

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Regulační T lymfocyty a nádorová onemocnění

Bakalářská práce

Markéta Skaličková

Školitel: RNDr. Jan Ženka, CSc.

České Budějovice 2018

Skaličková, M., 2018: Regulační T lymfocyty a nádorová onemocnění. [Regulatory T cells and cancer. Bc. Thesis, in Czech.] – 76 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

The main aim of this thesis was to study the role of regulatory T cells in cancer. Their presence, importance, and mechanism of their action were studied as well. The practical part was focused on reduction of bigger tumors and suppressing regulatory T-cell effects. The combination of TLR agonists, agonistic CD40 antibody and anti-CTLA-4 was studied on a mouse model of pancreatic adenocarcinoma.

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 jejich 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 databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích, 18. 4. 2018

.....

Markéta Skaličková

Poděkování:

Jako první bych chtěla poděkovat svému školiteli RNDr. Janu Ženkovi, CSc. za spoustu cenných rad, ochotu, nadšení a přátelský přístup při vedené této bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat své spolužačce Radce Lencové za její ochotu pomoci. Velké poděkování patří také celé mé rodině, která mě nesmírně podporovala v průběhu celého studia.

Obsah

1 Úvod	1
2 Teoretická část	2
2.1 NÁDOROVÁ ONEMOCNĚNÍ	2
2.1.1 Obecná charakteristika	3
2.1.2 Příčiny vzniku	4
2.1.3 Klasifikace.....	4
2.1.4 Léčba.....	5
2.1.4.1 Terapie	5
2.1.4.1.1 Chirurgická léčba	5
2.1.4.1.2 Chemoterapie	5
2.1.4.1.3 Radioterapie	6
2.1.4.1.4 Hormonální terapie	6
2.1.4.2 Imunoterapie.....	7
2.1.4.2.1 Klasifikace	7
2.1.4.2.2 Příklady imunoterapií	7
2.1.4.2.3 Regulační T lymfocyty a imunoterapie.....	10
2.1.5 Pankreatický adenokarcinom	12
2.1.5.1 Obecná charakteristika	12
2.1.5.2 Rizikové faktory	13
2.1.5.3 Mikroprostředí pankreatického adenokarcinomu.....	14
2.1.5.4 Nádorová linie Panc02	15
2.1.6 Regulační T lymfocyty a nádorová onemocnění.....	15
2.1.6.1 Tumor infiltrující regulační T lymfocyty	16
2.2 REGULAČNÍ T LYMFOCYTY A ZÁNĚTLIVÉ PROSTŘEDÍ	17
2.2.1 Zánět.....	17
2.2.1.1 Akutní zánět.....	18
2.2.1.2 Chronický zánět.....	18
2.2.2 Úloha regulačních T lymfocytů v zánětlivém prostředí.....	19

2.3	HISTORIE REGULAČNÍCH T LYMFOCYTŮ	20
2.4	REGULAČNÍ T LYMFOCYTY	21
2.4.1	Exprimované molekuly	22
2.4.2	Mechanismy suprese	25
2.4.3	Klasifikace.....	28
2.5	PŘIROZENÉ REGULAČNÍ T LYMFOCYTY	29
2.5.1	Rozdělení.....	29
2.5.2	Vývoj.....	30
2.6	INDUKOVANÉ REGULAČNÍ T LYMFOCYTY	32
2.6.1	Rozdělení.....	33
2.6.2	Regulační lymfocyty typu 1	34
2.6.3	Pomocné lymfocyty typu 3	35
2.6.4	Tregs indukované IL-35	35
2.6.5	Vývoj.....	36
2.7	CTLA-4	37
2.7.1	Využití checkpointové blokády v léčbě pankreatického adenokarcinomu	39
3	Cíle práce.....	42
4	Praktická část	43
4.1	CHEMIKÁLIE	43
4.2	LABORATORNÍ ZVÍŘATA	43
4.3	NÁDOROVÁ BUNĚČNÁ LINIE.....	44
4.4	PŘÍPRAVA NÁDOROVÝCH BUNĚK PANC02	44
4.5	TRANSPLANTACE NÁDOROVÝCH BUNĚK.....	44
4.6	MĚŘENÍ A VÝPOČET VELIKOSTI NÁDORŮ	44
4.7	SLOŽENÍ TERAPEUTICKÝCH LÁTEK	45
4.8	STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ DAT	45

4.9 EXPERIMENTY	45
4.9.1 Studium pankreatického adenokarcinomu pomocí směsi R-848+poly (I:C)+ LTA+manan-BAM+anti-CD40.....	45
4.9.2 Studium pankreatického adenokarcinomu pomocí anti-CTLA-4 v kombinaci se směsí R-848+poly (I:C)+LTA+manan-BAM+anti-CD40	46
5 Výsledky	48
5.9.1 Studium pankreatického adenokarcinomu pomocí směsi R-848+poly (I:C)+ LTA+manan-BAM+anti-CD40.....	48
5.9.2 Studium pankreatického adenokarcinomu pomocí anti-CTLA-4 v kombinaci se směsí R-848+poly (I:C)+LTA+manan-BAM+anti-CD40	51
6 Diskuze	54
7 Závěr	59
8 Seznam použitých zkratek	60
9 Použitá literatura	63

1 Úvod

V předchozích experimentech vedených RNDr. Janem Ženkou, CSc. byl testován účinek **TLR agonistů** vyvolávajících zánětlivou infiltraci a **PAMPs** stimulujících fagocytózu nádorových buněk myšního melanomu B16-F10. Synergie mezi TLR agonisty a agonisty fagocytárních receptorů vedla k zánětlivé infiltraci a k zmenšení růstu nádorů (Janotová a kol., 2014; Caisová a kol., 2016; Waldmannová a kol., 2016). Následně bylo zjištěno, že účinek této terapie může být zesílen pomocí monoklonálních protilátek anti-PD1 a agonistické protilátky anti-CD40. Při jejich použití bylo dosaženo zmenšení růstu nádorů a prodloužení přežití myši. Anti-CD40 byla dokonce schopna sama o sobě snížit růst nádorů melanomu (Nedbalová, 2017).

Účinky obou terapií (terapie založená na synergii TLR agonistů a agonistů fagocytárních receptorů a terapie obohacená navíc o monoklonální protilátku) byly následně studovány na nádorové linii myšního pankreatického adenokarcinomu Panc02.

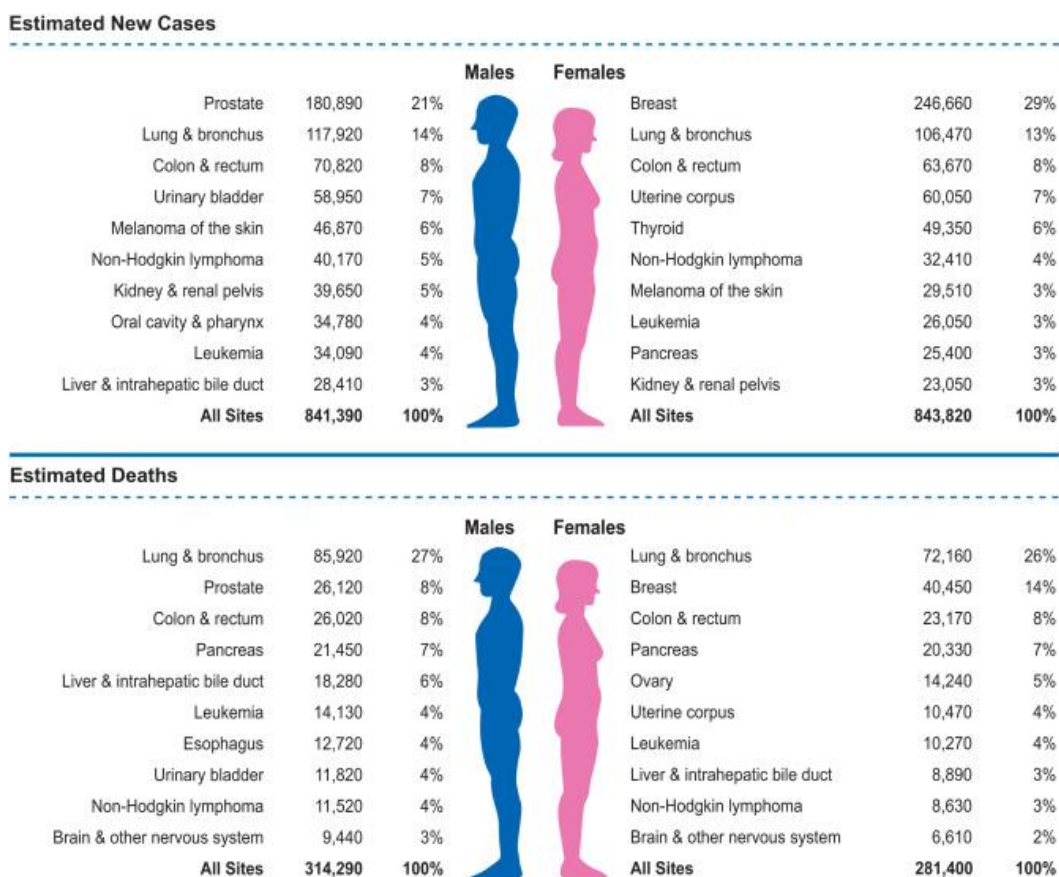
Teoretická část této bakalářské práce se zaměřuje na shrnutí současných poznatků o regulačních T lymfocytech (T_{regs}), které potlačují protinádorovou imunitní odpověď a přispívají k rozvoji imunosupresivního tumorového mikroprostředí (TME) (Chaudhary a Elkord, 2016).

Praktická část této bakalářské práce se zaměřuje na dva experimenty. **První experiment** se zabývá účinkem terapie založené na směsi TLR agonistů, agonistů fagocytárních receptorů a **anti-CD40** na redukci nádorového růstu pankreatického adenokarcinomu. Tyto nádory rostly nikoliv 12 dní, ale 16 dní na rozdíl od předchozích pokusů. Cílem tak bylo otestovat účinek této terapie na nádory dosahující větších objemů. **Druhý experiment** se zabývá vylepšením terapie z prvního experimentu o monoklonální protilátku **anti-CTLA-4**. Důvodem pro její použití bylo zjištění, že T_{regs} exprimují molekulu CTLA-4 (Wing a kol., 2008), která se podílí na jejich supresivním účinku (Buchbinder a Desai, 2016). T_{regs} jsou schopny potlačovat protinádorovou imunitní odpověď prostřednictvím inhibice aktivace a proliferace T buněk a mají vliv také na APC buňky (Buchbinder a Desai, 2016). Cílem bylo zjistit, zda deplece T_{regs} prostřednictvím anti-CTLA-4 vylepší terapeutickou směs a podpoří vrozenou a získanou imunitu, která je supresivním účinkem T_{regs} potlačena.

2 Teoretická část

2.1 Nádorová onemocnění

V dnešní době lidé více umírají na nádorová onemocnění než na infekční nemoci tak, jak tomu bylo dříve. Lidé se dožívají vyššího věku, a tak riziko vzniku nádorového onemocnění je vyšší. Ve Spojených státech a řadě evropských zemí je rakovina druhou nejčastější příčinou smrti hned po kardiovaskulárních onemocněních (Ruddon, 2007). V roce 2016 bylo ve Spojených státech odhadnuto 1 685 210 nových případů s nádorovým onemocněním. Rakovina slinivky břišní z toho představovala 53 070 případů. Nejhuře na tom byly americké státy Kalifornie, Florida a Texas. Ve státech Kalifornie a Florida bylo také odhadnuto největší úmrtí na rakovinu slinivky břišní (Kalifornie – 4 390 případů, Florida – 3 080 případů) v roce 2016 (Siegel a kol., 2016). Přehled deseti hlavních nádorových onemocnění ve Spojených státech v roce 2016 viz Obr.1.

