

1. Zpracování základních poznatků o složkách a funkcích imunitního systému se zaměřením na T-lymfocyty.
2. Představení základních informací o nádoru a jeho interakci s imunitním systémem.
3. Zmapování nejnovějších poznatků v oblasti výzkumu nádorových onemocnění a přehled moderních metod jejich biologické léčby.

3. Obecný imunologický úvod

Imunitní systém (IS) je komplexní soustava orgánů, tkání, buněk a signálních molekul, které spolu interagují ve složitých, vzájemně provázaných reakcích. Původní teorie, že IS chrání tělo před látkami cizími, zatímco vlastní složky toleruje, byla nahrazena teorií „škodlivé vs. neškodné“, bez ohledu na původ. Toto rozdělení poprvé definovala P. C. E. Matzinger, která jej použila v kontextu buněk i látek (Matzinger 1994). Dle ní IS rozeznává buňky bez ohledu na to, zda jsou vlastní či cizí. V dnešní době je však jeho funkce velmi ohrožena a každý den vystavována náročným situacím. Citlivě reaguje na různé škodlivé vlivy z našeho životního prostředí (např. podvýživa, škodlivé chemikálie, dlouhodobý stres).

Imunitní systém v těle zastupuje široké spektrum buněk a molekul, jejichž prostřednictvím plní svoji nenahraditelnou funkci. Tyto buňky spolu komunikují přímým kontaktem či prostřednictvím produkce látek. Všechny částice rozpoznává IS pomocí specifických i nespecifických receptorů. Základní funkcí imunitního systému je obranyschopnost před infekcí a bezpečná eliminace poškozených či přestárlých buněk a molekul. Imunitní systém pracuje v rámci specifických a nespecifických imunitních reakcí. Rozlišujeme tedy dva typy imunity, tzv. specifickou a nespecifickou. Oba typy jsou formou odpovědi na antigen, což je látka, které je schopna iniciovat imunitní reakci. Mohou mít bílkovinnou či lipidovou povahu a dělíme je na vnitřní (endo) a vnější (exo) antigeny.

Vrozená schopnost organismu zareagovat na cizorodé materiály a mikroorganismy je nazývána **nespecifickou imunitou**. Tu charakterizují procesy a mechanismy, které nejsou závislé na předchozím setkání s patogenem. Jedná se o kombinaci místní i celkové obranné reakce, která je aktivována během prvních hodin po zachycení infekce. Představiteli této imunity jsou specializované buňky schopné fagocytózy. Mezi tyto profesionální fagocyty řadíme dendritické buňky, makrofágy a polymorfonukleární leukocyty. Zmíněné buňky jsou schopny procesu fagocytózy, která zahrnuje doputování, rozpoznání, pohlcení a usmrcení škodliviny a dále také sekreci látek ovlivňující další buňky a tkáň. Součástí nespecifické imunity je také kůže

a sliznice, které jsou účinnou bariérou před cizorodými látkami a vlivy z vnějšího prostředí.

Specifická imunita je získávána v průběhu života a rozvíjí se nejvíce v dětství a dospělosti v závislosti na tom, s jakými patogeny se imunitní systém setkává. V případě napadení svoji činnost zahajuje později než imunita nespecifická, ale již účinkuje cíleně proti patogenu, kterým může být např. vir, bakterie, cizorodá i vlastní tkáň. Při reakci dochází k vytvoření imunologické paměti, která zajistí rychlejší a efektivnější imunologickou odpověď při opakovaném setkání se stejným podnětem. Výkonnými buňkami specifické imunity, kterou lze rozdělit na látkovou a buněčnou, jsou lymfocyty.

Lymfocyty představující buněčnou složku specifické imunity dělíme na B a T-lymfocyty. **B-lymfocyty** zastupují látkovou složku, jež pracuje na principu vytváření protilátek. Tento typ bílých krvinek vzniká v kostní dřeni, odkud jsou vyplavovány do periferie. Antigen rozpoznávají přímo pomocí specifického receptoru (BCR). Posledním efektorovým stádiem B-lymfocytů jsou plazmatické buňky, jejichž úkolem je produkce protilátek, tzv. imunoglobulinů (Ig).

T-lymfocyty jsou velmi významné v obraně proti virům, plísním i nádorovým buňkám a zodpovídají i za odmítnutí transplantovaných tkání. Jejich hlavním úkolem je regulovat činnost dalších imunocytů prostřednictvím cytokinů. Pomocí těchto látek aktivují B-lymfocyty, makrofágy a zprostředkovávají cytotoxicitu (Trojan a kol. 1996). Rozeznávají intracelulární antigeny pouze v komplexu s MHC proteiny, které vytvoří antigen prezentující buňky. Vývoj T-lymfocytů probíhá především v kostní dřeni a dokončuje se v brzlíku. Konečná diferenciací probíhá i na periférii, což je případ některých T_H -lymfocytů. V rámci T-lymfocytů rozeznáváme různé od sebe se lišící skupiny a subpopulace. Tato odlišnost není morfologická, ale je založena na funkčních rozdílech daných přítomností či absencí různých receptorů, koreceptorů, koinhibitorů nebo kostimulačních molekul. Příkladem inhibiční molekuly může být protein PD-1, který je důležitý při tlumení funkcí T-lymfocytů a iniciaci buněčné smrti. K určení druhu T-lymfocytu využíváme imunochemické metody. Na T-lymfocytech nalezneme např. i molekuly CD28, CD52 a CTLA-4.

NK buňky (přírození zabíječi) jsou dalšími důležitými lymfocytárními buňkami a vývojově se podobají T-lymfocytům. Typickým znakem je přítomnost receptoru pro molekuly MHC. Morfologicky je řadíme k velkým granulárním lymfocytům. Jejich základní funkcí je vyhledání a zničení buněk s abnormálním nedostatkem MHC glykoproteinu na povrchu membrány, což může poukazovat na buňku napadenou virem či potencionální nádorovou buňku (Hořejší, Bartůňková 2005). Speciální populací jsou NK-T-buňky, jejichž důležitou schopností je rozpoznání antigenu bez pomoci MHC molekul. Jsou to hybridy mezi cytotoxickými T-lymfocyty a klasickými NK buňkami.

Dendritické buňky (DC) jsou dalším významným typem imunocytů. Považujeme je za spojnicí mezi specifickou a nespecifickou imunitou. Význam DC spočívá ve schopnosti fagocytovat a následně prezentovat antigen. Řadíme je mezi skupinu buněk souhrnně nazývanou jako antigen prezentující buňky (APC). Tato skupina zahrnuje všechny jaderné buňky. Profesionálními APC jsou však jen DC, makrofágy a aktivované B-lymfocyty. DC běžně pohlcují odumřelé buňky i patogeny a v průběhu cesty mezi tkání a lymfatickými orgány vystavují fragmenty těchto buněk v komplexu s MHC proteiny na svém povrchu. V těle se vyskytují v nezralé podobě na sliznicích a v periferních tkáních. Při setkání s abnormálními buňkami a patogeny, které představují pro organismus nebezpečí, rychle dozrají a stávají se specializovanými APC. Zvýší expresi MHC proteinů a tedy i předkládají více antigenu ke kontrole a produkují látky stimulující efektorové T-lymfocyty k zahájení imunitní reakce. I dendritické buňky mají své subpopulace. Jedná se především o plasmacytoidní dendritické buňky (PDC), jejichž hlavním úkolem je rozpoznání a obrana proti infekcím virového typu. Další skupinou jsou myeloidní dendritické buňky (MDSC), jejichž subpopulaci, tzv. intersticiální dendritické buňky, nalezneme ve všech tkáních a velmi se podobají DC připraveným z monocytů *in vitro*. Folikulární dendritické buňky (FDC) nepocházejí z hematopoetických kmenových buněk a jsou podstatné při stimulaci B-lymfocytů. Každá subpopulace má jiný mechanismus rozpoznání patogenu a je tedy výrazně specializována na boj s různými infekcemi.

Během života se imunitní systém neustále vyvíjí, přijímá nové podněty a reaguje na ně. S příchodem stáří imunitní systém slábne a jeho odpovědi nejsou tak pohotové

a silné. Buněčnou odpověď imunitního systému obstarávají různé specializované buňky, které souhrnně nazýváme imunocyty. Jejich krátký přehled nabízí tabulka 1.

Tabulka 1. Stručný přehled buněk imunitního systému (Hořejší, Bartůňková 2005). Všechny jaderné buňky z tabulky mají schopnost prezentace antigenu. Především jsou to makrofágy a dendritické buňky.

Imunocyty	Funkce	Typ imunity
Makrofágy	fagocytóza	nespecifická
B-lymfocyty	detekce extracelulárního antigenu, produkce protilátek	specifická
T-lymfocyty	detekce intracelulárního antigenu přes MHC, produkce cytokinů	specifická
DC	profesionální prezentace Ag	nespecifická
NK-buňky	cytotoxicita	specifická
NK-T-buňky	rozpoznání molekul bez MHC	specifická

Jednotlivé buněčné složky imunity mezi sebou komunikují kontaktně nebo pomocí produkce rozpustných látek, které nazýváme **cytokiny**. Tyto glykoproteiny uvolňují buňky imunitního systému ve velmi nízkých koncentracích. Cytokiny jsou velmi heterogenní skupinou látek, která zásadně ovlivňuje rozsah, směr a délku imunitní reakce. Do skupiny cytokinů řadíme chemokiny, interleukiny (IL), interferony (INF), transformující růstové faktory (TGF), faktory stimulující kolonie hematopoetických buněk (CSF), faktor nekrotizující nádory (TNF) a další. Působí kaskádovitě a ke správné funkci buněk je zapotřebí kombinace různých cytokinů. Rozdělují se do skupin dle funkcí (Bartůňková a kol. 2011):

- Prozánětlivé – IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IL-18, INF α a γ , TNF
- Protizánětlivé – IL-4, IL-10, TGF- β
- Protivirové – INF α , β , ω

- Podpora krvetvorných buněk – IL-2, IL-3, IL-7, GM-CSF (faktor stimulující granulocytové a monocyto-makrofágové kolonie)
- Protilátková imunita – IL-4, IL-5, IL-6, IL-10
- Buněčná imunita – IL-2, IL-12, INF- γ

Pro přijetí jakékoliv informace zprostředkované kontaktem či látkově potřebuje každá buňka specifickou bílkovinnou strukturu, kterou nazýváme receptor. Buňka tedy nese receptory např. pro cytokiny, Fc-receptory pro imunoglobuliny, ale i receptory pro další druhy molekul. Kromě receptorů má na svém povrchu ukotveny další membránové molekuly. V případě imunitních reakcí jsou významné molekuly MHC, adhezní molekuly, kostimulační molekuly a koinhibiční molekuly.

Nedílnou součástí specifických imunitních reakcí zprostředkovaných T-lymfocyty jsou **MHC molekuly** (hlavní histokompatibilní komplex). Rozlišujeme typ MHC-I, který je přítomný na všech jaderných buňkách organismu a typ MHC-II, jenž se vyskytuje jen na profesionálních antigen prezentujících buňkách. Důležitost funkce MHC spočívá ve vazbě peptidových fragmentů a jejich vystavení na buněčném povrchu pro detekci T-lymfocyty. Molekuly MHC-I předkládají endogenní, kdežto MHC-II prezentují exogenní peptidové fragmenty. Lidské MHC molekuly značíme HLA (Bartůňková, Hořejší 2005).

3.1 T-lymfocyty a jejich populace

Důležitými buňkami specifické imunity zajišťující, mimo jiné, obranu i proti nádorovým antigenům jsou T-lymfocyty. Rozpoznávají antigeny pomocí specifického receptoru (TCR). Podílejí se také na regulaci vývoje B-lymfocytů v plazmatické buňky, které produkují protilátky na T-lymfocytech závislé. Rozlišujeme různé subpopulace T-lymfocytů a i v nich nalézáme variabilitu. Následující tabulka 2 ukazuje různorodost T-lymfocytů.

Tabulka 2. Populace T-lymfocytů a jejich vlastností (Bartůňková a kol. 2011), horní index + a - značí přítomnost nebo absenci dané molekuly.