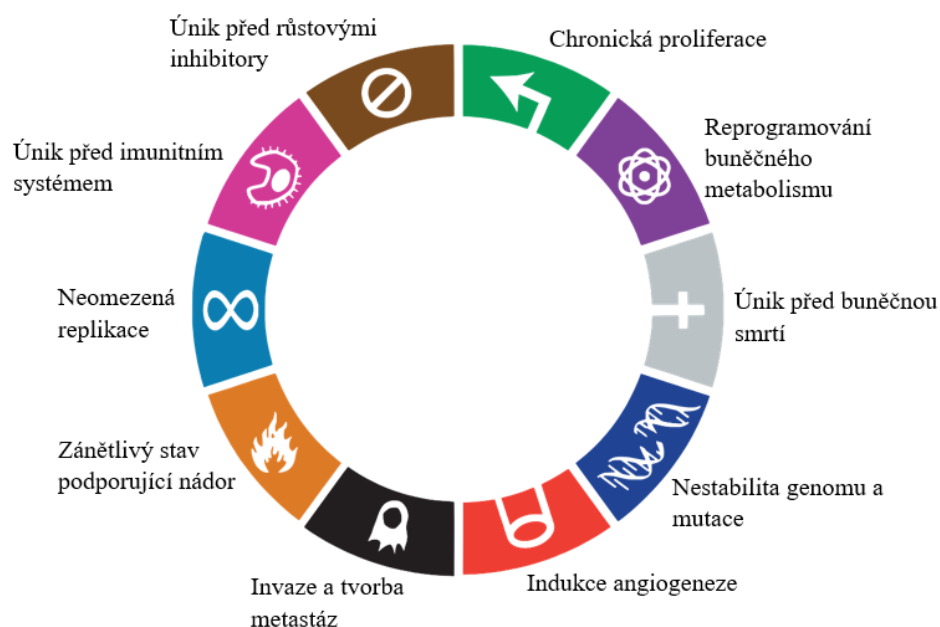


Obr.1: Odhad nových případů a úmrtí pro deset hlavních nádorových onemocnění ve Spojených státech v roce 2016 (Převzato ze Siegel a kol., 2016).

2.1.1 Obecná charakteristika

Nádorová onemocnění představují skupinu chorob, pro kterou je charakteristický **abnormální růst** buněk a odlišný fenotyp ukazující na **heterogenitu** těchto buněk. Abnormálně proliferující populace nádorových buněk může napadat tkáň a metastazovat do vzdálených míst. V normální tkáni je buněčná proliferace a smrt buněk v rovnováze. Existuje více než sto typů nádorových onemocnění, které se liší rychlostí růstu, schopností invaze, potenciálem metastazovat, možnostmi diagnostiky, buněčnou diferenciací a odpovědí na léčbu (Ruddon, 2007).

Mezi několik mechanismů, díky kterým mohou nádorová onemocnění uniknout imunitnímu systému patří například částečná **ztráta prezentace** nádorového antigenu buňkám imunitního systému. Díky **nedostatečnému množství MHC I** molekul dochází ke snížení schopnosti detekovat nádorové buňky cytotoxickými T lymfocyty. Vaskulární endoteliální růstový faktor (**VEGF**) se účastní angiogeneze v tumorovém mikroprostředí, zabraňuje maturaci dendritických buněk (DC) a podílí se na přísunu makrofágů asociovaných s nádorem (**TAM**), které mají imunopresivní účinek (Levy a kol., 2013). Celkový přehled charakteristických znaků nádorových onemocnění viz Obr.2.



Obr.2: Charakteristické znaky nádorových onemocnění (Převzato a upraveno z Hanahan a Weinberg, 2011).

2.1.2 Příčiny vzniku

Zmíněný abnormální růst buněk, který je charakteristický pro nádorová onemocnění, je způsoben změnami exprese onkogenů a supresorových genů, kdy dochází k narušení rovnováhy mezi buněčnou proliferací a smrtí buněk (Ruddon, 2007). **Onkogeny** vznikají mutacemi normálních genů, proto-onkogenů, které kontrolují stupeň diferenciací, a jak často se buňky dělí (Sudhakar, 2009). Aktivace onkogenů tak způsobuje abnormální buněčnou proliferaci (Ruddon, 2007). **Supresorové geny** jsou normálními geny, které kontrolují buněčné dělení, opravu DNA a informují buňku o tom, kdy má zemřít (Sudhakar, 2009). Inaktivace a delece supresorových genů vede k narušení kontroly buněk (Ruddon, 2007).

Existuje řada mechanismů, které způsobují pozměnění genové exprese. Jedním z nich může být přímé **poškození DNA** prostřednictvím genové mutace, translokace, amplifikace, delece nebo ztráty heterogenity (Ruddon, 2007). Většinou je potřeba 4-5 mutací na přeměnu normální buňky na buňku neoplastickou (Korniluk a kol., 2017). K poškození může také dojít prostřednictvím abnormální genové transkripce nebo translace. Důležitou úlohu hrají vnitřní a vnější faktory, které mohou mít vliv na poškození DNA. **Vnějšími faktory** jsou například chemikálie (arsen, kadmium a o-aminoazotoluen) a záření (ultrafialové a ionizující záření). **Vnitřními faktory** jsou defekty imunitního systému a genetické predispozice (Ruddon, 2007).

K rozvoji nádorového onemocnění s velkou pravděpodobností také přispívají faktory, kterými jsou například strava, životní styl, kouření cigaret a věk. Některé virové infekce jsou také schopny vyvolat vznik nádoru. Vliv má i oxidativní poškození DNA, proteinů, lipidů a dalších makromolekul, které se akumulují s rostoucím věkem (Ruddon, 2007).

Průměrný věk, kdy je diagnostikováno nádorové onemocnění je 67 let. Výskyt nádorových onemocnění je u dětí poměrně vzácný, přesto je druhou nejčastější příčinou úmrtí dětí ve věku 1-14 let. Leukémie je u této věkové skupiny nejčastějším důvodem smrti (Ruddon, 2007).

2.1.3 Klasifikace

Hlavní rozdělení nádorů je na nádory maligní a benigní. Dále mohou být rozděleny podle tkáně, ve které vznikají. Například maligní nádory vznikají nejčastěji z epitelální tkáně (karcinomy) (Ruddon, 2007). Nádory se mohou také rozdělovat podle orgánové lokalizace na nádory prostaty, prsu, plic, střeva, slinivky břišní a další (Siegel a kol., 2016).

Mezi hlavní charakteristiky **maligního nádoru** patří rychlý růst (řádově týdny až měsíce), schopnost invaze, ničení přilehlé zdravé tkáně a schopnost metastazovat. Maligní nádory metastazují prostřednictvím lymfatického systému a krevních cév do lymfatických uzlin a dalších tkání. Plíce a játra jsou nejčastějším místem výskytu **metastáz**. Jejich výskyt je obvykle nejdůležitějším prognostickým faktorem (Ruddon, 2007). Stejně tak jako buňky v primárních nádorech, tak i buňky v metastázách proliferují, jsou invazivní a pronikají do krevních cév, což může vést k tvorbě sekundárních metastáz (Friedl a Alexander, 2011).

Benigní nádory nemají schopnost invaze a tvorby metastáz. Tyto nádory mohou pouze utlačovat normální tkáň. Ale i tento stav může být život ohrožující, pokud dochází k utlačování nervů nebo krevních cév. Benigní nádory rostou mnohem pomaleji. Jejich růst může probíhat i několik let. Benigní nádory se velice často podobají normální tkáni na rozdíl od maligních nádorů. Z počátku se některé maligní neoplastické buňky mohou strukturně a funkčně podobat normální tkáni, ale později vlivem vývoje, invaze a tvorby metastáz dochází k jejich odlišení od normálních buněk. Nádorové buňky mají také mnohem variabilnější tvar, větší jádro a větší poměr jádro – cytoplazma (Ruddon, 2007).

2.1.4 Léčba

2.1.4.1 Terapie

2.1.4.1.1 Chirurgická léčba

Odstranění nádoru pomocí chirurgického zákroku může být dostatečné u lokalizovaných nádorů malé velikosti, u kterých nejsou přítomny metastázy. Chirurgická léčba může také přispívat k zmenšení hmoty nádoru a usnadnit tím účinek chemoterapie nebo radioterapie (Klener a kol., 2006).

2.1.4.1.2 Chemoterapie

Chemoterapie zůstává stále hlavní součástí léčby zejména těch nádorových onemocnění, která nelze odstranit chirurgicky (Sawyers, 2004). Chemoterapie je založena na podávání **cytostatik**, která mohou mít přírodní i syntetický charakter, a mají vliv na **dělení buňky**. Existuje velké množství cytostatik, která působí na buňky vyskytující se v různých fázích buněčného cyklu. Cytostatika ovlivňují jak buňky nádoru, tak i normální buňky zdravé tkáně.

Chemoterapie se tak projevuje řadou nepříznivých **vedlejších účinků**, kterými jsou například narušení krvetvorby, porucha trávicí soustavy, nevolnost, poškození ledvin a buněk folikulů vlasů (Klener a kol., 2006).

Po dávce chemoterapie dochází k opětovnému obnovení populace nádorových a zdravých buněk. Populace zdravých buněk je schopna se vrátit do původního počtu před chemoterapií mnohem rychleji na rozdíl od buněk nádorových. Přestože tímto způsobem dochází k odstranění viditelného nádoru a symptomů, tak je potřeba v léčbě neustávat a zničit nádorové buňky úplně (Klener a kol., 2006).

Během 20. století došlo k vývoji nových metod léčby rakoviny kombinující chirurgii s chemoterapií a/nebo radioterapií (Sudhakar, 2009). **Adjuvantní** chemoterapie následuje po chirurgickém zákroku nebo radioterapii. Snahou je odstranit zbytek nádorových buněk. **Neadjuvantní** chemoterapie předchází chirurgický zákrok nebo radioterapii. Cílem je zmenšit nádor a tím ulehčit operační zákrok a vniknutí chemoterapeutika (Klener a kol., 2006).

2.1.4.1.3 Radioterapie

Radioterapie je založena na **ionizujícím záření** a je primární léčbou v řadě lokalizovaných nádorů (Levy a kol., 2013). Radioterapie nepříznivě ovlivňuje imunitní systém. Způsobuje supresi lymfocytů a hematopoetických progenitorových buněk díky nespecifickému zacílení ionizujícího záření (Chaudhary a Elkord, 2016).

Regulační T lymfocyty (T_{regs}) jsou relativně rezistentní vůči radioterapii. Jejich odpověď na radioterapii je snížený potenciál apoptózy a vyšší proliferace *in vivo* (Chaudhary a Elkord, 2016).

2.1.4.1.4 Hormonální terapie

V 19. století bylo objeveno, že progresse některých nádorových onemocnění je spojena s produkcí určitých hormonů. V hormonální terapii se tak využívá řada inhibitorů, analogů hormonů a hormonů, které mají antagonistický účinek (Klener, 2006).

2.1.4.2 Imunoterapie

Klasickými metodami léčení nádorů jsou chirurgická léčba, chemoterapie a radioterapie. Tyto metody ale nejsou bohužel specifické. Poškozují zdravou tkáň a snižují odpověď imunitního systému, který je účinkem chemoterapie a radioterapie také zasažen (Smith a kol., 2014).

Imunoterapie představuje odlišný způsob léčby nádorových onemocnění. Nezaměřuje se na samotný nádor, ale na **imunitní systém** hostitele (Couzin-Frankel, 2013). Využívá síly a specifčnosti imunitního systému pro léčbu nádorových onemocnění. Pokroky v buněčné a molekulární imunologii umožňují nahlédnout do podstaty interakcí mezi nádorovými buňkami a buňkami imunitního systému, a tím se podílí na hledání vhodných imunoterapií pro léčbu malignit (Blattman a Greenberg, 2004).

V současné době existuje velké množství účinných imunoterapií a každý rok se objevují nové. Ačkoliv některé imunoterapie nemají schopnost redukovat velikost nádoru, tak spousta z nich významně zvyšuje medián přežití (Smith a kol., 2014).

2.1.4.2.1 Klasifikace

Aktivní imunoterapie zahrnuje nádorové **vakcíny** (vakcíny využívající dendritické buňky, proteinové, peptidové, DNA/RNA vakcíny a další) a **checkpointové inhibiční molekuly**. Vakcíny nepřímo zasahují nádorové buňky prostřednictvím aktivace imunitního systému, jehož buňky se poté podílí na likvidaci nádoru (Yamaguchi, 2016).

Adoptivní imunoterapie využívá molekul nebo buněk, které přímo atakují nádorové buňky s cílem odstranění nádoru. Adoptivní imunoterapie využívá **protinádorové protilátky**, **lymfocyty** a **cytokiny** (Yamaguchi, 2016).

2.1.4.2.2 Příklady imunoterapií

Níže je zmíněno několik příkladů imunoterapií.

Imunoterapie založená na protilátkách

První schválenou monoklonální protilátkou v roce 1997 byl **rituximab** (Smith a kol., 2014), který se používá pro léčbu B lymfomu (Pescovitz, 2006). Tato monoklonální protilátka se váže na antigen CD20 a umožňuje depleci B buněk prostřednictvím ADCC (*antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*), indukce apoptózy a komplementem zprostředkované cytotoxicity (Pescovitz, 2006).

Protinádorová účinnost monoklonálních protilátek může být zesílena pomocí připojení radioizotopů, léčiv nebo tvorbou bispecifických rekombinantních protilátek, které se současně váží na nádorové buňky a aktivují receptory na efektorových buňkách (Blattman a Greenberg, 2004).

Imunoterapie založená na použití onkolytických virů

Viry přirozeně vyvolávají silnou imunitní odpověď. Důvodem je jejich okamžité rozpoznání jako cizí prostřednictvím PRR receptorů (Smith a kol., 2014). Onkolytické viry se staly jednou z možných nadějí pro léčbu nádorů poté, co se zjistilo, že málo nebo nepatogenní viry vyvolají infekci, která někdy může vést k poklesu růstu nádoru. Důvodem je zlyzování nádorových buněk a uvolnění jejich antigenů, které mohou vybudit imunitní systém bojující proti nádoru (Hořejší a kol., 2017).

Imunoterapie založená na modifikaci buněk

Pro nádorovou imunoterapii mohou být využity *in vitro* modifikované NK a T buňky. Tyto buňky často obsahují protilátku a signální oblast, která je schopna NK a T buňky aktivovat po jejich setkání s buňkou nádorovou (Hořejší a kol., 2017).

Imunoterapie založená na využití tumor infiltruujících lymfocytů

Tumor infiltruující lymfocyty (TIL) jsou lymfocyty, které se nalézají uvnitř nádoru. TIL lymfocyty ale nejsou účinné v likvidaci nádorových buněk zejména díky přítomnosti T_{regs} v nádoru a nízkému množství protinádorových buněk. U TIL terapie jsou TIL lymfocyty

odstraněny z nádoru (Smith, 2014), namnoženy, v případě potřeby modifikovány a vráceny zpět do jedince (Hořejší a kol., 2017). Léčba pomocí TIL terapie je považována za jednu z nejúčinnějších forem imunoterapie (Smith a kol., 2014).

Imunoterapie založená na využití kmenových buněk

Pluripotentní charakter umožňuje kmenovým buňkám se stát prakticky jakýmkoliv typem buňky. Některé imunoterapie se zaměřují na využití této jejich schopnosti. Existují zprávy o úspěšné indukci pluripotentních kmenových buněk na antigen specifické T buňky, které mohou rozpoznat epitop antigenu melanomu MART-1 (Smith a kol., 2014).

Imunoterapie využívající nanomedicíny

Nanomedicína, která se objevila již v roce 1995, může poskytnout efektivní zacílení nádoru. Dvojitá opouzdření chemoterapeutické látky umožňuje zacílit více než jeden charakteristický znak nádoru (Kydd a kol., 2017). Antigeny a cytokiny, které jsou přítomny na zlatých nanočásticích jsou chráněny před degradací (Smith a kol., 2014). Současné studie se zaměřují na tvorbu cílených nanočástic vůči tumorovému mikroprostředí nebo samotným nádorovým buňkám (Kydd a kol., 2017).

Imunoterapie využívající blokování inhibičních checkpointových molekul

Protinádorová terapie zaměřená proti negativním checkpointovým molekulám je hlavní součástí léčby některých malignit (Postow a kol., 2015). Blokování checkpointových molekul pomocí antagonistických monoklonálních protilátek ruší negativní signály, které snižují aktivaci T buněk nebo inhibují aktivitu efektorových T buněk v místě nádoru. Negativní signály přenášené k T buňkám vznikají interakcí CTLA-4 a PD-1 s jejich ligandy (Emens a Middleton, 2015).

CTLA-4 se váže ke koreceptorům CD80 (B7-1) a CD86 (B7-2), které se nachází na povrchu APC. **PD-1** se váže k ligandům PD-L1 (B7-H1) a PD-L2 (B7-DC), které jsou přítomny na APC, stromálních buňkách v místě nádoru a na samotných nádorových buňkách (Emens a Middleton, 2015).

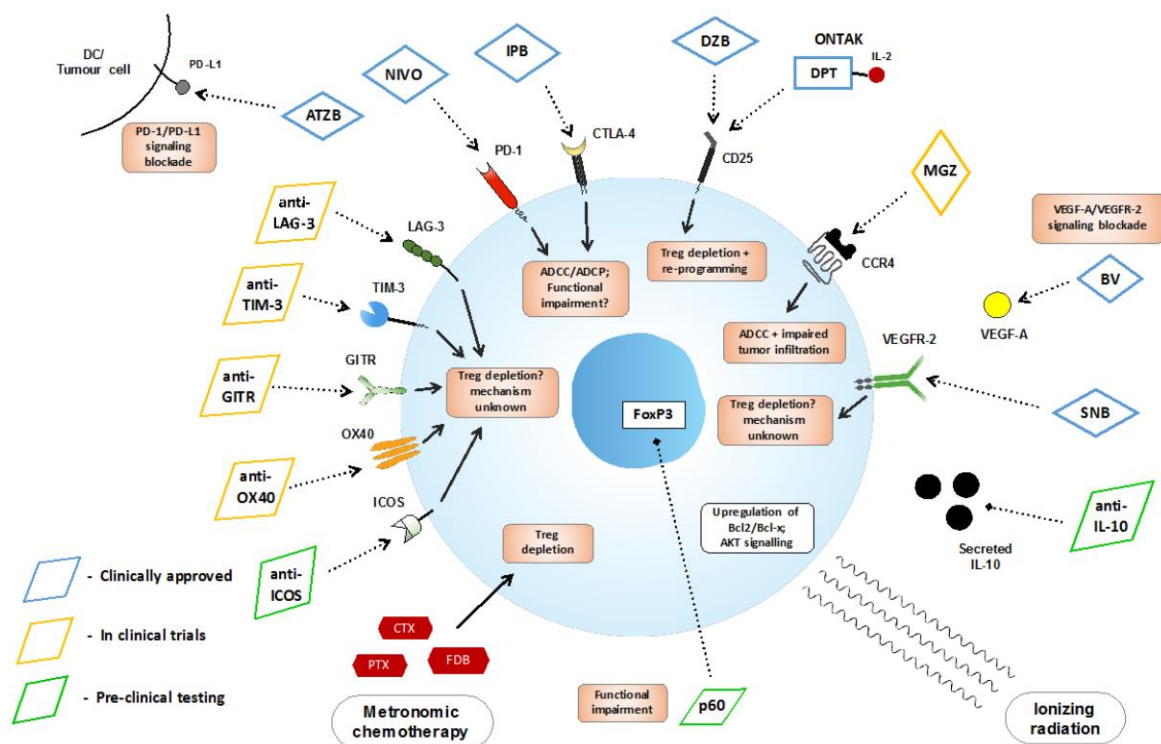
Ipilimumab je lidská monoklonální protilátka IgG₁, která blokuje CTLA-4 signál a je schválena pro léčbu pokročilého melanomu. **Pembrolizumab a nivolumab** jsou lidské monoklonální protilátky IgG₄ blokující PD-1 signál (Emens a Middleton, 2015).

Přesný mechanismus působení inhibitorů checkpointových molekul není plně znám. Tyto inhibitory checkpointových molekul mají pravděpodobně také vliv na depleci a narušení funkce T_{regs}. Ukázalo se totiž, že tumor infiltrující T_{regs} (TI T_{regs}) up-regulují expresi řady checkpointových molekul jako například CTLA-4, PD-1, LAG-3, TIM-3 a GITR (Chaudhary a Elkord, 2016). Více informací o TI T_{regs} v kapitole 2.1.6.1.

2.1.4.2.3 Regulační T lymfocyty a imunoterapie

T_{regs} jsou slibným terapeutickým cílem (Chaudhary a Elkord, 2016). Exprimují řadu povrchových molekul, které mohou být specificky zacíleny protilátkami nebo farmakologickými inhibitory (Whiteside, 2015). Řada výzkumů se tak snaží najít cestu, jak depletovat T_{regs} nebo narušit jejich supresivní funkce (viz Obr. 3). Porozumění mechanismů T_{regs} v nádorovém mikroprostředí (TME) je důležité pro vytvoření cílených imunoterapií. Bylo například zjištěno, že systémová deplece Foxp3⁺ T_{regs} může vést k nepříznivým událostem v imunitním systému (Chaudhary a Elkord, 2016).

V současné době je velký zájem o vývoj terapií cílící T_{regs} v kombinaci s checkpointovou bloádou, tumorově specifickými vakcínami, radioterapií a chemoterapií. Důležité je vytvořit takovou terapii, která narušuje funkci TI T_{regs}, ale neovlivňuje periferní homeostázu imunitního systému (Liu a kol., 2016).



Obr.3: Přehled schválených a experimentálních terapií zaměřujících se na T_{regs} (Převzato z Chaudhary a Elkord, 2016).

Zkratky: ADCC – antibody-dependent cell mediated cytotoxicity, ADPC – antibody-dependent cellular phagocytosis, ATZB – atezolizumab, BV – bevacizumab, CTX – cyclophosphamide, CCR4 – C-C motif, DC – dendritická buňka, DZB – daclizumab, DPT – diphtheria toxin, FDB – fludarabine, IPB – ipilimumab, MGZ – mogamulizumab, NIVO – nivolumab, ONTAK – denileukin difitox, PTX – paclitaxel, SNB – sunitinib (Chaudhary a Elkord, 2016).

Metronomická chemoterapie je chemoterapie založená na podávání nižších dávek chemoterapeutik po delší dobu. Bylo zjištěno, že určitá léčiva podávaná za nižších dávek po delší dobu, dosahují širšího spektra imunostimulačních účinků (Liu a kol., 2016).

Níže je zmíněno několik obecných informací o pankreatickém adenokarcinomu, který byl v praktické části této bakalářské práce použit.

2.1.5 Pankreatický adenokarcinom

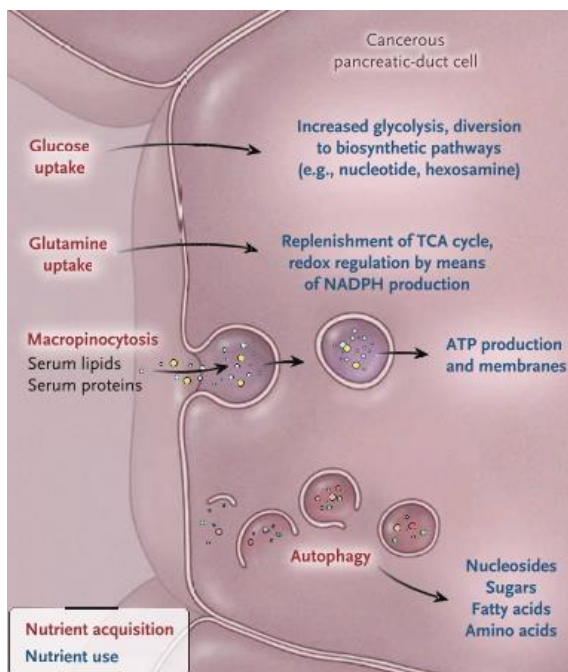
Pankreatický adenokarcinom se řadí mezi závažné nádorové onemocnění, na které umírá velké množství lidí. Přibližně 90 % pacientů na rakovinu slinivky břišní zemře a přitom 70 % z nich umírá v důsledku existence metastáz. Důvodem tak vysoké úmrtnosti je **odolnost** pankreatického adenokarcinomu vůči jakékoliv terapii a také pozdní diagnostika. Pankreatický adenokarcinom se většinou u pacientů odhalí až v pokročilém stádiu (Ryan a kol., 2014).

2.1.5.1 Obecná charakteristika

U 60 až 70 % případů je rakovina slinivky břišní lokalizována na hlavě slinivky, 20-25 % na těle a ocasu. **Symptomy** jsou závislé na umístění nádoru. Pacienti s rakovinou slinivky břišní trpí často bolestí břicha, úbytkem váhy, slabostí a anorexií. Žloutenka je také častým projevem přítomnosti nádoru v hlavě slinivky. Nejméně u 50 % pacientů dochází k rozvoji diabetu (Ryan a kol., 2014).