Populace	Skupina	Identifikační membránové molekuly	Vlastnosti a produkty	Typ receptoru
T_h-lymfocyty	T _h 1	CD4 ⁺	aktivace makrofágů, INF- γ	$\alpha \beta$
	T _h 2	CD4 ⁺	stimulace B-lymfocytů, IL-4	$\alpha \beta$
	T _h 17	CD4 ⁺	antibakteriální procesy, IL-17	$\alpha \beta$
Tc-lymfocyty		CD8 ⁺	cytotoxická likvidace buněk, perforiny	$\alpha \beta$
Treg-lymfocyty	nTreg	CD4 ⁺ , CD25 ⁺	tlumí imunopatologické reakce	$\alpha \beta$
	iTreg	CD4 ⁺ , CD25 ⁻	tlumivé, periferní tolerance	$\alpha \beta$
$\gamma\delta$-T-lymfocyty		CD4 ⁻ , CD8 ⁻	nepotřebují komplex MHC periferní detekce antigenu, TNF- α	$\gamma \delta$

Jednu ze základních skupin tvoří cytotoxické T-lymfocyty (Tc), jejichž úkolem je usmrcování a likvidace buněk. Charakterizuje je přítomnost koreceptorové molekuly CD8 a produkce INF- γ a TNF- α . Detekují antigen, který buňka vytvoří intracelulárně a přesune jej na svůj povrch pro kontrolu imunitním systémem v komplexu s MHC-I. Často se jedná o zásah proti buňkám napadených virem, patogenem či poškozených stresem. Primární odpověď zahájí v sekundárních lymfatických orgánech. Mohou mít i formu paměťových buněk, které jsou nezbytné při opakovaném setkání s virovým podnětem.

Příkladem mohou být i T_h-lymfocyty, pro které je typický výskyt koreceptoru CD4. Ty interagují s antigeny, jež jsou fagocytovány a prezentovány v komplexu

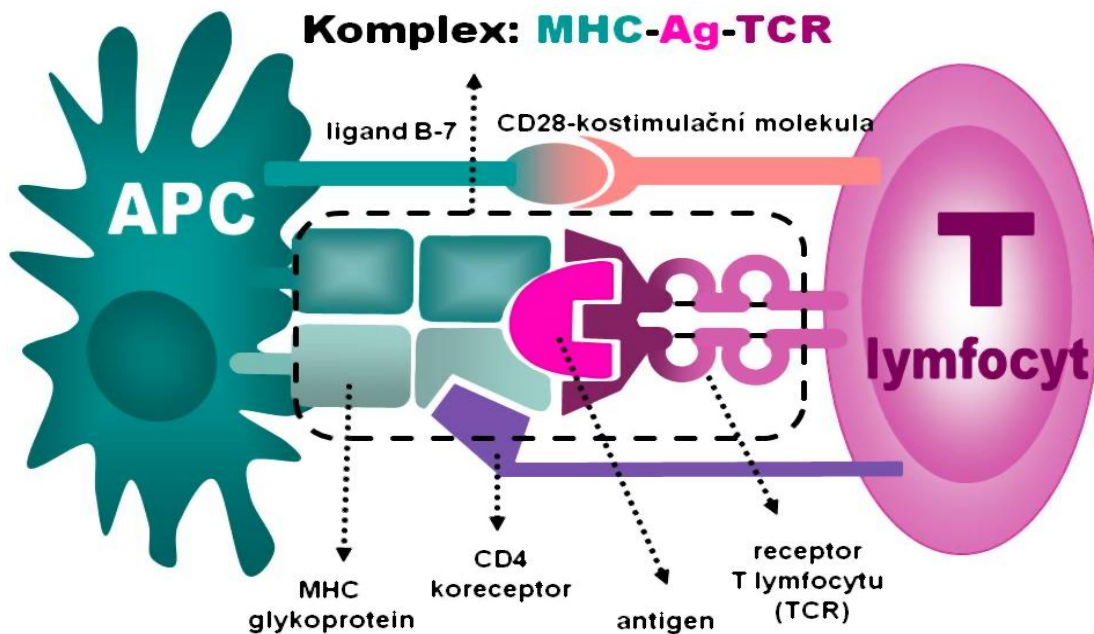
s molekulou MHC-II. Nejvíce prostudovány jsou subpopulace T_{h1} a T_{h2} . Buňky skupiny T_{h1} regulují imunitní reakci především proti bakteriálním patogenům uvnitř buňky. Produkují cytokiny TNF- β (lymfotoxin) a také IL-2 (interleukin) a INF- γ (interferon), které aktivují makrofágy, jenž zajistí likvidaci napadených buněk. T_{h2} jsou zaměřeny na obranu proti extracelulárním mikroorganismům. Jejich produkty jsou látky stimulující B-lymfocyty k tvorbě protilátek, především pak IL-4, IL-5 a IL-6. Produkty T_{h1} a T_{h2} buněk se vzájemně ovlivňují. INF- γ produkovaný skupinou T_{h1} tlumí aktivaci a proliferaci T_{h2} . Naopak T_{h2} díky tvorbě IL-4 inhibují diferenciaci a aktivaci T_{h1} (Krejsek, Kopecký 2004). Udržování správného poměru T_{h1} a T_{h2} je základním imunoregulačním mechanismem (Ferenčík a kol. 2005). Skupina lymfocytů T_{h17} pomáhá u zánětlivých procesů proti bakteriím a také se podílí na autoimunitních onemocněních. Vzájemný poměr T_{h1} , T_{h2} , T_{h17} je velice důležitý (Duan a kol. 2014).

Subpopulace T-lymfocytů, označovaných jako Treg, nebo také jako supresorové T-buňky, má tlumivý účinek na efektorové T-lymfocyty. Tyto buňky modulují imunitní systém a udržují toleranci k vlastním antigenům. Zároveň také snižují proliferaci ostatních T-buněk. Jejich potlačení zvyšuje riziko autoimunitních onemocnění, avšak posílení jejich funkce snižuje schopnost organismu zasáhnout proti patogenům či nádorovým buňkám. V rámci Treg rozlišujeme dílčí skupiny, tzv. přirozené regulační T-lymfocyty (nTreg) a indukované T-lymfocyty (iTreg). Přirozené regulační T-lymfocyty charakterizuje přítomnost membránové molekuly CD25, koreptoru CD24 a transkripčního faktoru Fox3. Indukované T-lymfocyty vznikají i působí na periférii. Postrádají molekulu CD25 i transkripční faktor Fox3.

Minoritní, ale přesto důležitou skupinou T-lymfocytů, je subpopulace gama-delta, charakteristická složením receptoru z polypeptidických řetězců γ a δ . Nenajdeme u nich koreceptorové molekuly CD4 ani CD8, proto nepotřebují k rozpoznání antigenu interakci s MHC. Tyto buňky se objevují pouze v periferní krvi ve 2-5% z celkového počtu lymfocytů, ale jsou hojně přítomny na sliznicích a v kůži jako prvotní systémová obrana organismu. Gama-delta T-buňky jsou součástí imunitní odpovědi díky schopnosti zahájit přímou cytolýzu buněk, se kterými interagují. Zvýšenou produkci γ δ -T buněk detekujeme u autoimunitních onemocnění, imunodeficienci, infekci a nádorových onemocnění (Krejsek, Kopecký 2004). Tato subpopulace je

tvořena převážně v brzlíku, pouze malá část je produkována střevním epitelem během prvních týdnů života (Marquez-Medina a kol. 2012).

Klíčovým mechanismem imunitní reakce založené na T-lymfocytech je interakce antigen specifického receptoru T-lymfocytu (TCR) a antigen prezentující buňky (APC) s MHC komplexem. Receptor na T-lymfocytech značíme TCR a tvoří jej vždy dvě podjednotky $\alpha\beta$, případně $\gamma\delta$. Jeho aktivaci vzniká první signál. Koreceptory vázané s molekulou MHC označujeme CD4 a CD8. Dále je také potřebná kostimulační molekula CD28, která se musí navázat na ligand u APC a zprostředkuje tak druhý signál. Nutná je prezentace antigenu na molekule MHC, napojení koreceptoru CD4 a zároveň navázání B-7 na kostimulační molekulu CD28. Celou reakci názorně zobrazuje obrázek 1.



Obrázek 1. Interakce APC a T-lymfocytu. Reakce probíhá následujícím způsobem: APC vystaví na svém povrchu antigen navázaný na MHC protein. Ten je rozpoznán T-lymfocytem pomocí TCR. Současně dojde k navázání koreceptoru CD4/8. Dalším důležitým krokem je vytvoření vazby mezi kostimulační molekulou CD28 a ligandem B-7 (signální molekula) pro úplné dokončení stimulace a zahájení příslušné imunitní odpovědi, kterou může být proliferace T-lymfocytu a aktivace efektorových T-lymfocytů k tvorbě cytokinů a tvorba protilátek (Vrána a kol. 2011).

Pro pochopení a následnou možnost regulace vztahu IS a nádorových buněk je nezbytné znát nejen interakci TCR s komplexem MHC-Ag, ale také funkci dalších kostimulačních a koinhibičních molekul. Přehled nejvýznamnějších z nich je uveden v tabulce č. 3

Tabulka 3. Přehled důležitých molekul regulujících imunitní reakce.

Molekula	Význam
PD-1	protein programované buněčné smrti
CTLA-4	tlumí aktivitu T-lymfocytů
CD28	druhý posel v interakci TCR s MHC-Ag
CD52	výskyt pouze na zralých T-lymfocytech

4. Biologie nádoru

Vývoj organismu je řízen informacemi uloženými v DNA. Úsek vlákna DNA nesoucí konkrétní informaci nazýváme gen. Gen obsahuje informaci důležitou pro vznik proteinů, které se podílejí na řízení a stavbě organismu. Poškozením genu může dojít k transformaci buňky v buňku nádorovou. Jsou známy skupiny genů, jejichž poškození hraje klíčovou roli při rozvoji nádoru. Těmito skupinami genů jsou protoonkogeny, tumor supresorové geny (antionkogeny) a geny regulující apoptózu. Tyto skupiny regulují přirozené procesy vzniku a zániku buněk v organismu. Úkolem protoonkogenů je regulace buněčného dělení. Tumor supresorové geny zastávají opačnou funkci. Jejich produkty negativně ovlivňují buněčné dělení a zastavují nádorovou transformaci. Geny regulující apoptózu tvoří proteiny, které umožní buňce samozničení. Důležitou roli při vzniku nádoru hrají i reparační geny. Produkty těchto genů opravují chyby v DNA, které mohou být vyvolány nejen samotnou replikací DNA, ale i vnějším prostředím. Aktivací či inaktivací klíčových genů v nevhodnou dobu, nebo chybou v informaci, kterou kódují, může dojít ke změně buňky v nádorovou (Petruželka a kol. 2003).

Jako buněčný cyklus je označováno časové období mezi dvěma děleními buňky. Pro rozdělení buňky je třeba, aby prošla jednotlivými fázemi tohoto cyklu a úspěšně absolvovala několik kritických bodů. Nejvíce času stráví buňka v interfázi, kde se připravuje na dělení v rámci G_1 , S a G_2 fáze. Samotné dělení již tak dlouhé není a je nazýváno M-fází. Ve fázi G_1 dochází ke zmnožení proteinů a RNA, dále se také vytváří zásoba nukleotidů a enzymů potřebných pro replikaci. V S-fázi dojde k replikaci DNA a v G_2 fázi buňka zdvojnásobí počet organel a vytvoří mitotické vřetenko. V rámci buněčného cyklu existují dva kontrolní body, ve kterých může být dělení zastaveno. V rámci těchto bodů je kontrolována velikost buňky, dokončení replikace DNA nebo správné rozdělení jádra. Regulaci buněčného cyklu zajišťují cyklin-depentní kinázy (Cdk) a cykliny. Pokud není vše v pořádku, buňka nemůže projít kontrolním bodem a musí setrvat ve fázi G_0 do té doby, než bude splňovat podmínky pro rozdělení. Nedostatečný vývoj nebo poškození při dělení mohou být tak velká, že buňka zahájí programovanou buněčnou smrt, tzv. apoptózu. K tomu dochází po kontrole vnějšího

i vnitřního prostředí v G₁ kontrolním bodě. Rozhodujícím kritériem k zahájení buněčné smrti je hladina hormonů, iontů a množství sacharidů.