Genom pankreatického adenokarcinomu je charakterizován rozmanitými a rozsáhlými chromozomálními změnami. Pro pankreatický adenokarcinom je typický vyšší výskyt aktivovaných mutací v **KRAS** (>90 %), větší sklon k lokální invazi a vznik vzdálených metastáz. **Metastázy** vznikají primárně v játrech, dutině břišní a plicích. Aktivace KRAS je nezbytná pro udržení růstu pokročilého pankreatického adenokarcinomu (Ryan a kol., 2014).

Rakovina obecně má zvýšený metabolický požadavek na zásobu živin. Vzniklé hypovaskulární, fibrotické tumorové prostředí vede k extrémní hypoxii a omezené dostupnosti živin. Pankreatický adenokarcinom se tak musí potýkat s metabolickým tlakem. KRAS onkogen ale podporuje získání extracelulárních živin, zejména **glukózy** (viz Obr. 4). Buňky pankreatického adenokarcinomu jsou závislé na vysokém stupni **glykolýzy**, která produkuje energii a poskytuje metabolické intermediáty pro biosyntetické reakce. KRAS se také podílí na nasměrování sérových **lipidů** a **proteinů** prostřednictvím makropinocytózy do nádorové buňky. Nádory s KRAS mutací jsou charakterizovány vysokým stupněm **autofagie**. Jedná se o proces, kdy organely a agregáty proteinů jsou recyklovány pohlcením pomocí autofagozómů a degradovány v lysozomech (Ryan a kol., 2014).



Obr.4: Metabolické reprogramování v buňkách pankreatického adenokarcinomu (Převzato a upraveno z Ryan a kol., 2014).

2.1.5.2 Rizikové faktory

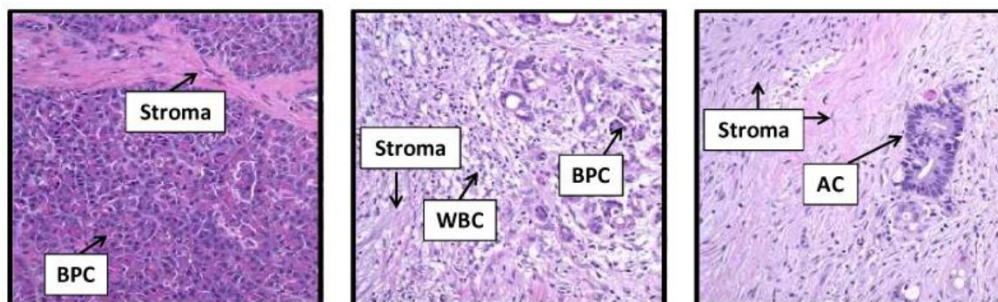
Častější výskyt pankreatického adenokarcinomu je pozorován v rozvojových zemích a u mužů. Nejčastěji se s ním můžeme setkat převážně u jedinců, kteří dosáhli věku 71 let. U osob mladších 40 let je výskyt pankreatického adenokarcinomu ojedinělý. Uvádí se, že osobám, jejichž rodinní příslušníci onemocněli rakovinou slinivky břišní hrozí větší riziko rozvinutí této nemoci. Tato genetická složka má asi 5 až 10%-ní vliv (Ryan a kol., 2014). Přehled dalších rizikových faktorů viz. Tab. I.

Tab. I: Rizikové faktory rakoviny slinivky břišní (Převzato a upraveno z Miho a kol., 2013).

Rizikový faktor	Kolikrát zvyšuje riziko
Rodinná historie: rakovina slinivky břišní genetický syndrom	1,8-13x
	2-132x
Komplikace: diabetes mellitus obezita chronická pankreatitida dědičná pankreatitida	1,8-2,1x
	3,5x
	4-8x
	53x
Další: kouření	2-3x

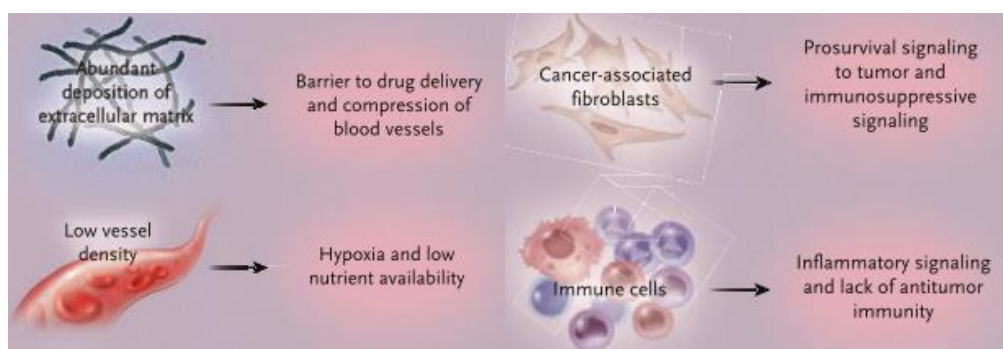
2.1.5.3 Mikroprostředí pankreatického adenokarcinomu

Mikroprostředí pankreatického adenokarcinomu (viz Obr. 5,6) má důležitou úlohu v růstu nádoru a terapeutické odpovědi. Omezuje imunitní dohled a tvoří zánětlivý program, který podporuje tumorogenezi prostřednictvím komunikace nádorových buněk a buněk imunitního systému. Mikroprostředí je charakterizováno hustým stromatem, které se skládá například z proliferujících myofibroblastů (Ryan a kol., 2014), mezenchymálních a epitelálních stromálních buněk (D. Xie a K. Xie, 2015). Dále obsahuje kolagen typu I, hyaluronovou kyselinu, komponenty extracelulární matrix a rozličné druhy zánětlivých buněk jako například makrofágy, žírné buňky, lymfocyty a plazmatické buňky. Buňky stromatu se mohou podílet na podpoření, nebo potlačení růstu nádorů a metastázování (D. Xie a K. Xie, 2015). Bylo zjištěno, že zredukování myofibroblastů zrychluje tumorogenezi a vede k agresivním histologickým znakům (Ryan a kol., 2014).



Obr.5: Histologické obrázky benigní slinivky břišní, pankreatitidy a adenokarcinomu (zleva doprava) (Převzato z Wilson a kol., 2009).

Zkratky: AC – buňky adenokarcinomu se zvětšeným jádrem, WBC – bílá krvinka, BPC – benigní pankreatická buňka (Wilson a kol., 2009).



Obr.6: Biologická charakteristika mikroprostředí pankreatického adenokarcinomu (Převzato a upraveno z Ryan a kol., 2014).

2.1.5.4 Nádorová linie Panc02

Nádorová linie Panc02 byla poprvé indukována Corbettem a jeho kolegy aplikací 3-metylcholantrenu do slinivky břišní C57BL/6 myšního kmene. V současné době je jednou z nejvyužívanějších nádorových buněčných linií (Partecke a kol., 2011). Pro Panc02 nádorovou linii je charakteristická odolnost vůči jakémukoliv protinádorovému zásahu (Priebe a kol., 1992), agresivní a invazivní chování spojené s krátkým přežitím (Partecke a kol., 2011). Z těchto důvodů byla nádorová linie Panc02 použita v této bakalářské práci.

Tato bakalářská práce se zaměřuje na shrnutí současných poznatků o regulačních T lymfocytech, které jsou zmíněny níže.

2.1.6 Regulační T lymfocyty a nádorová onemocnění

Regulační T lymfocyty (T_{regs}) u nádorových onemocnění potlačují protinádorovou imunitní odpověď a přispívají k rozvoji imunosupresivního tumorového mikroprostředí (TME). Větší podíl T_{regs} : efektorové T buňky (T_{eff}) v tkáni tumoru představuje **horší prognózy** u řady nádorových onemocnění (rakovina vaječníku, duktální pankreatický adenokarcinom, rakovina plic, Non-Hodgkinův lymfom a melanom). Infiltrace a akumulace T_{regs} může naopak u některých malignit (kolorektální karcinom a karcinom žaludku) korelovat s pozitivní prognózou. U těchto nádorových onemocnění mají T_{regs} **ochrannou úlohu** (Chaudhary a Elkord, 2016). Bylo zjištěno, že indukované regulační T lymfocyty (iT_{regs}) jsou schopné down-regulovat nadměrnou zánětlivou reakci u nádorových onemocnění, pro které jsou typické zánětlivé infiltráty. Tím chrání jedince před poškozením tkáně a růstem nádoru (Whiteside, 2014). Více informací o iT_{regs} v kapitole 2.6.

Různý dopad T_{regs} u odlišných nádorových onemocnění je dán typem tohoto nádorového onemocnění, stádiem, lokalizací a jedinečným TME u každého nádorového onemocnění (Chaudhary a Elkord, 2016). **TME** je tvořeno heterogenní populací buněk. Kromě T_{regs} obsahuje také například $CD4^+$ T buňky, $CD8^+$ T buňky, B buňky, makrofágy, DC buňky, NK buňky a žírné buňky. Zastoupení a fenotyp těchto buněk se liší v závislosti na nádoru. Fenotyp těchto buněk se může také lišit i mezi pacienty se stejným typem nádoru (Liu a kol., 2016).

T_{regs} jsou rekrutovány do místa nádoru prostřednictvím **chemokinů**, které jsou sekretovány nádorovými buňkami a buňkami vrozeného imunitního systému. V místě nádoru jsou aktivovány tumor asociovanými antigeny (TAA). Aktivované tumor infiltruující T_{regs} (**TI T_{regs}**) poté down-regulují protinádorovou aktivitu T_H1 buněk, cytotoxických T lymfocytů (CTL), NK a DC buněk. Mezi důležité interakce chemokin a chemokinový receptor patří: CCL17/22-CCR4, CCL5-CCR5, CCL28-CCR10, CXCL9/10/11-CXCR3 (Chaudhary a Elkord, 2016). **CCL17/22-CCR4** je pravděpodobně jedna z hlavních interakcí, která je zodpovědná za migraci T_{regs} do nádoru. Nádorové a myeloidní buňky jsou primárním zdrojem CCL22 a CCL17. CCL22 a CCL17 se váží k chemokinovému receptoru CCR4, který je exprimován na T_{regs}. Bylo zjištěno, že **CCL5/CCR5** interakce je zapojena do migrace T_{regs} u myši s rakovinou slinivky břišní (Liu a kol., 2016).

Preklinické myší modely ukazují, že přítomnost T_{regs} je také důležitá pro tvorbu **metastáz**. Infiltrace metastáz T_{regs} buňkami je často spojena s horšími výsledky. Předpokládá se, že T_{regs} zde mají podobnou roli jako v TME. Pravděpodobně podporují imunitní toleranci a únik před imunitním systémem (Chaudhary a Elkord, 2016).

2.1.6.1 Tumor infiltruující regulační T lymfocyty

Předpokládá se, že se tumor infiltruující T_{regs} (TI T_{regs}) liší od periferních T_{regs} (Liu a kol, 2016). Pro TI T_{regs} je charakteristická větší supresivní aktivita než pro T_{regs} izolované z periferní krve a zdravé tkáně. Příčinnou je pravděpodobně jejich zvýšená aktivace v TME (Chaudhary a Elkord, 2016). Jedna ze studií předpokládá, že T_{regs} vstupují do buněčného cyklu mnohem rychleji než konvenční T buňky v počátcích tvorby nádorů (Liu a kol., 2016).

Pro TI T_{regs} je často charakteristická up-regulace **CD44** (marker paměťových a aktivovaných T buněk), down-regulace **CD62L** a **CCR7** (markery naivních T buněk). Na myších modelech bylo dokázáno, že TI T_{regs} také exprimují vysoké hladiny molekul **Helios** a **Neuropilin-1**. Dále exprimují vysoké hladiny molekul, které jsou zodpovědné za jejich lepší supresivní funkce, jsou jimi například **ICOS**, **CD39** a **TIM-3** (Liu a kol., 2016), **CTLA-4**, **PD-1** a **LAG-3** (Chaudhary a Elkord, 2016). **CTLA-4** podporuje supresi T buněk tím, že se přednostně váže na CD80/86 signální molekuly. Dochází tím tak k zablokování CD28 kostimulačního signálu, který je potřebný pro aktivaci T buněk. **LAG-3**, **TIM-3** a **PD-1** jsou

inhibičními receptory, které negativně regulují funkci Teff buněk a CD8⁺ cytotoxických lymfocytů. Podporují také tvorbu a funkci T_{regs} (Chaudhary a Elkord, 2016).