Buňky s defekty a poškozenými kontrolními body se mohou začít nekontrolovatelně množit a následně vytvářet nádory. Příčinou vzniku nádorového onemocnění jsou často mutace genů regulujících buněčný cyklus, popř. apoptózu. Jedná se o drobné chyby při replikaci DNA. Jedním z takových kontrolních genů je gen kódující protein p53. Ten kontroluje nově syntetizovanou DNA a při nalezení chyby aktivuje reparační mechanismy nebo podpoří zahájení programované buněčné smrti. Gen kódující protein p53 se řadí mezi nádorové supresorové geny. Mutace tohoto genu a následně nesprávná funkce proteinu p53 je odhalena ve více než polovině zhoubných lidských nádorů (Petruželka a kol. 2003). Rozvoj nádorového onemocnění nezahájí jediná mutace, vždy jich je potřeba více. V případě solidních (pevných) nádorů je zapotřebí šesti až osmi mutací. Pokud se jedná o rozvoj hematologických nádorů, jde o nejméně dvě kritické mutace (Klener jr. a Klener 2013). Mutace mohou vznikat nezávisle, jejich příčinou však mohou být jak vnější, tak vnitřní vlivy. K těmto faktorům řadíme chemikálie, viry i ionizující záření. Pravděpodobnost vzniku nádorového onemocnění se s rostoucím věkem zvyšuje, jelikož kontrolní mechanismy v buněčném cyklu stárnou a nemusí již spolehlivě fungovat. Proces vývoje nádoru nazýváme karcinogeneze. K tomuto procesu řadíme nejen vývoj samotných nádorových buněk, ale také buněk potřebných pro zajištění růstu nádoru. Samotná nádorová tkáň musí být vyživována a propojena se zbytkem organismu. Důležitým faktorem je vývoj cévního zásobení nádorových buněk, na kterém se podílí i vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF).

Nádorové bujení lze odhalit na základě nádorových markerů. Jsou to laboratorně prokazatelné známky v tkáních, buňkách či biologických tekutinách, které mohou poukazovat na metastázy, přítomnost či riziko vzniku nádorového onemocnění. Těmito ukazateli mohou být antigeny, hormony, enzymy i změny v buněčné signalizaci a tvorbě proteinů (Masopust 2004).

V nádorových buňkách probíhají všechny fyziologické procesy jako v buňkách ostatních, a proto i ony jsou kontrolovány a imunitní systém je může rozpoznat. Nádorové buňky vytváří proteiny a pomocí MHC molekul je vystavují na svém povrchu

pro kontrolu T-lymfocytům, jež mají schopnost abnormální buňky rozpoznat a usmrtit. V mnoha případech jsou však rozdíly mezi normální a nádorovou buňkou tak malé, že je imunitní systém nerozezná, případně jsou nádorové buňky skryty detekci díky obranným mechanismům, které se u nich vyvinuly.

Abnormální buňky syntetizují antigeny. Rozlišujeme dvě skupiny těchto antigenů, a to nádorově specifické antigeny (TSA) a antigeny sdružené s nádory (TAA). První skupina (TSA) se vyznačuje tím, že je pouze na povrchu nádorových buněk a nejčastější příčinou vzniku je nestandardní degradace buněčných proteinů (Hořejší, Bartůňková 2005). Dalším příkladem mohou být abnormální formy glykoproteinů, které má nádorová buňka umístěné na své membráně.

Druhou skupinou jsou TAA, jež můžeme najít i na normálních buňkách, ale pouze v menším počtu a v jiné fázi ontogenetického vývoje. Do skupiny TAA řadíme antigeny onkofetální, které jsou přítomny u normálních buněk pouze v embryonálním vývoji (Ferenčík a kol. 2005). Pokud je tedy nalezneme v období postnatálním, dostáváme informaci o abnormálním chování buněk, a tedy i ukazatele možného nádorového bujení. Příkladem může být antigen CEA, který je vytvářen buňkami karcinomu tlustého střeva. Dále také melanomové antigeny a také antigeny produkované nádory prostaty a mléčných žláz (Hořejší, Bartůňková 2005). Dalším onkofetálním antigenem je α_1 -fetoprotein jehož zvýšená koncentrace poukazuje na nádorové onemocnění jater (Masopust 2004).

K nádorovým antigenům mohou patřit i virové proteiny, protože nádorové bujení může být indukováno virem. Přímalá souvislost s možností vzniku nádorového bujení je prokázána např. u viru Epstein-Barrové, hepatitidy B a C a HPV (Krejsek a Kopecký 2004).

Ukazatelem nádorového onemocnění mohou být i CA-antigeny (carcinoma antigens). Příkladem může být CA 125, jehož zvýšené hodnoty signalizují především nádory ovaria, dále také prsu, plic či pankreatu. Antigen CA 72-4 signalizuje karcinom žaludku (Masopust 2004).

Nádorové buňky mohou být dvojího typu. Benigní jsou pouze malformacemi a morfologickými změnami tkání bez schopnosti metastáz. Naopak maligní buňky jsou

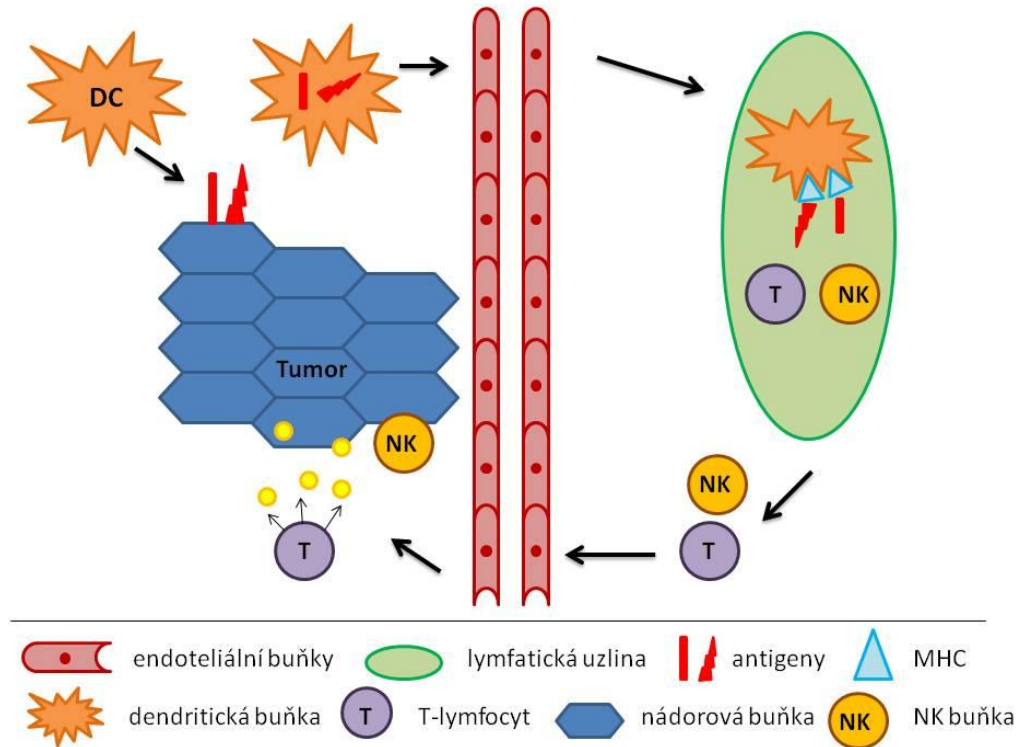
zhoubné a život ohrožující. Jejich základním znakem je schopnost invazně se šířit do okolní tkáně i na jiná místa organismu. Rozšíření nádorových buněk mimo primární místo vzniku je označováno jako metastázování. Tento proces využívá lymfogenní nebo hematogenní cestu. Z hlediska výchozí tkáně také rozlišujeme nádory z epitelů (karcinomy), pojiv (sarkomy), krve (lymfomy) a mnoho dalších. Používané rozdělení zahrnuje také nádory solidní, objevující se často na orgánech. Tento typ lze diagnostikovat pomocí různých zobrazovacích metod, např. rentgen či ultrazvuk. Opakem jsou nádory hematologické postihující krvetvorné buňky.

V dnešní době již není pravidlem, že každé diagnostikované nádorové onemocnění je smrtelné, mnoho z nich se dá úspěšně léčit. Přesto jsou některé nálezy život ohrožující zejména tehdy, pokud jsou již plně rozvinuty.

4.1 Interakce nádoru a imunitního systému

Imunitní systém funguje na základě rozpoznávání antigenů. Pro protinádorovou odpověď efektivně zabíjející rakovinové buňky musí být opakovaně zahájena řada postupných reakcí. Celý protinádorový cyklus můžeme shrnout do sedmi základních kroků (Chen, Mellman 2013). První krok zahrnuje uvolnění nádorových neoantigenů vzniklých onkogenezí. Ty jsou zachyceny a zpracovány DC (2. krok). Pro vyvolání odezvy u protinádorových T-lymfocytů musí první krok doprovázet specifické signály, které zabrání indukci periferní tolerance k nádorovým buňkám. Takové signály představují protizánětlivé cytokiny nebo látky či faktory uvolněné smrtí nádorových buněk. V dalším, 3. kroku, prezentují DC zachycené antigeny T-lymfocytům na MHC-I a MHC-II molekulách. Třetí krok vede k aktivaci efektorové odpovědi proti specifickému nádorovému antigenu, který je vnímám jako cizí nebo proti němu není tolerance. Povaha imunitní odpovědi je v tomto okamžiku založena na rovnováze poměru efektorových a regulačních T-lymfocytů. Tento poměr je klíčem ke konečnému výsledku a eliminaci nádoru. V kroku čtyři a pět jsou aktivované efektorové buňky dopraveny a infiltrovány k buňkám nádoru. V šestém kroku T-lymfocyty rozpoznají nádorové buňky díky interakci TCR a antigenu prezentovaného na molekule MHC. Po

této důležité interakci dojde v sedmém kroku k usmrcení nádorové buňky (Chen, Mellman 2013). Proces zjednodušuje následující obrázek 2.



Obrázek 2. Dendritické buňky zachytí nádorové antigeny nekrotické či apoptické buňky a dopraví je do lymfatických uzlin. Zde dojde k prezentaci antigenů pomocí MHC molekul T-lymfocytům či NK buňkám. Takto aktivované efektorové T-lymfocyty jsou následně přes endoteliální výstelku cév dopraveny k buňkám nádoru, kde rozpoznají cílové buňky a začnou vylučovat cytokiny, které nádorové buňky usmrtí (upraveno dle Motz, Coukos 2013).