2.2 Regulační T lymfocyty a zánětlivé prostředí

Důvodem pro vyhledání informací o zánětu a úloze T_{regs} v zánětlivém prostředí, bylo použití terapie R-848+poly (I:C)+LTA+manan-BAM v obou experimentech. Tato terapie je založena na vyvolání akutního zánětu v místě nádoru.

2.2.1 Zánět

Zánět představuje sled dějů, které reagují na rozličné antigeny vyvolávající infekci nebo na zranění vzniklá v důsledku fyzikálních a chemických podnětů. Zánět se tak podílí na obnovení integrity organismu (Hořejší a kol., 2017).

Již ve starověkém Egyptě a Řecku došlo k objevení a pochopení zánětlivých mechanismů. Aulus Cornelius Celsus charakterizoval 4 hlavní znaky zánětu – **bolest, otok, zvýšení teploty a zarudnutí**. V roce 1871 zavedl Virchow pátý znak zánětu **functio laesa** (ztráta funkce). Mečnikov jako první dokázal, že přítomnost cizí látky způsobila migraci buněk hostitele do místa poškození a fagocytózu, které vedly k zničení této cizorodé látky (Korniluk a kol., 2017).

Vniknutí patogenu aktivuje zánětlivé buňky, makrofágy a žírné buňky, které produkují a uvolňují cytokiny a prozánětlivé chemokiny, které spolu s bakteriálními toxiny mají vliv na přísun cirkulujících leukocytů do místa zánětu. V případě, že nejsou zánětlivé buňky schopny eliminovat patogen, tak dochází k přeměně **akutního zánětu** na **zánět chronický**. Tato chronická fáze je charakterizována hyperintenzivní infiltrací poškozené tkáně leukocyty, což vede k tvorbě leukocytových infiltrátů. Tyto infiltráty byly poprvé popsány již Virchowem a odrážely počátek vývoje nádoru v místě chronického zánětu (Korniluk a kol., 2017).

Na jedné straně může zánět pomáhat kancerogenezi, maligní transformaci, růstu nádoru, invazi a metastazování. Na druhé straně může zánět naopak stimulovat efektorové mechanismy imunitního systému, které mohou potlačovat růst nádoru. Propojení mezi kancerogenezi a zánětem je zprostředkováno prostřednictvím vnější a vnitřní cesty. **Vnitřní cesta** je aktivována genetickými změnami, které způsobují zánět a neoplasii. Transformované

buňky poté sekretují zánětlivé mediátory a tím tvoří zánětlivé mikroprostředí. **Vnější cesta** je řízena zánětem nebo infekcí, které zvyšují riziko vývoje nádoru v orgánech jako prostata, slinivka břišní, střeva, plíce a kůže. Obě cesty vedou k aktivaci transkripčních faktorů jako je **NF-κB**, **STAT-3** a **HIF-1**. Jejich aktivace vede k tvorbě prozánětlivých faktorů, kterými jsou chemokiny a cytokiny, které rekrutují a aktivují rozličné populace leukocytů jako jsou například makrofágy, žírné buňky, eozinofily a neutrofilů do tumorového mikroprostředí (Multhoff a kol., 2012).

2.2.1.1 Akutní zánět

Akutnímu zánětu se také někdy přezdívá terapeutický zánět z důvodu jeho **protinádorového účinku**. Zjištění dvojí role zánětu ve vývoji nádoru bylo pozorováno v Německu v 19. století. Bylo popsáno několik případů, kdy infekce streptokokem měla vliv na regresi neoplastických onemocnění. O 20 let později Coley vytvořil toxin, který byl tvořen suspenzí buněk gramnegativních bakterií, kterou podal pacientům s nádorovým onemocněním. Tato suspenze vyvolala aktivaci imunitního systému, který neútočil pouze proti bakterii, ale také se podílel na inhibici nádorového růstu (Korniluk a kol., 2017).

V současné době je vyvolání akutního zánětu využíváno v některých terapiích (například rakoviny močového měchýře). Důležité je také zmínit, že patogen se snaží vyhnout odpovědi imunitního systému, což může vést k chronickému stavu, který naopak neoplastická onemocnění doprovází (Korniluk a kol., 2017).

2.2.1.2 Chronický zánět

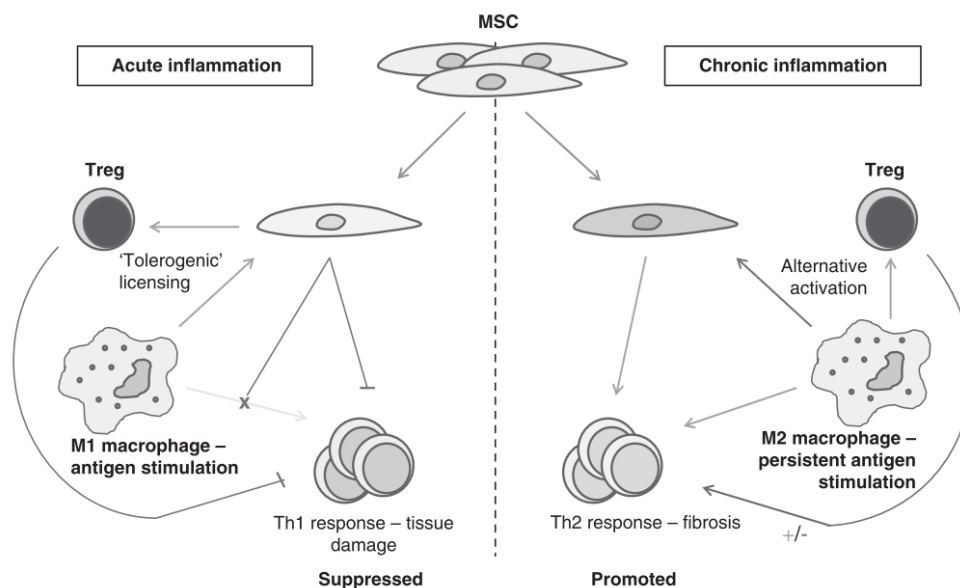
Chronický zánět je někdy označován jako patologický zánět, který se účastní **neoplastické transformace** a **stimulace růstu nádorů**. Již v roce 1828 byl zaznamenán důkaz účasti chronického zánětu ve vývoji nádoru. Přibližně okolo 25 % nádorových onemocnění je spojeno s chronickým zánětem. Rakovina slinivky břišní a prostaty často vzniká v důsledku chronickém zánětu právě v těchto orgánech (Korniluk a kol., 2017). Chronický zánět je také jednou z charakteristik nádorových onemocnění, jejichž autory jsou Hanahan a Weinberg, 2011. Řada studií prokázala, že kromě schopnosti zánětu zvýšit riziko rakoviny, tak také podporuje progresi nádoru a tvorbu metastáz (Multhoff a kol., 2012).

2.2.2 Úloha regulačních T lymfocytů v zánětlivém prostředí

Kromě **pronádorového** účinku T_{regs} potlačujících protinádorovou imunitní odpověď, byl za určitých podmínek zaznamenán také jejich **protinádorový účinek**, kdy byly schopny potlačit zánět doprovázející nádorové onemocnění (Grivennikov a kol., 2010). Dvojitá role T_{regs} u nádorových onemocnění a jejich diverzita zůstává bohužel stále blíže nepochopena. Kromě potlačení zánětu asociovaného s nádorovým onemocněním, jsou T_{regs} také pravděpodobně nezbytné pro regulaci chronického zánětu a zabránění tkáňového poškození. (Whiteside, 2015). T_{regs} jsou schopny v případě potřeby expandovat do místa tkáňového poškození. **Oprava tkáně** je zprostředkována prostřednictvím suprese produkce prozánětlivých chemokinů, aktivace endoteliálních buněk a prozánětlivé odpovědi buněk vrozeného a získaného imunitního systému (Arpaia a kol., 2015).

Předpokládá se, že T_{regs} vystavené zánětlivým podmínkám získávají větší supresivní funkci. Prodělávají řadu funkčních, transkripčních a epigenetických změn v odpovědi na zánět (Van der Veeken a kol., 2016). Bylo také zjištěno, že v zánětlivém prostředí může malá subpopulace T_{reg} buněk ztratit expresi a/nebo funkci transkripčního faktoru Foxp3 a fungovat tak jako efektorové T buňky zvané **Th17**, které produkují zánětlivé cytokiny (Li a Zheng, 2015). Pravděpodobné je, že zánětlivé prostředí upřednostňuje konverzi T_{regs} na efektorové T buňky, a to zejména v přítomnosti vysokých hladin IL-6 (Littman a Rudensky, 2010).

V předchozích letech byl velký zájem věnován interakci mezenchymálních stromálních buněk s T_{regs} (viz Obr.7). V souvislosti s akutním zánětem bylo zjištěno, že mezenchymální stromální buňky jsou schopny potlačit buňky imunitního systému zodpovědné za tkáňové poškození. Předpokládá se, že tato suprese může být uskutečněna přímo nebo prostřednictvím T_{regs} . U chronického zánětu dochází k indukci a aktivaci T_{regs} makrofágy, které tak pravděpodobně inhibují, nebo podporují fibrózu tkáně v závislosti na cytokinovém prostředí (Burr a kol., 2013).



Obr. 7: Interakce mezenchymálních stromálních buněk a T_{regs} v zánětlivém prostředí (Převzato z Burr a kol., 2013).

2.3 Historie regulačních T lymfocytů

Pojem supresorové T buňky byl zaveden na počátku 70. let 20. století (Workman a kol., 2009). Jednalo se o T buňky, které byly schopny zvyšování i tlumení imunitní odpovědi (Sakaguchi a kol., 2007). Tato myšlenka existence supresorových T buněk byla ale později zapomenuta. Důvodem byl problém s prokázáním jejich existence (Workman a kol., 2009), nenalezením vhodného markeru pro odlišení supresorových T buněk od ostatních, nejednoznačný molekulární princip suprese (Sakaguchi a kol., 2007) a problém s absencí dnes běžně používaných molekulárních a buněčných prostředků (Workman a kol., 2009).

V roce 1995 Sakaguchi spolu se svými kolegy popsal jedinečnou $CD4^+CD25^+$ T populaci (Workman a kol., 2009), která byla charakterizována neustálou expresí vysokého množství α řetězce receptoru pro interleukin 2 (CD25) (Josefowicz a kol., 2012). Za účelem vyhnutí se přetrvávajícímu skepticizmu, který stále obklopoval „supresorové“ T buňky, dostala tato subpopulace označení regulační T lymfocyty (T_{regs}). Tato představa existence specifických subpopulací buněk, které jsou schopny inhibovat a regulovat imunitní odpovědi, vyvolala obrovský zájem (Workman a kol., 2009).

V roce 2003 došlo k obrovskému posunu díky objevu transkripčního faktoru **Foxp3**, který je nezbytným regulátorem vývoje T_{regs} , jejich funkce a homeostázy. Genetické mutace

v genu kódující *Foxp3* byly identifikovány u myši i u lidí. Důležitost T_{regs} byla poprvé objasněna u pacientů s mutacemi ve *Foxp3*. U těchto pacientů došlo k rozvoji systematického autoimunitního onemocnění zvané imunitní polyendokrinopatie a enteropatie vázaná na X chromosom (**IPEX**). Toto onemocnění způsobilo zvětšení sekundárních lymfatických orgánů. Došlo také ke vzniku na inzulínu závislého diabetu, ekzémů, potravinových alergií a doprovodných infekcí. Jedinou možnou léčbou je transplantace kostní dřeně. Spontánní mutace *Foxp3* u myši známá jako **scurfy** vyvolává příznaky, které jsou velice podobné těm u pacientů s IPEX. Na základě těchto poznatků se došlo k závěru, že T_{regs} jsou velmi důležitými regulátory periferní tolerance a imunitních odpovědí (Workman a kol., 2009).