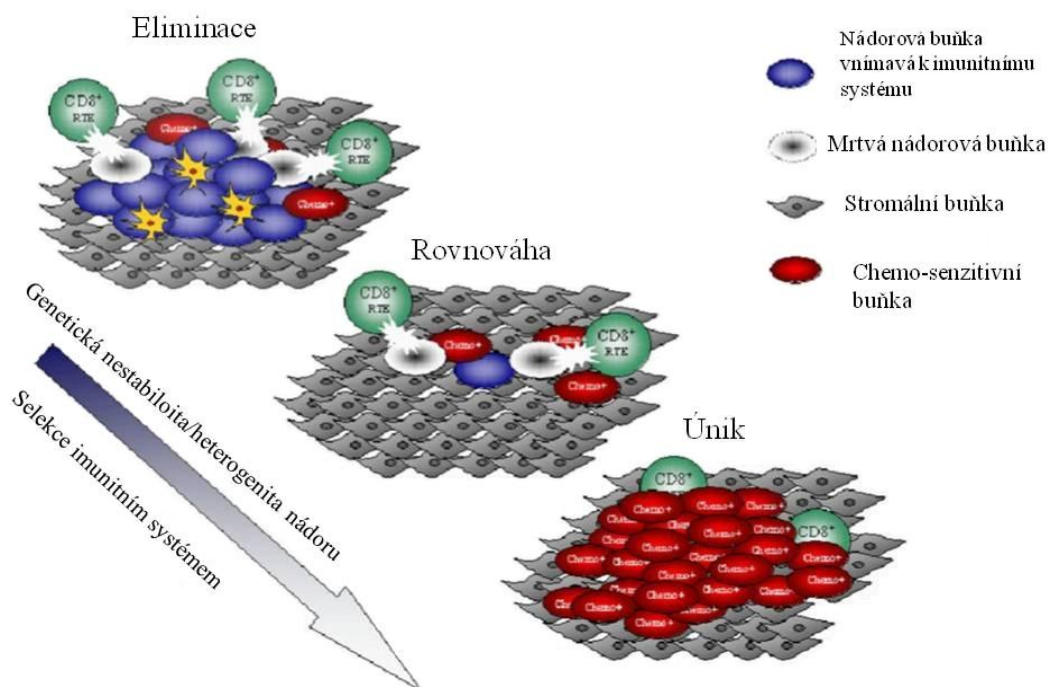
V ideálním případě by se tento cyklus měl neustále opakovat, a tím by byl nádor zcela eliminován. Nicméně u onkologicky nemocných pacientů tento cyklus nepracuje správně. Problémy může mít imunitní systém se samotnou detekcí a zachycením nádorových buněk. Jejich obranu před rozpoznáním zajišťuje několik specifických mechanismů. Je to především napojení sacharidů na kyselinu sialovou a tím skrytí antigenů TAA, které se přestávají jevit jako cizí (Hořejší, Bartůňková 2005). Dále také vysoký polymorfismus antigenů i jejich množství. Některé nádorové buňky antigeny mají, jiné je nemají nebo jich vytváří tak malé množství, že nejsou schopny stimulovat buněčnou odpověď imunitního systému. Častým jevem je také snížení výskytu MHC molekul potřebných k prezentaci antigenu. S malým počtem těchto molekul je snížena

i pravděpodobnost prezentace antigenu T-lymfocytům (Ferenčík a kol. 2005). Naopak nádorová buňka s nízkým množstvím presentačních molekul MHC riskuje zlikvidování pomocí NK buněk. Častým problémem je i snížené množství efektorových buněk či poškození TCR. To otevírá prostor protinádorové imunoterapii. Změna koncentrace efektorových buněk a jejich dodání do organismu s pomocnými látkami může vést k aktivaci požadované buněčné odpovědi T-lymfocytů (Chen, Mellman 2013).

Samotná prezentace antigenu nevede k dozrání T-lymfocytů. K tomu jsou zapotřebí i doprovodné signály, jejichž absence vede k vytvoření regulačních T-lymfocytů (Melero a kol. 2014). K jejich tvorbě přispěje i mikroprostředí nádoru. Jeho imunosupresivní signály blokují (případně inhibují) funkci T-lymfocytů či NK buněk, a tím utlumí či úplně znemožní protinádorovou imunitní odpověď. Imunosupresivní signály také vedou k tvorbě Treg-lymfocytů a myeloidních supresorových buněk (MDSCs), jež potlačí efektorové T-lymfocyty. Může také docházet k expresi proteinu PD-L1 způsobující programovanou buněčnou smrt efektorových buněk (Motz, Coukos 2013). Dalším příkladem může být uvolnění TGF- β či CAE, které inhibují NK buňky, nebo sekreci cytokinů skupiny TNF (konkrétně Fas-L), jehož vazba na povrch imunitních buněk podpoří jejich apoptózu (Lipská a kol. 2009). Produkty nádorových buněk mohou také ovlivnit tvorbu, dozrávání a životnost DC. Tímto produktem může být oxid dusný, který nastartuje apoptózu DC nebo IL-10 či TGF- β , jež potlačují jejich maturaci (Bartůňková 2012). Samotné mikroprostředí nádorů může být také poněkud toxické pro optimální funkci tumor specifických T-lymfocytů (Motz, Coukos 2013).

Pro úplný rozvoj nádoru je nezbytné, aby nekonečně dělicí se buňky začaly postupně prorůstat do okolní tkáně. Rychlost proliferace často převyšuje eliminaci defektních buněk imunitním systémem. Obecné schéma editace nádoru představuje obrázek 3. Při správné funkci imunitního systému jsou nádorové buňky eliminovány především cytotoxickými T-lymfocyty. Postupným množení nádorových buněk však může nastat fáze rovnováhy, kdy T-lymfocyty sice působí, přesto ale neodstraní všechny abnormální buňky. Vlivem selekčního tlaku imunitního systému, dochází ke vzniku únikových variant nádorových buněk. Přibývá geneticky nestabilních a heterogenních buněk, které následně unikají imunitní kontrole. Takové buňky mohou

snadněji expandovat a vytvořit již plně rozvinutý klinicky detekovatelný nádor (Vávrová a kol. 2013).



Obrázek 3. Model editace nádoru (upraveno dle Dunn a kol. 2002). Nádorové buňky jsou nejprve úspěšně eliminovány imunitním systémem. Při vzrůstající genetické nestabilitě se dostává prostředí do rovnováhy a imunitní systém nestíhá reagovat v plném rozsahu. Tato situace může vygradovat do stavu, kdy nádorové buňky zcela uniknou kontrole.

K identifikaci nádorové tkáně je zapotřebí alespoň 1 gram nekontrolovatelně pomnožených buněk. Pro vytvoření 1 gramu nádorové tkáně je zapotřebí 30 buněčných cyklů. Následně pouhých 10 buněčných cyklů je nutných k tomu, aby nádor dosáhl velikosti 1 kilogramu (Klener a kol. 2002). Tato modelová situace dobře zobrazuje, že nádor se nejdelší čas nachází ve skryté, tzv. latentní fázi. Ta může trvat i několik let. Ve skutečnosti však růst nádoru nezávisí jen na rychlosti proliferace buněk, ale současně i na jejich eliminaci přirozenými procesy, např. apoptózou či prostřednictvím imunitního systému. Mezi rychle se rozvíjející nádory řadíme leukémie, lymfomy či

malobuněčný karcinom plic. Naopak pomalu rostoucí nádory postihují tkáně tlustého střeva, mléčné žlázy a jiné (Klener a kol. 2002). Díky poznatkům o funkci imunitního systému, nádorovém bujení a jejich vzájemných interakcích začala být zkoumána možnost využití přirozených mechanismů imunitního systému v léčbě onkologicky nemocných pacientů.

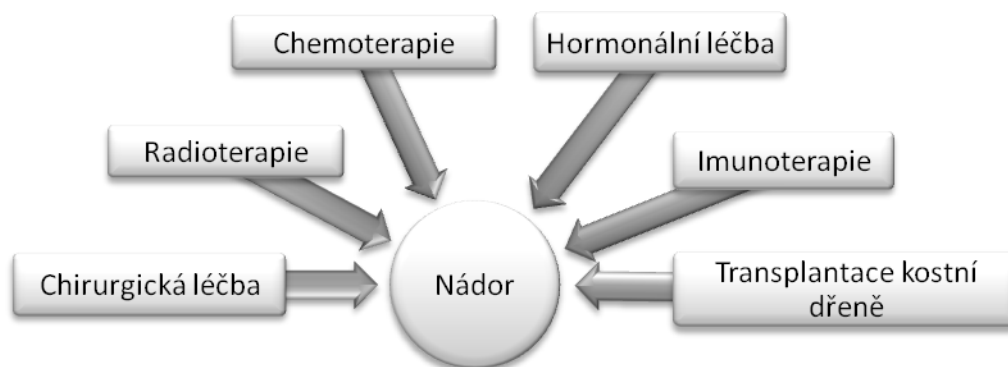
5. Léčba nádorových onemocnění využívající imunitní reakce

S přibývajícím počtem diagnostikovaných nádorových onemocnění za rok se zvýšily i možnosti efektivní léčby. V současné onkologii se používá celá řada léčebných metod a jejich vzájemných kombinací. Aplikace jednotlivých léčebných postupů je velmi individuální. Záleží především na typu nádoru a aktuálním zdravotním stavu pacienta.

Základním typem terapie u solidních (pevných) nádorů je chirurgické odstranění nádoru. Tento postup nelze použít u leukémií (onemocnění krve), popř. u těžko přístupných pevných nádorů, kdy by chirurgický zákrok představoval riziko poškození životně důležitých orgánů.

Další z využívaných metod je radioterapie. Tato léčba pomocí radioaktivního záření cíleně poškozuje rychle se množící buňky. Často zmírňuje bolest a vede ke zmenšení nádoru či zastavení jeho růstu. Aplikuje se i na metastáze v kostech, kde zastavuje jejich růst. Chemoterapie je založena na infuzi cytotoxických látek, které přednostně poškozují rychle se dělící buňky. Negativním vedlejším efektem používaných cytostatik je jejich působení nejen na nádorové buňky, ale i na ostatní buňky v těle, které se rychle dělí. Těmi jsou především krvetvorné buňky a buňky vlasových váčků. Další formou léčby je hormonální terapie. Jde o nejdéle používanou formu cílené „biologické“ léčby zaměřené na endokrinní systém. Metoda využívá několik možností. První je exogenní dodání hormonu do těla, druhou je podání látky inhibující produkci hormonu a jako třetí lze využít chirurgické odstranění endokrinních orgánů. Některé druhy nádorů totiž mají receptory pro běžné hormony, které po navázání podporují růst nádoru. Dnes je možné regulovat interakci příslušné molekuly a receptoru, což lze využít při léčbě např. nádorů prostaty, vaječníků, děložní sliznice či prsu (Melero a kol. 2014). U mnoha nádorů prsu je exprimován receptor růstového faktoru, tzv. HER2 (Libson, Lippman 2014). Poměrně nově je využívána i možnost imunoterapie, která se snaží využít přirozených mechanismů a reakcí imunitního systému k likvidaci nádorových buněk (Baxevanis a kol. 2014, Melero a kol. 2014). Při

léčbě leukémií a nádorů lymfatických uzlin se využívá i transplantace kostní dřeně (Shlaak a kol. 2013). Všechny zmíněné metody léčby se různě vzájemně kombinují, aby bylo dosaženo co nejlepšího výsledku. Ten mohou navíc podpořit terapie na bázi vitamínů, především vitamínu C a D (Wilson a kol. 2014). Celou soustavu možností léčby znázorňuje obrázek 4.



Obrázek 4. Možnosti léčby nádorového onemocnění (upraveno dle Klener a Klener jr. 2010).

Imunoterapie je v posledních letech velmi dynamicky se rozvíjející oblastí. Jejím cílem je podpořit či aktivovat přirozené imunitní reakce, které mohou vést k eliminaci nádoru. Snaží se využít veškeré poznatky o funkci imunitního systému a aplikovat je na celkovou a neinvazivní léčbu nádorových onemocnění. Tento druh terapie se nejvíce blíží přirozené obraně lidského organismu. Tato oblast využívá nejen buněk imunitního systému, především DC a T-lymfocytů, ale i jejich přirozených produktů, jako jsou cytokiny a interferony.

Současný pohled na imunoterapii může být dvojího typu. První pohled zohledňuje aktivitu samotného organismu. Dle tohoto pohledu se imunoterapie dělí na pasivní a aktivní. Principem pasivní terapie je přenos autologních či alogenních efektorových buněk, nebo monoklonálních protilátek do organismu pacienta. V praxi se například využívá transplantace kostní dřeně, transfer tumor specifických T-lymfocytů (CTL) nebo tumor infiltrujících lymfocytů (TIL). Pasivní imunoterapie má rychlý nástup účinku, který ovšem netrvá dlouho (Klener jr. a Klener 2013).

Cílem aktivní imunoterapie je zvýšit schopnost vlastního imunitního systému pacienta reagovat na antigeny vytvořené nádorem a následně zahájit likvidaci

nádorových buněk. K tomu lze využít protinádorové vakcíny připravené z nádorových buněk nebo také uvolněné nádorové antigeny z kryochirurgických zákroků či jiných metod. Klinicky aplikované jsou vakcíny na bázi dendritických buněk, nádorových buněk či DNA (Klener a Klener jr. 2010).

Druhé rozdělení je dle mechanismu, na kterém je imunoterapie postavena. Ten může být buněčný nebo látkový. Na imunitních reakcích se podílí různé druhy specializovaných buněk. Proto může být buněčná imunoterapie založena na bázi DC (Vopenkova, Mollova 2012), alogenní transplantaci kmenových buněk (Shlaak a kol. 2013), případně na T-lymfocytech a jejich subpopulacích (Vávrová a kol. 2013). Látková imunoterapie využívá protilátky, cytokiny a chemokiny pro ovlivnění mikroprostředí nádoru (Ondondo a kol. 2013).

5.1 Posílení imunitních reakcí nespecificky

K posílení reakcí organismu využíváme produkty buněk imunitního systému. Tato metoda se často používá současně s radioterapií či chemoterapií. Hlavními látkami, jejichž cílem je imunitní systém povzbudit, jsou interferony a interleukiny, ale i další cytokiny.

Interferony jsou skupina látek pomáhající imunitnímu systému zasáhnout nejen proti virům, ale i proti nádorovým buňkám, mohou také zpomalit růst nádoru i jeho krevního zásobení. Skupina $\text{INF-}\alpha$ působí na zvýšení produkce MHC-I molekul, které jsou nezbytné pro prezentaci antigenu cytotoxickým T-lymfocytům, dále stimuluje NK buňky (Goodbourn a kol. 2000). Pouze $\text{INF-}\alpha$, jenž lze připravit i v laboratoři, je běžně používán v onkologické léčbě. Krátkodobým vedlejším účinkem interferonu může být zvýšené riziko infekce, řídnutí vlasů, vyrážky nebo příznaky podobné chřipce. Dlouhodobým vedlejším efektem může být poškození nervů v mozku a míše. Léčba interferonem je vhodná pro nádory ledvin a některé typy leukémií, např. chronická myeloidní leukémie (American cancer society 2014).

Interleukiny jsou chemické signální látky, které slouží ke komunikaci mezi bílými krvinkami a regulují jejich aktivitu a vývoj. Vytváří je všechny buňky včetně T-

lymfocytů. IL-2 je v těle běžně produkován T_H1 -lymfocyty. Stimuluje růst a dělení důležitých imunitních buněk zasahujících proti nádoru. Může být použit jako samostatné léčivo, případně v kombinaci s INF- α . V léčbě nádorových onemocnění je používán IL-2 k léčbě pokročilých stádií rakoviny ledvin a kůže. Vedlejším účinkem je přibírání na váze, nevolnost či zvracení (American cancer society 2014). Probíhají testy pro možnost využití i IL-7 a IL-12, který stimuluje buňky T_H1 a NK. Dále také IL-21 ovlivňující proliferaci NK buněk, B i T-lymfocytů (Hořejší, Bartůňková 2005).

Z celé skupiny interleukinů byl IL-4 z léčby nádorů vyřazen, protože jeho zvýšená hladina po chirurgickém odstranění nádoru výrazně ovlivňuje možnost návratu onemocnění do 12 – 36 měsíců (Li a kol. 2014). Dalším interleukinem, který je vhodné potlačit, je IL-27, jelikož negativně působí na T_H1 . Způsobuje jejich dysfunkci a vyčerpání. Jeho blokáce by mohla být efektivní strategií pro léčbu rakoviny (Zhu a kol. 2015).

Důležitým cytokinem je také GM-CSF. Tento růstový faktor působí na kostní dřeň a stimuluje ji k vytváření specializovaných buněk. Působí na T-buňky a jejich transformaci do různých subpopulací. Má schopnost zvýšit indukovanou imunitní odpověď a výrazně ovlivnit poměr T_H1 a T_H2 -lymfocytů. Dokáže také stimulovat DC do subpopulace, která mnohem účinněji prezentuje antigen (Herndler-Brandstetter, Flavell 2014). Pokud je tento faktor ve výrazné nadprodukcii, nevyvolává odpověď u T_H1 (Shi a kol. 2006). Jednotlivé faktory a jejich signální dráhy je potřeba ještě podrobit výzkumu. GM-CSF byl zaznamenán i jako produkt regulačních T-lymfocytů skupiny iTreg (Reynolds a kol. 2014). Jeho aplikace tedy obecně podporuje růst bílých krvinek po chemoterapii, proto se také testuje jako součást imunoterapie zaměřená na posílení nespecifických reakcí (American cancer society 2014).

5.2 Monoklonální protilátky

Monoklonální protilátky (mAb) jsou používanou formou imunoterapie, která je specifická k povrchovému nádorovému antigenu nebo rozpustnému proteinu. Cílem monoklonálních protilátek jsou membránové proteiny (CD52), růstové faktory (VEGF), receptory (VEGFR) a další molekuly (Klener a Klener jr. 2010). Pomáhají imunitnímu systému zlikvidovat buňky nádoru. Vyrábějí se v laboratorních podmínkách pomocí B-lymfocytů. Při aplikaci do těla pacienta fungují stejně jako přirozeně produkované protilátky. Jejich hlavním principem je vazba s nádorovou buňkou nebo zablokování příslušné signální dráhy. Tato vazba zviditelní nádorové buňky imunitnímu systému, který je snadněji identifikuje a zlikviduje. Dále mají za úkol bránit rychlému růstu nádorových buněk, případně přímo k nádoru přepravit toxický jed či radioaktivní molekuly (Klener jr. a Klener 2013). Monoklonální látky pomáhají také při diagnostice nádoru (Belada 2008). Jsou aplikovány nitrožilně, injekčně do svalů i ve formě tablet.

Problémem monoklonálních protilátek je velké množství druhů nádorů a tedy i velká variabilita v antigenech. Monoklonální protilátky mohou mít několik typů. Rozlišujeme především mAb myší, prasečí a humanizované. Jsou však používána i jiná zvířata pro získání protilátek, např. křeček (Vrána a kol. 2011). Při použití zvířecího základu je důležitý následný proces humanizace, kdy je ta část molekuly, jež není uzpůsobena k vazbě antigenu, nahrazena úsekem lidského imunoglobulinu. Tím se zmenší pravděpodobnost vedlejších reakcí, při kterých imunitní systém připravenou protilátku rozpozná jako cizorodou a zničí ji. Vybrat správný antigen není jednoduché, avšak u některých typů nádorů má antigenní léčba příznivé výsledky (Hajdúch a kol. 2004). Podle mechanismu účinku rozlišujeme několik typů monoklonálních protilátek.

Úkolem **prosté monoklonální protilátky** je vazba na cílovou molekulu (receptor, koreceptor, popř. jejich ligand), která stimuluje nebo naopak inhibuje konkrétní imunitní reakci. Cílem monoklonální **protilátky s navázaným léčivem**, tedy radioaktivním prvkem, cytokinem, cytostatikem nebo toxinem je označení či likvidace buňky. Nejpoužívanějším toxinem je ricin a pseudomonádový exotoxin. Z cytokinů pak

IL-2, TNF- α či GM-CSF. Radioimunokonjugáty pak dodávají do místa nádoru 3x až 50x vyšší dávku záření než do normální tkáně (Hajdúch a kol. 2004).

Prosté monoklonální protilátky mohou blokovat CTLA-4, což je molekula přítomná na aktivovaných T-lymfocytech. Interakce CTLA-4 s ligandem B7 snižuje aktivitu T-lymfocytů a brzdí imunitní reakci. Rozhodnutí o inhibici či aktivaci CTLA-4 patří k jednomu z imunitních kontrolních bodů. CTLA-4 běžně brání nadměrné imunitní reakci (Melero a kol. 2014). Blokace CTLA-4 výrazně podporuje proliferaci T-buněk s krátkodobou pamětí, a tím zvyšuje schopnost protinádorové imunitní odpovědi (Dhodapkar a kol. 2014). Komplikací může být zvýšená možnost autoimunitních onemocnění (Baxevanis a kol. 2014, American cancer society 2014). Lék s názvem Ipilimumab se zaměřuje právě na blokaci CTLA-4 (Snyder a kol. 2014).

Monoklonální protilátky se mohou zaměřit také na molekuly PD-1 nebo PDL-1 (Melero a kol. 2014, Dhodapkar a kol. 2014, American cancer society 2014). Jedná se o protein programované buněčné smrti, vytvářený na T-lymfocytech a jeho ligand. Jejich interakce je považována za důležitý imunitní kontrolní bod, který tlumí funkci T-buněk. Na rozdíl od blokace CTLA-4 nepodporuje buňky s pamětí, ale vede ke změnám T-buněk působících na NK buňky (Dhodapkar a kol. 2014). Znemožnění této interakce povzbudí imunitní systém v reakci proti nádoru. Některé nádorové buňky exprimují mnoho PDL-1 a díky tomu uniknou imunitní kontrole (Melero a kol. 2014, American cancer society 2014, Nguyen a kol. 2014, Naidoo a kol. 2014).

Další možností mAb je blokace koreceptorové molekuly CD52, která se využívá k léčbě onemocnění T-lymfocytů, např. chronické lymfocytární leukémie (Sylvan a kol. 2014). Tuto molekulu totiž můžeme nalézt na zralých T-lymfocytech, ale nevyskytuje se na zárodečných kmenových buňkách. Navázáním protilátky na CD52 jsou T-lymfocyty označeny a určeny k likvidaci. Protilátka tedy zprostředkuje buněčnou cytotoxicitu (Sylvan a kol. 2014). Vazby s CD52 jsou zkoumány v rámci mikroprostředí nádoru i v mechanismech vazby lymfocytů na stěny lymfatických cév (Toh a kol. 2013).

HER2 je receptorem pro epidermální růstový faktor v nádorových buňkách mléčné žlázy. Zablokováním tohoto receptoru nedojde ke spuštění signalizačních

kaskád, které podporují proliferaci. Je však podmínkou, aby buňky nádoru tento HER2 receptor exprimovaly. Pokud je exprimován v nízkých koncentracích, má imunoterapie zacílená na blokaci tohoto faktoru smysl. Na tomto principu pracuje např. lék Trastuzumab, který se používá při léčbě rakoviny prsu (Melero a kol. 2014).

Monoklonální protilátky dále mohou blokovat růstové faktory, které jsou důležité pro rozvoj nádoru. Mezi ně patří vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF), (Vrána a kol. 2011). Přípravky na této bázi nepůsobí na nádorové buňky, ale na endotelové buňky okolní tkáně. Rostoucí nádorové buňky potřebují výživu a s jejich přibývajícím počtem se zvyšují i jejich nároky na cévní zásobení. Faktor VEGF je zodpovědný za vytváření cévního zásobení. Jeho blokací je utlumena tvorba cévního řečiště v okolí nádoru a zpomalení či zastavení jeho růstu. Tato léčebná strategie nepůsobí jen na nádorové buňky, ale i na běžně vznikající kapiláry v organismu (Vrána a kol. 2011). Inhibovat lze i receptory pro růstové faktory, např. receptor pro epidermální růstový faktor (EGFR), který je klíčovým pro rozvoj karcinogeneze (Klener jr. a Klener 2013). Ve zvýšeném množství je produkován i samotnými nádorovými buňkami. Signály probíhající jeho prostřednictvím aktivují buněčné dělení, zastavují přirozenou apoptózu, podporují rozvoj metastáz, a dokonce činí nádor rezistentním vůči chemoterapii, hormonální léčbě i radioterapii (Neuwirthová a kol. 2009).

Všechny monoklonální látky mohou být použity pouze za předpokladu, že je znám mechanismus jejich účinku a také je přesně stanovena diagnóza. V současné době je na trhu velké množství průmyslově vyráběných monoklonálních protilátek běžně používaných k léčbě onkologických onemocnění. Problémovou skutečností je molekulová hmotnost monoklonálních protilátek, která je mnohonásobně vyšší, než klasických cytostatik. Proto i distribuce těchto protilátek je v těle pomalejší a díky heterogenitě v rozmístění antigenů dochází k nerovnoměrnému zásahu nádoru (Hajdúch a kol. 2004). I přesto v této oblasti stále probíhá aktivní výzkum.