2.4 Regulační T lymfocyty

Regulační T lymfocyty (T_{regs}) jsou vysoce imunosupresivní buňky (Takeuchi a Nishikawa, 2016) produkované v thymu jako zralá subpopulace T buněk (Sakaguchi a kol., 2008). Odlišení T_{regs} od ostatních T buněk je obtížné díky nepřítomnosti markerů, které by byly specifické pouze pro T_{regs} . Mezi **markery**, které jsou charakteristické pro T_{regs} ale i také pro T buňky patří molekuly CD25, CD127, CTLA-4, LAG-3, GITR a *Foxp3* (Corthay, 2009). Fenotyp a funkční specializace T_{regs} je určena jejich lokalizací ve tkáni, aktivací, úrovní diferenciaci a stádiem onemocnění (Chaudhary a Elkord, 2016).

T_{regs} jsou podmnožinou $CD4^+$ T buněk (Qiao a kol., 2017) a představují pouze okolo 5 % těchto buněk (Whiteside, 2014). Pro T_{regs} je charakteristická exprese transkripčního faktoru **Foxp3** (Qiao a kol., 2017). Tento transkripční faktor je klíčový pro správný vývoj, zachování a funkci T_{regs} (Vignali, 2008). Kromě *Foxp3* exprimují T_{regs} **CTLA-4** a **CD25**, které jsou důležité pro řízení imunitních odpovědí, zabránění nepřiměřené zánětlivé reakci a zajištění tolerance vůči vlastním antigenům (Qiao a kol., 2017).

Mezi hlavní **funkce** T_{regs} patří zachování homeostázy (Takeuchi a Nishikawa, 2016) vrozeného i získaného imunitního systému (Lei a kol., 2015), omezení vzniku chronických zánětlivých onemocnění a udržení periferní tolerance (Vignali a kol., 2008). T_{regs} chrání zachováním homeostázy jedince před rozvojem autoimunitních chorob a alergií (Takeuchi a Nishikawa, 2016). V thymu je umožněn vývoj pouze těm T buňkám, které exprimují TCR reaktivní vůči cizím patogenům a jsou tolerantní vůči vlastním antigenům. Selektce v thymu ale není dokonalá, a tak malé množství potenciálně autoreaktivních T buněk může uniknout

do periferie, kde jejich autoreaktivní potenciál musí být utlumen mechanismy periferní tolerance. T_{regs} potlačují aktivaci těchto autoreaktivních T buněk *in vivo* (Tai a kol., 2012). Řada studií zjistila, že T_{regs} mají také schopnost zabránit odmítnutí transplantátu (Walsh a kol., 2004). Tento jejich terapeutický účinek je dobře dokumentován na zvířecích modelech (Tang a Bluestone, 2013). Bylo také zjištěno, že T_{regs} zabraňují vzniku „sterilizing imunity“ proti patogenům (Workman a kol., 2009). „Sterilizing imunity“ chrání hostitele před virovou infekcí (Dutta a kol., 2016).

Vyšší infiltraci T_{regs} je možné pozorovat u **nádorových tkání**, kde podporují růst nádoru prostřednictvím suprese protinádorové imunitní odpovědi. V nádorové tkáni se kromě T_{regs} nachází i imunosupresivní cytokiny a molekuly, které vytváří imunosupresivní síť (Takeuchi a Nishikawa, 2016). T_{regs} potlačují efektorové T lymfocyty (Teff) a antigen prezentující buňky (APC) (Hořejší a kol., 2013). Nedostatečné množství T_{regs} způsobené mutací v genu pro Foxp3 vede k rozvoji autoimunitních chorob a alergií u myši a lidí (Takeuchi a Nishikawa, 2016). Mezi tyto autoimunitní onemocnění patří například diabetes mellitus I typu (Vignali a kol., 2008).

2.4.1 Exprimované molekuly

T_{regs} jsou funkčně a fenotypově heterogenní subpopulací T buněk u myši a lidí. Nalezení spolehlivých povrchových markerů je nezbytné pro identifikaci T_{regs} a také pro odlišení jednotlivých podmnožin T_{regs} (Chen a Oppenheim, 2011).

Odlišení T_{regs} od ostatních T buněk je obtížné díky nepřítomnosti markerů, které by byly specifické pouze pro T_{regs} . Mezi markery, které jsou charakteristické pro T_{regs} ale i také pro T buňky patří molekuly **CD25**, **CD127**, **CTLA-4**, **LAG-3**, **GITR** a **Foxp3** (Corthay, 2009).

Také nT_{regs} a iT_{regs} spolu sdílejí markery, kterými jsou například **CD25**, **GITR** a **CTLA-4** (Lin, 2013). nT_{regs} na rozdíl od iT_{regs} exprimují dále i vysoké hladiny molekul **Helios**, **Neuropilin-1** (Takeuchi a Nishikawa, 2016), **CD45RO**, **CD45RA** (Chen a Oppenheim, 2011), **PD-1** a **CD73** (Lin a kol., 2013). Mezi další molekuly exprimované T_{regs} patří **CD28**, **ICOS**, **TNFR2**, **OX40**, **FAS**, chemokinový receptor **CCR4** a další (Chen a

Oppenheim, 2011). Detailnější rozdělení markerů nT_{regs} typické zvláště pro člověka a myš viz Tab. II.

Charakteristika některých molekul exprimovaných T_{regs} :

Jako první byl identifikován α řetězec pro vysoce afinitní IL-2 receptor (CD25). U molekuly **CD25** se předpokládalo, že by mohla být použita jako marker T_{regs} . Později se ale zjistilo, že je také exprimována T buňkami aktivovanými TCR ligací (Workman a kol., 2009).

Transkripční faktor **Foxp3** je výhradně exprimován u nT_{regs} a u určitých periferních iT_{regs} populací, které mají supresivní schopnost (Workman a kol., 2009). Tento transkripční faktor je vyžadován pro vývoj, zachování a supresivní funkci T_{regs} (Lourenço a Cava, 2011). Jeho exprese je také nezbytná pro diferenciaci tymocytů na T_{reg} linii (Peterson, 2012). Roncarlo a Gregori přišli s myšlenkou, že v závislosti na podmnožině buňky nebo jejím stádiu diferenciaci, může exprese Foxp3 vyvolat různé funkce u buněk, které tento transkripční faktor exprimují. Může působit jako pozitivní nebo negativní regulátor. Tento fakt souvisí s tím, že gen pro Foxp3 je často předmětem epigenetických modifikací, které pravděpodobně přispívají k různým funkcím Foxp3. Genetické mutace v genu pro Foxp3 jsou fatální u lidí i u myši. Bylo zjištěno, že NF- κ B signální dráha je klíčovým modulátorem Foxp3 exprese během vývoje nT_{regs} a TNF- α je schopen inhibovat expresi Foxp3 u nT_{regs} (Gol-Ara a kol., 2012).

CTLA-4 je zkratka pro *T lymphocyte-associated antigen 4* (Chen a Oppenheim, 2011). Jedná se o checkpointovou molekulu, která inhibuje aktivaci T buněk a jejich proliferaci. Důvodem je zachování self-tolerance a zamezení rozvoje autoimunitních reakcí (Bertrand a kol., 2015). CTLA-4 molekula je nezbytná pro funkci T_{regs} *in vivo*. Přibližně 40 % myších T_{regs} exprimuje CTLA-4. Vysoké hladiny CTLA-4 jsou také exprimovány lidskými T_{regs} (Chen a Oppenheim, 2011) a aktivovanými T buňkami (Wing a kol., 2008).

ICOS je kostimulační receptor exprimovaný většinou myších T_{regs} . Tyto T_{regs} využívají IL-10 k potlačení funkcí DC buněk a TGF- β k potlačení funkcí T buněk. T_{regs} neexprimující ICOS využívají ke své supresivní funkci pouze TGF- β (Chen a Oppenheim, 2011).

Helios je transkripční faktor, který se u lidských T_{regs} váže na promotor Foxp3 a tím zesiluje expresi Foxp3 (Elkord a kol., 2015). **Neuropilin-1** (NRP1) je transmembránový glykoprotein. U myši je NRP1 exprimován u thymu odvozených T_{regs} , u kterých zesiluje

jejich imunosupresivní funkci. U lidí je NRP1 exprimován na plazmacytoidních dendritických buňkách (pDCs) (Chaudhary a kol., 2014).

Pro většinu myších T_{regs} je také charakteristická nižší exprese **CD127** v porovnání s Teff buňkami. Hladina CD127 exprimovaná myšimi T_{regs} se liší v závislosti na jejich lokalizaci a aktivačním stavu (Chen a Oppenheim, 2011).

LAG-3 je zkratka pro *gen 3 aktivující lymfocyty* (Chen a Oppenheim, 2011). Označuje se také jako CD223 molekula a hraje důležitou roli v T_{reg} – APC interakci (Sakaguchi a kol., 2009). LAG-3 se váže na MHC II molekulu exprimovanou na nezralé DC buňce (Lourenço a Cava, 2011) s vysokou afinitou. Tímto způsobem LAG-3 znemožňuje maturaci a schopnost DC buněk aktivovat Teff buňky (Liberal a kol., 2015).

CD45RO a **CD45RA** molekuly jsou výhradně exprimovány určitými podmnožinami lidských $CD4^+$ T buněk. CD45RO je charakteristická pro klidové nT_{regs} . Molekula CD45RA je typická pro aktivované nT_{regs} (Chen a Oppenheim, 2011).

CD103 molekula je exprimována přibližně 10-30 % periferních T_{regs} u myší. Expresí CD103 není na rozdíl od exprese CD25 ukazatelem aktivačního stavu T_{regs} (Chen a Oppenheim, 2011).

GARP je povrchová buněčná molekula, která je exprimována více aktivovanými lidskými T_{regs} než Teff buňkami. Expresí této molekuly je spojena s expresí Foxp3 a supresivní schopností T_{regs} (Chen a Oppenheim, 2011).

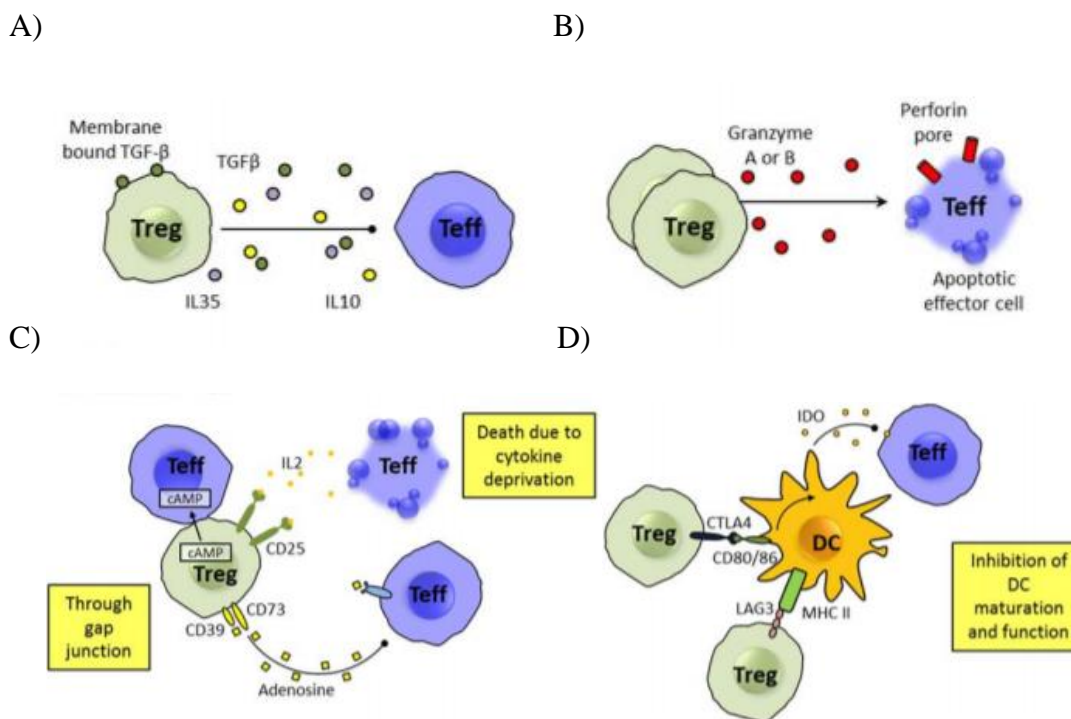
CD39 je integrální membránový protein hydrolyzující ATP a ADP. Zvýšená exprese CD39 je u některých typů nádorů (například kolorektální rakovina a rakovina slinivky břišní) a u chronických lymfatických leukémií. Molekula CD39 se pravděpodobně účastní vývoje a progresu řady malignit (Antonioli a kol., 2013).