5.3 Protinádorové vakcíny

Vakcinace, nebo také očkování, je známá již celou řadu desetiletí. Aktivní imunizace funguje na principu dodání antigenu, případně poškozeného patogenu (vir, bakterie) do těla, aby vyvolal odpověď u imunitního systému. Takto stimulovaná imunita si vytvoří protilátky a paměťové buňky, které rychle a efektivně zareagují, pokud se s antigenem příště setkají. Nedojde tedy znovu k rozvoji onemocnění. Převažujícím způsobem podání je injekční forma.

Protinádorové vakcíny jsou založeny na jiném principu. Tato forma aktivní imunoterapie je založena na zvýšení počtu protinádorových CTL. Toho lze dosáhnout větší exprimací nádorových antigenů nebo MHC molekul (Klener a Klener jr. 2010). Cílem je vyškolit vlastní nebo cizí buňky tak, aby efektivně zasáhly proti buňkám nádorovým. To může pomoci zlikvidovat zbývající buňky nádoru po konvenční terapii, zastavit jejich růst a tím i zlepšit celkovou prognózu onemocnění. Výjimkou je očkování proti rakovině děložního čípku, kterou způsobuje virus HPV (Klener jr. a Klener 2013). V tomto případě je imunitní systém stimulován virovým antigenem. Vakcínu lze použít jako preventivní zásah a nikoliv jako formu léčby.

Vakcíny proti nádoru mohou pracovat různými způsoby. Do vakcín bývají použity buňky autologní (vlastní) nebo alogenní (z jiného pacienta). Rozlišujeme vakcíny **na základě nádorových buněk**. Ty jsou vyrobeny z nádoru, jenž byl pacientovi odebrán při chirurgickém zákroku (Klener a Klener jr. 2010). Vakcíny podporují efektivní rozeznání nádorového antigenu a fragmentů nádorových buněk. Dostatečné množství antigenu je jeden ze základních předpokladů pro aktivaci protinádorové imunitní odpovědi. Tyto antigeny může nabídnout i předchozí léčba, např. radioterapie. Díky radioterapii jsou buňky poškozeny a mohou být vhodným zdrojem antigenu pro DC (Accolla a Tosi, 2012). Vakcíny založeny **na bázi dendritických buněk** (DC) jsou zaměřeny na posílení schopnosti DC prezentovat antigen T-lymfocytům (Klener jr. a Klener 2013).

Dalším typem jsou vakcíny využívající **virové vektory** pro efektivnější imunitní odpověď.

Většina protinádorových vakcín je ve fázi klinických testů. V praxi se používá pouze vakcína Sipuleucel-T určená k léčbě nádoru prostaty. Tato autologní vakcína připravená *in vitro* zahrnuje APC stimulované specifickým proteinem typickým pro nádorové buňky prostaty a růstový faktor GM-CSF, který je potřebný k dozrání DC. Vyvolává minimální vedlejší účinky a pacienti po její aplikaci přežívají déle (Vávrová a kol. 2013).

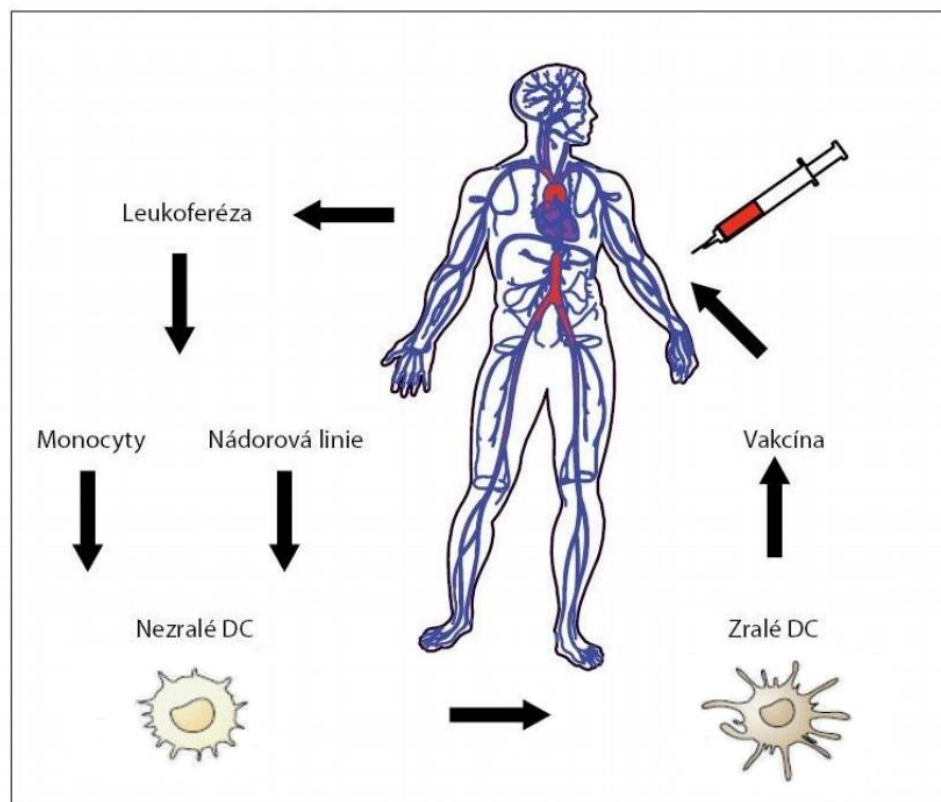
V rámci rozvoje léčby pomocí imunity existuje řada faktorů, kterým je potřeba věnovat zvýšenou pozornost před zvolením nejvhodnějšího typu léčby. Zejména je důležité si uvědomit, že modelové situace nádorů u experimentálních zvířat jsou diametrálně odlišné od nádorů lidských, a to díky velké variabilitě v produkovaných antigenech (Koutecký a kol. 2004) a také pokud jde o míru odezvy či trvání odpovědi (Wargo a kol. 2014). Ve výzkumech jednotlivých metod je potřeba dbát na vhodný výběr pacientů i typů nádorů, ale i raná fáze onemocnění nebo případně již provedený chirurgický zákrok, výrazně zvyšují šanci na přežití. Výběr vhodné imunoterapie pramení z empirických zkušeností a informací dostupných o vyvinutých protinádorových vakcínách (Koutecký a kol. 2004). Problémem však zůstává nedostatek komplexních informací o fungování všech složek imunitního systému a jejich vzájemných interakcích.

5.3.1 Vakcíny na bázi DC

Tyto vakcíny jsou převážně autologní, tedy vyrobeny z vlastních buněk pacienta, proto mají velký potenciál být připravovány pacientovi na míru. Jsou vyráběny *in vitro*, kde dojde ke stimulaci DC pomocí nádorových buněk. Následně jsou takto aktivované DC přeneseny do organismu, kde efektivně prezentují nádorové antigeny. Vakcíny vytvořené tímto způsobem mají vysokou účinnost při vyvolání odpovědi pomocí antigen-specifických T-lymfocytů (Park a kol. 2014). Problémem zůstává komplikovaná izolace a příprava dostatečného množství DC z periferní krve pacienta. Nejprve je potřeba z krve izolovat monocyty pomocí procesu nazývaného leukoferéza. V laboratoři se pak z monocytů připraví DC, které jsou následně donuceny pohltit nádorový antigen a vystavit ho na svém povrchu v komplexu s MHC molekulami. To je

zajištěno tvorbou hybridů mezi DC a nádorovými buňkami nebo inkubací DC s peptidy či nádorovými lyzáty (Brtnický a kol. 2012). Stimulace DC probíhá i v kombinaci s využitím cytokinů, jejichž druhy a poměry jsou stále zkoumány (Vopenkova a kol. 2012). Tímto postupem dojde k jejich aktivaci a následně jsou navraceny do těla pacienta.

Léčba pomocí vakcín na bázi DC je zvažována u ovarialního karcinomu (Brtnický a kol. 2012), nádoru plic (Baek a kol. 2012), nádoru prsu, mnohočetného myelomu a dalších typů nádorů (Vopenková a kol. 2012). I DC mohou mít své subpopulace. Příkladem mohou být plasmacytoidní dendritické buňky (PDC) nebo myeloidní dendritické buňky (MDSC). Tyto buňky jsou slibné v testech u pacientů s melanomem, avšak je zapotřebí hodnotit jejich hladiny společně. Oba typy jsou klíčové pro imunologickou odpověď (Chevolet a kol. 2015). Dlouhodobě nevyřešenou otázkou zůstává, jak efektivně vpravit aktivované DC do těla. Při zvažování jednotlivých možností měly aplikace přibližně stejnou účinnost (Brtnický a kol. 2012). Jednalo se o vakcíny podávané subkutánně, intranodálně i intradermálně. Možnost přímé injekce aktivních DC do lymfatických uzlin byla pro svoji náročnost a potřebu sonografické kontroly zavržena (Brtnický a kol. 2012). Přípravu vakcíny znázorňuje obrázek 5.



Obrázek 5. Schéma přípravy protinádorové vakcíny (upraveno dle Špíšek a kol. 2010). Leukoferéza slouží k izolaci DC z periferní krve. Ty jsou následně aktivovány a ve zralém stavu dodány pacientovi zpět v podobě vakcíny.

5.3.2 Geneticky modifikované T-lymfocyty

Současný výzkum je zaměřen na novinku v rámci imunoterapie, kterou jsou geneticky modifikované T-lymfocyty. Vědci mohou upravovat DNA T-lymfocytů tak, aby co nejlépe pracovaly ve prospěch imunitního systému. Výzkumy probíhají u chimérického antigenního receptoru (CAR), (Gargett, Brown 2014, Guerrero a kol. 2014), a také na lymfocytech infiltrující nádory tzv. TIL (Mao a kol. 2014, Svane, Verdegaal 2014).

Úprava T-lymfocytů probíhá pomocí virových vektorů. Tento druh vakcín využívá molekuly DNA viru, retroviru nebo bakterie jako nositele genetické informace (Klener a Klener jr. 2010). Vakcína s virovým vektorem může nést pozměněnou genetickou informaci, která může přinést do těla jeden i více antigenů vyvolávající

imunitní odpověď, což umožňuje lepší přizpůsobení vakcíny konkrétnímu onemocnění. Cílem je zahájení markantní imunitní odpovědi proti TAA. Samotné části bakterií a virů používaných jako vektory mohou vyvolat imunitní reakci a tím zvýšit pravděpodobnost, že aktivní imunitní systém nalezne i buňky nádoru. Vektorem může být např. virus planých neštovic (Nguyen a kol. 2014).

Terapie pomocí CAR zahrnuje odebrání T-lymfocytů z krve pacienta a genetické pozměnění povrchového antigen specifického receptoru. Předností CAR-T-lymfocytů je skutečnost, že se mohou svým receptorem vázat přímo na TAA a nepotřebují tedy molekuly MHC (Guerrero a kol. 2014). Přednostně se tímto receptorem T-lymfocyt dokáže navázat na povrch nádorové buňky, která exprimuje velké množství antigenu TAA a usmrtit ji. CAR receptory lze konstruovat přímo na určitý typ antigenu izolovaný z nádoru. Výzkumné týmy se snaží najít stále lepší možnosti, jak tyto CAR receptory efektivně vytvářet. Poprvé byla tato metoda geneticky upravených buněk úspěšně využita pro léčbu pacienta s pokročilým stádiem lymfomu (Guerrero a kol. 2014). V laboratorních podmínkách se namnoží T-lymfocyty s upravenými receptory a následně se vrátí zpět do krevního oběhu pacienta, kde je jejich úkolem vyhledat nádorové buňky a zasáhnout proti nim. CAR-T-lymfocyty v prvních klinických testech projevily slibné výsledky (Vávrová a kol. 2013), avšak byly doprovázeny nežádoucími účinky, např. vysoké horečky nebo nebezpečný pokles krevního tlaku (American cancer society 2014). V některých případech byl zaznamenán rozvoj autoimunitního onemocnění či toxické působení CAR na zdravé buňky (Bridgeman a kol. 2010, Cartellieri a kol. 2010, Davies, Maher 2010, Kochenderfer, Rosenberg 2013, Vávrová a kol. 2013). Tyto následky snad může odstranit zařazení sebevražedného genu jako doplněk genomu CAR-T-lymfocytů (Gargett, Brown 2014). Proto se v současné době testuje již třetí generace CARs (Vávrová a kol. 2013). Stále je však využívána i předchozí druhá generace CAR buněk převážně v rámci experimentální fáze testů při léčbě např. chronické a akutní lymfoidní leukémie (Vávrová a kol. 2013). U subpopulace $\gamma\delta$ -T-buněk by bylo vhodné také vytvořit receptory CAR (Guerrero a kol. 2014). Hlavním důvodem je přirozená protinádorová vlastnost celé skupiny. Tou je rozpoznání antigenu bez přítomnosti MHC molekuly. Příprava CAR u $\gamma\delta$ -T-buněk může proběhnout za pomoci jiného dárce. Tím se minimalizuje možnost vytvoření CAR na poškozených T-lymfocytech pacienta, především v případech lymfocytárních

leukémií. Problémem však zůstává malé množství $\gamma\delta$ -T-buněk v periferní krvi pacienta. I tato oblast je nadále zkoumána (Guerrero a kol. 2014).

5.3.3 Adoptivní buněčná terapie

Adoptivní buněčná terapie je založena na autologním přenesení T-buněk. Probíhá výzkum, kdy jsou k léčbě použity buňky TIL nebo Tc (Vávrová a kol. 2013). Případně lze využít alogenní transplantaci kostní dřeně (Shlaak a kol. 2013, Krüger a kol. 2014).

Terapie za pomoci TIL buněk začíná odebráním těchto buněk z nádoru. Pokračuje jejich namnožením díky stimulaci IL-2 a následným vrácením zpět do těla pacienta, kde mohou aktivně bojovat proti nádorovým buňkám (Svane, Verdegaal 2014). TIL buňky můžeme rozdělit podle místa, kde jsou nalezeny. Rozlišujeme tedy lymfocyty v přímém kontaktu s nádorem, které jsou infiltrovány do nádorového lůžka a stromální TIL, které vnikly do stromatu nádoru (cévy a fibroblasty), (Mao a kol. 2014). Izolací TIL buněk můžeme získat potřebné informace o charakteru nádoru, případně metastázi (Khan a kol. 2014). Také je možné, že infiltrace Treg a následná exprese PD-1 v TIL omezuje přirozené protinádorové funkce efektorových buněk CD4 a CD8 (Khan a kol. 2014). Výrazným problémem při léčbě pomocí TIL jsou vysoké dávky IL-2, jenž je potřeba k jejich znásobení. Vysoká toxicita IL-2 a nutnost lékařského dohledu léčbu komplikuje (Vávrová a kol. 2013). Nedávné výzkumy naznačují, že vysoké dávky IL-2 nejsou nutné (Svane, Verdegaal 2014). Alternativou je podání INF- α týden před aplikací vakcíny s TIL. Tato varianta nabízí méně toxický přístup a tedy i větší potenciál pro využití v klinické praxi (Svane, Verdegaal 2014). Celý soubor metod popsaných výše, tzv. adoptivní buněčné terapie, provázejí následující komplikace. První z nich je technologická náročnost izolace buněk z periferní krve, dále také nutnost zavedení léčby ve specializovaných centrech a nedostatek financí z oblasti farmaceutického průmyslu (Svane, Verdegaal 2014).

Cytotoxické T-lymfocyty jsou druhým typem buněk, které lze v rámci adoptivní buněčné terapie využít (Vávrová a kol. 2013). Tyto buňky dovedou spolupracovat

s CD4⁺ T-lymfocyty a efektivně zahájit imunitní odpověď proti nádorovému antigenu. Tc buňky můžeme stimulovat v laboratoři a následně je ve formě vakcíny aplikovat do těla pacienta. Léčba pomocí Tc buněk výrazně zvýšila střední dobu přežívání pacientů s karcinomem ledvin, jater a tlustého střeva (Wang a kol. 2014).

Další možností je využití alogenní transplantace kmenových buněk, především k léčbě primárních kožních lymfomů (CTCL), což je onemocnění s možností přechodu do leukemické formy (Shlaak a kol. 2013). Postihuje zejména pacienty starší 60-ti let. V tomto věku je chemoterapie jedním či více léky doprovázena silnějšími vedlejšími účinky a zároveň je pro tělo velkou zátěží. Proto se v současné době na toto onemocnění aplikuje alogenní transplantace kmenových buněk, která dokáže vyvolat trvalou imunitní odpověď, a tím zpomalit šíření nemoci (Shlaak a kol. 2013, Krüger a kol. 2014). Pro primární kožní T-lymfomy se využívají léky romidepsin a vorinostat (Di Costanzo a kol 2014).

5.3.4 Doplnkové terapie

Zcela nově zkoušenou terapií v rámci onkologických onemocnění je léčba světlem (Yan a kol. 2015). Světlo totiž tvoří ligand pro lymfotoxinové receptory B-lymfocytů (LTbR) s jehož pomocí se nastartují imunitní buňky (Yan a kol. 2015). Terapie světlem může být použita v kombinaci s vakcínací za účelem posílení protinádorové reakce. Vzájemná interakce mezi světlem a LTbR aktivuje imunitní buňky, jejichž činnost vede k regresi nádoru. Tato skutečnost byla objevena ve viry indukovaných nádorech, např. rakovina prostaty, vulvy a cervixu. Principem je předpoklad, že exprese světla v nádoru prostaty může působit na imunitní reakci. Zabrání vstupu Treg do mikroprostředí nádoru, a tím zamezí jeho skrytí imunitnímu dohledu, zároveň vyvolá specifické antigeny TAA. Díky nim by T-lymfocyty vyhledaly nádorové buňky a usmrtily je. Tento princip byl experimentálně ověřen na myších modelech, kdy byla protinádorová vakcinace doplněna světelnou terapií a došlo ke zpomalení rozvoje onemocnění (Yan a kol. 2015, Ondondo a kol. 2013).

6. Závěr

V dnešní době jsou onkologická onemocnění hojně diskutovaným tématem, jelikož rakovina je jednou z nejčastějších příčin úmrtí lidí na světě. Současné přístupy k léčbě různých typů rakoviny vycházejí z dřívějších poznatků a dlouholetých výzkumů. Přesto je rakovina onemocnění, na které není univerzální lék, jenž by jednoznačně zaručil lidem s touto diagnózou přežití. Dnešní technologie a postupy umožňují toto onemocnění efektivně léčit, případně zkvalitnit pacientům život. Klasické postupy jsou hojně doplňovány moderními metodami založenými na imunitních reakcích. Velkou nadějí do budoucna je celé odvětví léčby onkologických onemocnění pomocí přirozených mechanismů imunitního systému. Zvláště, pokud bude výzkum pokračovat v hledání efektivních imunitních buněk. Jednou z těchto skupin jsou právě T-lymfocyty, především jejich subpopulace. Využití jejich práce, produktů a mechanismů účinku proti nádorovému bujení se jeví jako velmi prospěšné pro léčbu rakoviny. V tomto směru je však stále zapotřebí dlouholetého výzkumu. Přesto máme již dnes slibné poznatky o efektivitě léčby pomocí imunomodulačních terapií, které jsou zaměřeny na podporu imunitního systému. V současné době stále probíhá intenzivní výzkum v rámci imunologických reakcí založených na T-lymfocytech a dalších specifických buňkách imunitního systému, který do budoucna jistě pomůže zefektivnit léčbu onkologicky nemocných pacientů.

7. Použité zkratky

Ag – antigen

APC – antigen prezentující buňka

BCR – receptor B-lymfocytů pro antigen

CA – nádorové antigeny

CAE – antigen produkovaný buňkami tlustého střeva

CAR – antigenní chimérický receptor

CD – diferenciační antigen

Cdk – cyklin-depentní kinázy

CTCL – primární kožní T-lymfomy

CTL – tumor specifické T-lymfocyty

CTLA-4 – molekula tlumící aktivitu T-lymfocytů

CSF – faktory stimulující kolonie hematopoetických buněk

DC – dendritická buňka

DNA – deoxyribonukleová kyselina

EGFR – receptor pro epidermální růstový faktor

Fas-L – tumor nekrotizující faktor Fas ligand

FDC – folikulární dendritické buňky

GM-CSF – granulocytární makrofágový kolonie stimulující faktor

HER2 – receptor pro epidermální růstový faktor

HLA – lidský hlavní histokompatibilní komplex

HPV – lidský papilomavirus

INF – interferon

Ig – imunoglobuliny

IL – interleukiny

IS – imunitní systém

iTreg – indukované regulační T-lymfocyty

LTbR – lymfotoxický receptor B-lymfocytů

mAb – monoklonální protilátka

MDSC – myeloidní dendritické buňky

MHC – hlavní histokompatibilní komplex

MHC-I – hlavní histokompatibilní komplex 1. třídy

MHC-II – hlavní histokompatibilní komplex 2. třídy

NK – přirozený zabíječ

nTreg – přirozené regulační T-lymfocyty

PD-1 – protein programované buněčné smrti

PDC – plasmacytoidní dendritické buňky

PDL-1 – ligand proteinu programované buněčné smrti

TAA – antigen sdružený s nádorem

Tc – cytotoxický T-lymfocyt

TCR – receptor T-lymfocytů pro antigen

TGF- β – měnící růstový faktor β (cytokin)

T_h – pomocný T-lymfocyt

TIL – nádor infiltruující T-lymfocyty

TNF – tumor nekrotizující faktor

Treg – regulační T-lymfocyty

TSA – specifický nádorový antigen

VEGF – vaskulární endoteliální růstový faktor

VEGFR – receptor vaskulárního endoteliálního růstového faktoru

8. Použitá literatura

Accolla RS, Tosi G (2013) Adequate Antigen Availability: A Key Issue for Novel Approaches to Tumor Vaccination and Tumor Immunotherapy. *Journal of Neuroimmune Pharmacology* **8**(1): 28-36

American Cancer Society 2014 [online] *Cancer Immunotherapy*. Dostupné z: <http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/003013-pdf.pdf> . [cit. 19.3.2015]

Baek S, Lee SJ, Kim MJ, Lee H (2012) Dendritic Cell (DC) Vaccine in Mouse Lung Cancer Minimal Residual Model; Comparison of Monocyte-derived DC vs. Hematopoietic Stem Cell Derived-DC. *Immune network* **12**(6): 269-76

Bartůňková J (2012) Protinádorová imunita. *Postgraduální medicína* **12**(2):180-188

Bartůňková J, Hrušák O, Paulík M, Smetana K, Šedivá A, Špišek R, Šprongl L, Vernerová E (2011) *Vyšetřovací metody v imunologii*. 2 end. Praha. Grada Publishing

Baxevanis CN, Papamichail M, Perez SA (2014) Therapeutic cancer vaccines: a long and winding road to success. *Expert Review of Vaccines* **13**(1): 131-144

Belada D (2008) Monoklonální protilátky v léčbě lymfomu. *Remedia* **18**(6)

Bridgeman JS, Hawkins RE, Hombach AA, Abken H, Gilham DE (2010) Building Better Chimeric Antigen Receptors for Adoptive T Cell Therapy. *Current Gene Therapy* **10**(2): 77-90

Brtnický T, Podrazil M, Bartunkova J, Spisek R, Rob L (2012) Active cellular immunotherapy of ovarian cancer using dendritic cells. *Ceska gynekologie / Ceska lekarska spolecnost J Ev Purkyne* **77**(3): 215-20

Cartellieri M, Bachmann M, Feldmann A, Bippes C, Stamova S, Wehner R, Temme A, Schmitz M (2010) Chimeric Antigen Receptor-Engineered T Cells for Immunotherapy of Cancer. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*

Chen DS, Mellman I (2013) Oncology Meets Immunology: The Cancer-Immunity Cycle. *Immunity* **39**(1): 1-10

Chevolet I, Speeckaert R, Schreuer M, Neys B, Krysko O, Bachert C, Gele M, Geel N, Brochez L (2015) Clinical significance of plasmacytoid dendritic cells and myeloid-derived suppressor cells in melanoma. *Journal of Translational Medicine*