Tab. II: Markery charakteristické pro nT_{regs} u myši a lidí (Převzato z Chen, 2011).

Markery nT _{regs}			
Myš		Člověk	
CD25 ⁺	ICOS ⁺	CD25 ^{high}	ICOS ⁺
Foxp3 ⁺	TNFR2 ⁺	Foxp3 ⁺	TNFR2 ⁺
CTLA-4 ⁺	CD39 ⁺	CTLA-4 ⁺	CD45RO ⁺
CD103 ⁺	CD103 ⁺	HLA-DR ⁺
CCR6 ⁺		CCR6 ⁺	GARP ⁺
CD127 ^{-/low}		CD127 ^{-/low}
LAG-3 ⁺		LAG-3 ⁺	

2.4.2 Mechanismy suprese

T_{regs} provádí **supresi** několika způsoby (viz Obr.8): A) suprese pomocí inhibičních cytokinů, B) suprese cytolýzou, C) suprese metabolickým narušením a D) suprese změnou zrání a funkce dendritických buněk (DC) (Vignali a kol., 2008).



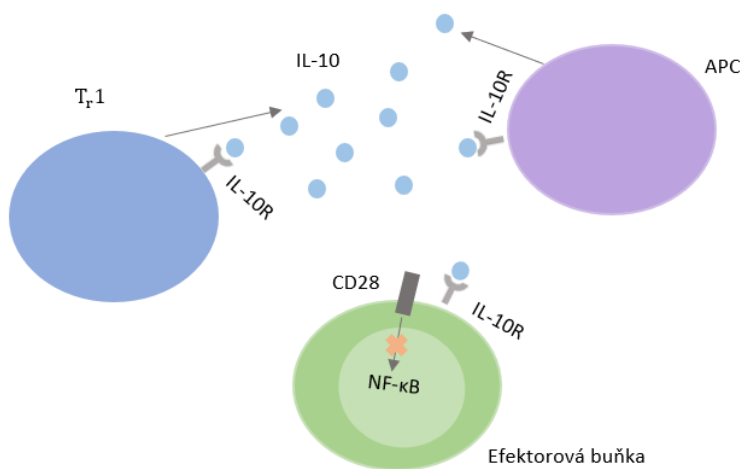
Obr. 8: Mechanismy suprese regulačních T lymfocytů (Převzato a upraveno z Liberal a kol., 2015).

Zkratky: IDO – indolamin-2,3-dioxygenáza, Teff – efektorová T buňka (Liberal a kol., 2015).

A) **IL-10** je protein o molekulové hmotnosti 18 kDa, který je produkován monocyty, DC buňkami, neutrofilly, B lymfocyty, T lymfocyty a také T_{r1} buňkami. T_{r1} buňky jsou jedinými regulačními buňkami, které IL-10 produkují (Arce-Sillas a kol., 2016).

Nejznámějším molekulárním mechanismem IL-10 je jeho imunopresivní vliv na Teff buňky. Kostimulační molekula **CD28** na Teff buňce zprostředkovává kontakt s APC. Produkovaný IL-10 se váže na svůj receptor na Teff buňce a inhibuje fosforylaci tyrosinu v molekule CD28. Dochází k inhibici signalizační kaskády vedoucí k translokaci **NF- κ B** (viz Obr.9) (Arce-Sillas a kol., 2016). NF- κ B rodina transkripčních faktorů ovlivňuje řadu biologických procesů. NF- κ B signální dráha má vliv na vývoj T buněk, jejich aktivaci, diferenciaci a přežití. Reguluje také transkripci cytokinů a expresi chemokinů, které se účastní imunitních odpovědí (Oh a Ghosh, 2013).

IL-10 u dendritických buněk a T_{r1} buněk vyvolává další produkci IL-10. IL-10 také například inhibuje produkci zánětlivých cytokinů, kterým je IL-12. Tato inhibice způsobuje snížení odpovědi T_{h1} buněk, snížení produkce INF- γ a zvýšení fagocytární aktivity, která odstraňuje zbylé části buněk z místa zánětu (Arce-Sillas a kol., 2016).



Obr.9: Mechanismus účinku IL-10.

TGF- β je protein a multifunkční cytokin, který má řadu efektů na buňky. Potlačuje diferenciaci Teff buněk, podporuje diferenciaci naivních T buněk na T_{regs} nebo T_{h17} buňky (Arce-Sillas a kol., 2016). T_{h17} buňky spouští imunitní odpověď proti extracelulárním bakteriím a houbám. Podílí se také na tvorbě autoimunitních onemocnění (Luckheeram a kol., 2012). TGF- β dále inhibuje proliferaci T a B buněk, aktivitu makrofágů, DC a NK buněk (Arce-Sillas a kol., 2016).

IL-35 je nedávno objeveným cytokinem, který je produkován T_{regs} . Jsou známy jeho dvě funkce. První je schopnost potlačovat proliferaci pomocných T buněk. Druhou funkcí je podpoření přeměny naivních T buněk na vysoce supresivní regulační T buňky (iT_{r35}). Bylo také zjištěno, že IL-35 je schopen indukovat přeměnu B lymfocytů na B regulační buňky (Arce-Sillas a kol., 2016).

B) Mezi cytolytické mechanismy patří **granzym A**, **granzym B** a **perforin** (Lourenço a Cava, 2011). **Granzym B** je serinová proteáza, která umožňuje vyvolání apoptózy u Teff buněk. Během buněčné interakce T_{reg} – efektorová buňka dochází k exocytóze granzymu B a **perforinu** z granul T_{regs} do extracelulárního prostoru. Molekuly perforinu se zabudovávají do lipidové membrány cílových buněk (efektorová buňka), kde polymerizují v přítomnosti vápenatých iontů a tvoří transmembránový válec. Každý válec tvoří pór, kterým vstupuje granzym B do cílové buňky, u které je schopný vyvolat její apoptózu (Arce-Sillas a kol., 2016). 5-30 % T_{regs} je schopno v tumorovém mikroprostředí exprimovat granzym B a potlačovat funkci NK buněk a cytotoxických lymfocytů, které proti nádoru bojují (Lourenço a Cava, 2011). **Granzym A** vyvolává cytolyzu stejným způsobem závislým na perforinu (Velaga a kol., 2015).

C) Tento typ suprese zahrnuje několik mechanismů, které vedou k metabolickému narušení Teff buněk. T_{regs} mohou soutěžit s ostatními T buňkami o **IL-2**, jakmile jsou schopny exprimovat vysoce afinitní IL-2R (CD25). Následkem toho aktivně se dělící Teff buňky trpí nedostatkem IL-2 a podstupují apoptózu (Liberal a kol., 2015).

Další supresivní mechanismus využívaný T_{regs} souvisí s expresí molekul **CD39** a **CD73**. Tyto povrchové enzymy katalyzují degradaci extracelulárních nukleotidů (například ATP). Tato degradace vede k tvorbě pericelulárního adenosinu, který potlačuje funkci Teff buněk prostřednictvím aktivace adenosinového receptoru (Liberal a kol., 2015).

D) T_{regs} mohou interagovat s dendritickými buňkami (DC) prostřednictvím **CTLA-4**. Tato molekula je charakterizována vysokou afinitou k molekulám **CD80** a **CD86** exprimovaných na DC buňkách. Interakce mezi CTLA-4 na T_{regs} a CD80/86 na DC způsobuje řadu událostí. Jednou z nich je produkce IFN- γ , který je induktorem exprese indolamin-2,3-dioxygenázy (Arce-Sillas a kol., 2016). Tento enzym katalyzuje přeměnu aminokyseliny tryptofanu na kynurenin, který je toxický pro Teff buňky nacházející se v blízkosti DC buněk

(Sakaguchi, 2009). T_{regs} také negativně ovlivňují schopnost DC buněk zahájit imunitní odpověď (Liberal a kol., 2015).

LAG-3 (CD223) hraje také důležitou roli v T_{reg} – APC interakci (Sakaguchi a kol., 2009). LAG-3 se váže na MHC II molekulu exprimovanou na nezralé DC buňce (Lourenço a Cava, 2011) s vysokou afinitou. Tímto způsobem LAG-3 znemožňuje maturaci a schopnost DC buněk aktivovat Teff buňky (Liberal, 2015).

2.4.3 Klasifikace

Regulační T lymfocyty můžeme rozdělit do dvou skupin (Onishi a kol., 2016). Toto rozdělení je na základě jejich místa vývoje (Workman a kol., 2009). První skupinou jsou **přirozené regulační T lymfocyty** (nT_{regs}) (Onishi a kol., 2016), které se vyvíjí v thymu (Workman a kol., 2009) ze self-reaktivních tymocytů (Takeuchi, 2016). Jedná se o tymocyty, které exprimují TCR receptory se zvýšenou afinitou ke komplexu self-peptid-MHC. nT_{regs} ($CD4^+CD25^+Foxp3^+$) můžeme dále rozlišit na klidové nT_{regs} ($CD45RA^+Foxp3^{low}$) a aktivované nT_{regs} ($CD45RO^+Foxp3^{high}$) (Peterson, 2012). nT_{regs} jsou zásadní pro zachování self-tolerance a zabránění rozvoji autoimunity. Druhou skupinou jsou **indukované T lymfocyty** (iT_{regs}), které se diferencují z naivních $CD4^+$ T buněk suboptimální prezentací antigenu v periférii (Chaudhary a Elkord, 2016). Indukované T_{regs} můžeme rozdělit na T_{r1} ($CD4^+CD25^{low}Foxp3^-$), T_{h3} T_{regs} ($CD4^+CD25^-Foxp3^-$) (Qiao, 2017) a T_{regs} indukované IL-35 (iT_{r35}) (Onishi a kol., 2016). Úlohou iT_{regs} je zachovat periferní toleranci (Chaudhary a Elkord, 2016).

Rozdělení regulačních T lymfocytů je znázorněno v Tab. III. na základě výše uvedených informací.

Tab. III: Rozdělení regulačních T lymfocytů.

Regulační T lymfocyty vznikající z $CD4^+$ buněk				
Přirozené regulační T lymfocyty (nT_{regs}) $CD4^+CD25^+Foxp3^+$		Indukované regulační T lymfocyty (iT_{regs})		
Klidové $CD45RA^+Foxp3^{low}$	Aktivované $CD45RO^+Foxp3^{high}$	T_{r1} $CD4^+CD25^{low}Foxp3^-$	T_{h3} $CD4^+CD25^-Foxp3^-$	T_{regs} indukované IL-35

Ukázalo se, že kromě **CD4⁺** regulačních T lymfocytů existuje ještě další důležitá podmnožina **T_{regs}**, kterou jsou **CD8⁺** supresorové buňky (**CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺** T buňky). Tato populace buněk byla nalezena u myši i lidí (Churlaud a kol., 2015).

2.5 Přirozené regulační T lymfocyty

Přirozené regulační T lymfocyty (**nT_{regs}**) jsou **CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺** T buňky vznikající v thymu v časných stádiích fetálního vývoje (14. týden vývoje) (Peterson, 2012). **nT_{regs}** se diferencují ze self-reaktivních tymocytů (Takeuchi a Nishikawa, 2016). Jedná se o tymocyty, které exprimují TCR se zvýšenou afinitou ke komplexu self-peptid-MHC (Peterson, 2012). **nT_{regs}** tvoří 5-10 % populace **CD4⁺** T buněk u myši a 1-2 % populace **CD4⁺** T buněk u lidí (Lourenço a Cava, 2011). Fenotyp **nT_{regs}** je díky expresi molekul **CD25** a **CTLA-4** velice podobný aktivovaným T lymfocytům (Hořejší a kol., 2013).

nT_{regs} jsou důležité pro inhibici efektorových buněk během infekce a v nádorech. Mají schopnost suprimovat následující buňky: **CD4⁺** T buňky, **CD8⁺** T buňky, dendritické buňky, NKT buňky, NK buňky, monocyty/makrofágy, B buňky, žírné buňky, bazofily, eozinofily a osteoblasty a další (Peterson, 2012). **nT_{regs}** jsou také zásadní pro zachování self-tolerance a zabránění rozvoje autoimunity (Chaudhary a Elkord, 2016). Je také dokázáno, že **nT_{regs}** mohou přenést svoje supresivní vlastnosti na T lymfocyty v kultuře. Přenos těchto supresivních vlastností je zprostředkován faktory jako **IL-10** a **TGF-β** (Gol-Ara a kol., 2012).