Davies DM, Maher J (2010) Adoptive T-cell Immunotherapy of Cancer Using Chimeric Antigen Receptor-Grafted T Cells. *Archivum Immunologiae Et Therapiae*

Experimentalis **58**(3): 165-178

Dhodapkar K, Verma R, Sznol M, Boddupalli ChS, Gettinger S, Kluger H, Dhodapkar M, Das R (2014) Distinct immunologic changes in vivo following combination versus individual PD-1 or CTLA-4 checkpoint blockade in human cancer. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* **2** (3): O7

Di Costanzo A, Del Gaudio N, Migliaccio A, Altucci L (2014) Epigenetic drugs against cancer: an evolving landscape. *Archives of Toxicology* **88**(9): 1651-1668

Duan MC, Zhong XN, Liu GN, Wei JR (2014) The Treg/Th17 Paradigm in Lung Cancer. *Journal of Immunology Research*

Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD (2002) Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature Immunology* **3**: 991-998

Ferenčík M, Rovenský J, Shoenfeld Y, Mařha V (2005) *Imunitní systém - informace pro každého*. Praha: Grada Publishing

Gargett T, Brown MP (2014) The inducible caspase-9 suicide gene system as a "safety switch" to limit on-target, off-tumor toxicities of chimeric antigen receptor T cells. *Frontiers in Pharmacology* **5**

Goodbourn S, Didcock L, Randall RE (2000) Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral responses and virus countermeasures. *Journal of General Virology* **81**: 2341-2364

Guerrero AD, Moyes JS, Cooper LNJ (2014) The human application of gene therapy to re-program T-cell specificity using chimeric antigen receptors. *Chinese Journal of Cancer* **33**(9): 421-433

Hajdúch M, Cwiertka K, Trojanec R, Špačková K (2004) Terapeutické monoklonální protilátky v onkologii. *Klin Farmakol Farm* **18**: 165-170

Herndler-Brandstetter D, Flavell RA (2014) Producing GM-CSF: a unique T helper subset? *Cell Research* **24**(12): 1379-1380

Hořejší V, Bartůňková J (2005) *Základy imunologie*. 3 edn. Praha: TRITON

Khan H, Pillarisetty VG, Katz SC (2014) The prognostic value of liver tumor T cell infiltrates. *Journal of Surgical Research* **191**(1): 189-195

Klener P, Abrahámová J, Fait V, Mališ J, Matějovský Zk, Petruželka L, Žaloudík J (2002) *Klinická onkologie*. Praha: Karolinum

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

Klener P jr, Klener P (2013) *Principy systémové protinádorové léčby*. Praha: Grada Publishing a.s.

Koutecký J, Eckslacher T, Kabíčková E, Mališ J, Stejskalová E, Prausová J, Malinová Bl, Linke Zk, Průša R, Masopust J, Kodet R, Goetz P, Hochová I, Neuwirt Jí, Křížová H, Hoch Jí, Bartůňková Ji, Kolář P, Kozák Jí, Vonka V, Cetkovský P, Bubeník J, Haškovcová H (2004) *Klinická onkologie I.*, 1 edn. Přešov: Riopress

Kochenderfer JN, Rosenberg SA (2013) Treating B-cell cancer with T cells expressing anti-CD19 chimeric antigen receptors. *Nature Reviews Clinical Oncology* **10**(5): 267-276

Krejsek J, Kopecký O (2004) *Klinická imunologie*. Pardubice. NUCLEUS HK

Krueger WH, Hirt C, Basara N, Sayer HG, Behre G, Fischer T, Grobe N, Maschmeyer G, Niederwieser D, Doelken G (2014) Allogeneic stem cell transplantation for mantle cell lymphoma-final report from the prospective trials of the East German Study Group Haematology/Oncology (OSHO). *Annals of Hematology* **93**(9): 1587-1597

Li J, Wang Z, Mao K, Guo X (2014) Clinical significance of serum T helper 1/T helper 2 cytokine shift in patients with non-small cell lung cancer. *Oncology Letters* **8**(4): 1682-1686

Libson S, Lippman M (2014) A review of clinical aspects of breast cancer. *International of review of psychiatry* **26**(1): 4-15

Lipská L, Visokai V, Adam R, Bělohávek O, Bohatá Š, Büchler T, Dostálík J, Fencel P, Foldyna M, Frič P, Grisa D, Hashimoto T, Hoti E, Hytych V, Imamura H, Jeek D, Kato A, Kimura F, Kokudo N, Kormuda S, Kosuge T, Kozler P, Levý M, Lodge P, Makuuchi M, Mechl M, Miyaziki M, Mráček M, Naccarati A, Oehr P, Othuska M, Oussoultzoglou E, Oanoro F, Pecen L, Rosso E, Roušová M, Sakamoto Y, Shimizu H, Sugarbaker P, Svobodová Š, Štrupová L, Topolčan O, Torzili G, Turek P, Tyll T, Válek M, Vannucci L, Vávra P, Vodička P, Yoshidome H, Záruba P, Zavoral M, Zazula R (2009) *Recidiva kolorektálního karcinomu – Komplexní přístup z pohledu chirurga*. Praha. Grada Publishing, a.s.

Mao Y, Qu Q, Zhang Y, Liu J, Chen X, Shen K (2014) The Value of Tumor Infiltrating Lymphocytes (TILs) for Predicting Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Plos One* **9**(12)

Marquez-Medina D, Salla-Fortuny J, Salud-Salvia A (2012) Role of gamma-delta T-cells in cancer. Another opening door to immunotherapy. *Clinical & Translational Oncology* **14**(12): 891-895

Masopust J (2004) Nádorové markery včera, dnes a zítra. *Labor Aktuell* **4**: 7-9

Matzinger P (1994) Tolerance, danger, and the extended. *Annual Review of Immunology*

12: 991-1045

Melero I, Gaudemack G, Gerritsen W, Huber C, Parmiani G, Scholl S, Thatcher N, Wagstaff J, Zielinski C, Faulkner I, Mellstedt H (2014) Therapeutic vaccines for cancer: an overview of clinical trials. *Nature Reviews Clinical Oncology* **11**(9): 509-524

Motz G T, Coukos G (2013) Deciphering and reversing tumor immune suppression. *Immunity* **39**(1): 31-73

Naidoo J, Page DB, Wolchok JD (2014) Immune modulation for cancer therapy. *British Journal of Cancer* **111**(12): 2214-2219

Neuwirthová J, Smilek P, Mechl Z, Kostřica R (2009) Význam signální cesty EGFR a prediktivní markery cílené léčby u karcinomů hlavy a krku. *Remedia* **19**: 52–56

Nguyen T, Urbna J, Kalinski P (2014) Therapeutic cancer vaccines and combination immunotherapies involving vaccination. *ImmunoTargets and Therapy* **3**: 135-150

Ondondo B, Jones E, Godkin A, Gallimore A (2013) Home sweet home: the tumor microenvironment as a haven for regulatory T cells. *Frontiers in immunology* **4**: 197-197

Park H-M, Sohn H-J, Kim Y-J, Cho H-I, Kim T-G (2014) CD4 T-cells transduced with CD80 and 4-1BBL mRNA induce long-term CD8 T-cell responses resulting in potent antitumor effects. *Vaccine* **32**(51): 6919-6926

Petruželka L, Konopásek B, Aschermanová A, Helmichová E, Janků F, Kleibl Z, Mališ J, Mareš P, Novotný J, Příbylová O, Špička I, Tesařová P (2003) *Klinická onkologie*. Praha. Nakladatelství Karolinum

Reynolds BC, Turner DG, McPherson RC, Prendergast CT, Phelps RG, Turner NA, O'Connor RA, Anderton SM (2014) Exposure to inflammatory cytokines selectively limits GM-CSF production by induced T regulatory cells. *European Journal of Immunology* **44**(11): 3342-3352

Schlaak M, Pickenhain J, Theurich S, Skoetz N, von Bergwelt-Baildon M, Kurschat P (2013) Allogeneic stem cell transplantation versus conventional therapy for advanced primary cutaneous T-cell lymphoma. *The Cochrane database of systematic reviews* **8**: CD008908-CD008908

Shi YF, Liu CH, Roberts AI, Das JT, Xu GW, Ren GW, Zhang YY, Zhang LY, Yuan ZR, Tan HSW, Das GH, Devadas S (2006) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and T-cell responses: what we do and don't know. *Cell Research* **16**(2): 126-133

Snyder A, Makarov V, Merghoub T, Yuan J, Zaretsky JM, Desrichard A, Walsh LA, Postow MA, Wong P, Ho TS, Hollmann TJ, Bruggeman C, Kannan K, Li YY,

Elipenahli C, Liu CL, Harbison CT, Wang LS, Ribas A, Wolchok JD, Chan TA (2014) Genetic Basis for Clinical Response to CTLA-4 Blockade in Melanoma. *New England Journal of Medicine* **371**(23): 2189-2199

Svane IM, Verdegaal EM (2014) Achievements and challenges of adoptive T cell therapy with tumor-infiltrating or blood-derived lymphocytes for metastatic melanoma: what is needed to achieve standard of care? *Cancer immunology, immunotherapy : CII* **63**(10): 1081-91

Sylvan SE, Lundin J, Ipek M, Palma M, Karlsson C, Hansson L (2014) Alemtuzumab (anti-CD52 monoclonal antibody) as single-agent therapy in patients with relapsed/refractory chronic lymphocytic leukaemia (CLL)-a single region experience on consecutive patients. *Annals of Hematology* **93**(10): 1725-1733

Špišek R, Horváth R, Kayserová J, Bartůňková J (2010) Možnosti protinádorové imunoterapie u karcinomu prostaty. *Zdravotnictví a medicína* **6**

Toh BH, Kyaw T, Tipping P, Bobik A (2013) Immune regulation by CD52-expressing CD4 T cells. *Cellular & Molecular Immunology* **10**(5): 379-382

Trojan S, Langmeier M, Hrachovina V, Kittnar O, Koudelková J, Kuthan V, Mareš J, Marešová D, Mourek J, Pokorný J, Sedláček J, Schreiber M, Trávníčková E, Wunsch Z (1996) *Lékařská fyziologie*. 2 end. Praha. Grada Publishing

Vávrová K, Bartůňková J, Horváth R (2013) Adoptivní T-buněčná terapie v léčbě nádorových onemocnění. *Alergie* **3**: 204-2013

Vopenkova K, Mollova K, Buresova I, Michalek J (2012) Complex evaluation of human monocyte-derived dendritic cells for cancer immunotherapy. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **16**(11): 2827-2837

Vrána A, Fellnerová I, Vránová J (2011) *Imunologie a imunomodulační terapie*. Vol. 1. Olomouc: Vydavatelství Univerzity Palackého

Wang M, Cao J-X, Pan J-H, Liu Y-S, Xu B-L, Li D, Zhang X-Y, Li J-L, Liu J-L, Wang H-B, Wang Z-X (2014) Adoptive Immunotherapy of Cytokine-Induced Killer Cell Therapy in the Treatment of Non-Small Cell Lung Cancer. *Plos One* **9**(11)

Wargo JA, Cooper ZA, Flaherty KT (2014) Universes Collide: Combining Immunotherapy with Targeted Therapy for Cancer. *Cancer Discovery* **4**(12): 1377-1386

Wilson MK, Baguley BC, Wall C, Jameson MB, Findlay MP (2014) Review of high-dose intravenous vitamin C as an anticancer agent. *Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology* **10**(1): 22-37

Yan L, Da Silva DM, Verma B, Gray A, Brand HE, Skeate JG, Porras TB, Kanodia S, Kast WM (2015) Forced LIGHT Expression in Prostate Tumors Overcomes Treg Mediated Immunosuppression and Synergizes With a Prostate Tumor Therapeutic

Vaccine by Recruiting Effector T Lymphocytes. *Prostate* **75**(3): 280-291

Zhu C, Sakuishi K, Xiao S, Sun ZY, Zaghouani S, Gu GX, Wang C, Tan DJ, Wu C, Rangachari M, Pertel T, Jin HT, Ahmed R, Anderson AC, Kuchroo VK (2015) An IL-27/NFIL3 signalling axis drives Tim-3 and IL-10 expression and T-cell dysfunction. *Nature Communications* **6**