2.5.1 Rozdělení

nT_{regs} můžeme rozlišit na klidové **nT_{regs}** (**CD45RA⁺Foxp3^{low}**) a aktivované **nT_{regs}** (**CD45RO⁺Foxp3^{high}**) (Peterson, 2012). Lidské **CD4⁺CD25⁺** **T_{regs}** mohou být dále také rozděleny na základě exprese určitého integrinu. **CD4⁺CD25⁺** **T_{regs}** exprimující **α₄β₇** integrin konvertují **CD4⁺** T buňky na **T_r1** buňky produkující **IL-10**. **CD4⁺CD25⁺** **T_{regs}** exprimující integrin **α₄β₁** přeměňují **CD4⁺** T buňky na **T_h3** buňky produkující **TGF-β** (Jonuleit a Schmitt, 2003). **T_r1** a **T_h3** buňky jsou podmnožinou indukovaných **T_{regs}** (**iT_{regs}**) (Workman a kol., 2009). Více informací o **iT_{regs}** v kapitole 2.6.

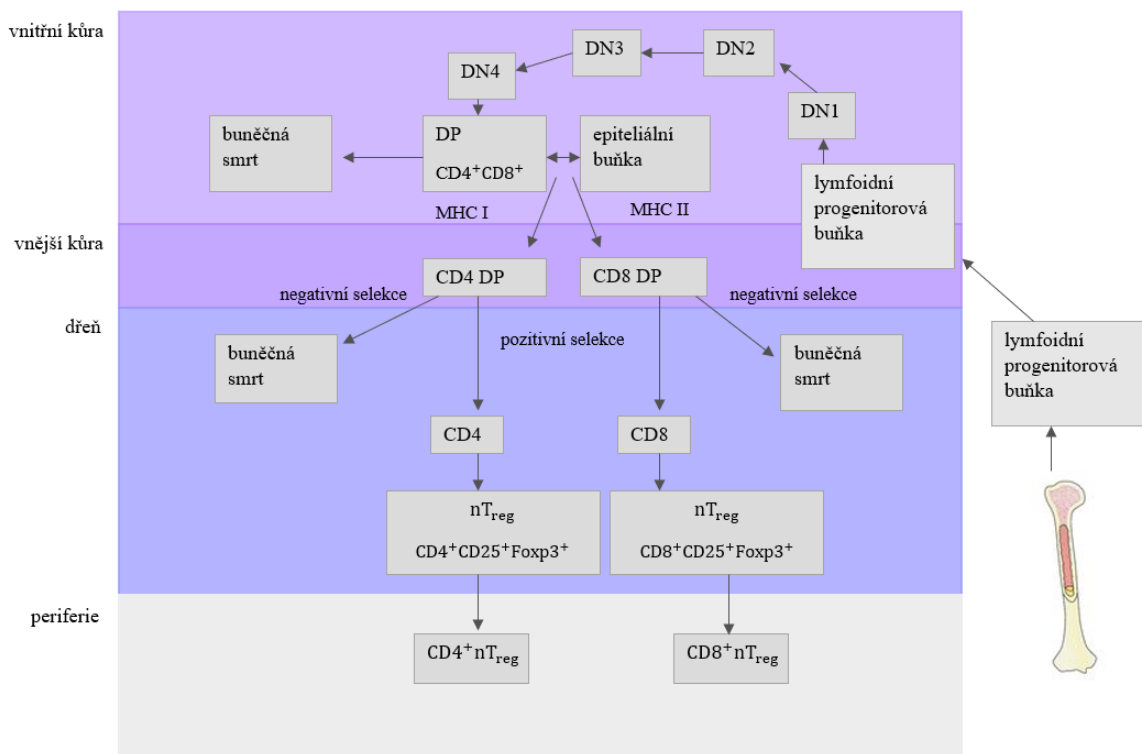
2.5.2 Vývoj

nT_{regs} se diferencují z tymocytů, které exprimují TCR se zvýšenou afinitou ke komplexu self-peptid-MHC (Peterson, 2012).

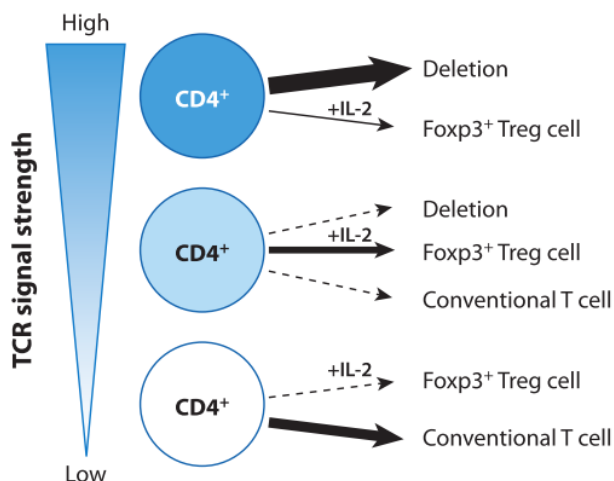
Vývoj T buněk v thymu (tymocytů) zahrnuje několik dějů (viz Obr. 10). Nejprve dochází ke vstupu **lymfoidní progenitorové buňky** do thymu (Takahama, 2006). Tyto lymfoidní progenitorové buňky vznikají v kostní dřeni (Germain, 2002). Vstup těchto buněk do thymu není nepřetržitou událostí. Jedná se o nesouvislou a kontrolovanou událost, která se děje během embryogeneze a v dospělosti (Takahama, 2006). Časné T buňky postrádají expresi TCR, CD4 a CD8 a jsou označovány jako dvojitě negativní tymocyty (DN). Tyto **dvojitě negativní** tymocyty mohou být rozděleny do čtyř stádií diferenciace (DN1: $CD44^+CD25^-$, DN2: $CD44^+CD25^+$, DN3: $CD44^-CD25^+$, DN4: $CD44^-CD25^-$). Během vývoje těmito stádii exprimují tymocyty pre-TCR. Tento T buněčný receptor je tvořen nepřeskupeným pre-TCR α řetězcem a přeskupeným pre-TCR β řetězcem. Úspěšná pre-TCR exprese vede k buněčné proliferaci a nahrazení pre-TCR α řetězce nově přeskupeným TCR α řetězcem. Dochází tak k vytvoření $\alpha\beta$ T buněčného receptoru. $\alpha\beta$ -TCR $^+CD4^+CD8^+$ **dvojitě pozitivní** tymocyty poté interagují s epiteliálními buňkami kůry kostní dřene. **Epiteliální buňky** exprimují MHC I a MHC II molekuly asociované se self-peptidy. Osud dvojitě pozitivních tymocytů závisí na síle signálu (viz Obr.11), který je zprostředkován interakcí TCR s komplexem self-peptid-MHC. Během **pozitivní selekce** se pouze ty tymocyty, které exprimují TCR vázající se ke komplexu self-peptid-MHC I stávají $CD8^+$ buňkami. Ty tymocyty, které exprimují TCR vázající se ke komplexu self-peptid-MHC II se stávají $CD4^+$ pozitivními buňkami (Germain, 2002). Následuje **negativní selekce**, která se podílí na odstranění tymocytů, jejichž TCR se váže s vysokou afinitou ke komplexu self-peptid-MHC (Palmer, 2003). Proces negativní selekce přispívá k odstranění self-reaktivních T buněk, a tak zabránění vzniku autoimunity (Takahama, 2006). Vzniklé pozitivní buňky jsou připraveny k exportu z dřene do periferie (Germain, 2002).

nT_{regs} se diferencují z takto vzniklých $CD4^+$ T buněk. Vývoj nT_{regs} je ovlivněn ko-stimulačními molekulami, cytokiny, TCR, antigenní afinitou a konkrétním místem v thymu, kde dochází k setkání s antigenem. Pro vývoj nT_{regs} jsou důležité molekuly **IL-2** a v menší míře **TGF- β** (Workman a kol., 2009). IL-2 je nezbytný pro vývoj, funkci a homeostázu nT_{regs} (Peterson, 2012). TGF- β je vyžadován pro udržení Foxp3 exprese a supresivní funkce periferních nT_{regs} *in vivo* a *in vitro* (Workman a kol., 2009).

Komunikace mezi **stromálními buňkami thymu** a vyvíjejícími se thymocyty je velice důležitá. Poskytuje vhodné mikroprostředí, které podporuje a reguluje další vývoj thymocytů. Stromální buňky mikroprostředí thymu také produkují chemokiny, které hrají důležitou roli v nasměrování migrujících thymocytů (Takahama, 2006). Interakce mezi vyvíjejícím se thymocytom a medulárními epiteliálními buňkami thymu (**mTECs**), které exprimují **Aire**, pravděpodobně řídí vývoj thymocytů na **T_{reg}** buněčnou linii (Nomura a Sakaguchi, 2007). Aire je zkratka pro autoimunitní regulační gen, který má důležitou úlohu v expresi tkáňově specifických self-antigenů v thymu (Anderson a Su, 2011). Mutace v Aire vede ke vzniku autoimunitního onemocnění **APECED** (*autoimmune polyendocrinopathy candidiasis ectodermal dystrophy*). Defekt Aire pravděpodobně ovlivňuje negativní selekci self-reaktivních T buněk (Nomura a Sakaguchi, 2007).



Obr.10: Vývoj T lymfocytů a nT_{regs} (DN – dvojitě negativní, DP – dvojitě pozitivní).



Obr.11: Síla signálu TCR (Převzato z Josefowicz a kol., 2012).

Síla signálu TCR řídí osud $CD4^+$ tymocytů a diferenciaci regulačních T buněk. Nezralé $CD4^+$ tymocyty získávají signál rozdílné síly prostřednictvím interakce TCR s komplexem peptid-MHC na APC. Silný TCR signál u většiny $CD4^+$ tymocytů způsobuje apoptózu (programovaná buněčná smrt). Středně silný signál umožňuje $CD4^+$ buňkám uniknout delecii (Josefowicz a kol., 2012).

2.6 Indukované regulační T lymfocyty

Indukované regulační T lymfocyty (iT_{regs}) jsou periferně indukovanými regulačními T lymfocyty (Zhang a kol., 2014), které představují další podmnožinu $CD4^+$ T regulačních buněk (Jonuleit a Schmitt, 2003). iT_{regs} se diferencují z naivních $CD4^+$ T buněk suboptimální prezentací antigenu v periférii (Chaudhary a Elkord, 2016). iT_{regs} mohou být také připraveny *in vitro* izolací $CD4^+$ T buněk, které jsou následně aktivovány za přítomnosti IL-2 a TGF- β 1. Takto připravené buňky exprimují transkripční faktor Foxp3 *in vitro* (Schmitt a Williams, 2013).

Schopnost suprese iT_{regs} není na rozdíl od nT_{regs} závislá na buněčném kontaktu, ale je zprostředkována supresivními cytokiny **IL-10** a **TGF- β** (Jonuleit a Schmitt, 2003). Funkcí iT_{regs} je zachovat periferní toleranci (Chaudhary, 2016). Předpokládá se, že $CD4^+CD25^+ T_{regs}$ a buňky produkující IL-10/TGF- β (T_r1 a T_h3) úzce spolupracují, aby zabránily vzniku autoimunitních reakcí *in vivo* (Jonuleit a Schmitt, 2003). iT_{regs} představují

mocný terapeutický nástroj pro autoimunitní onemocnění, záněty a také protinádorovou léčbu (Workman a kol., 2009).

V současnosti je velká naděje vkládána do transkripčního faktoru KLF2 (*Kruppel-like factor 2*). Kromě toho, že reguluje chronický zánět a je nezbytný pro vývoj iT_{regs} (nikoliv nT_{regs}), tak by mohl být vhodným markerem (Whiteside, 2015).

Porovnání nT_{regs} a iT_{regs} viz Tab. IV.

Tab. IV: Porovnání charakteristiky nT_{regs} a iT_{regs} lymfocytů (T_r1, T_h3) (Převzato z Jonuleit a Schmitt, 2003).

	CD4 ⁺ CD25 ⁺ T _{regs}	T _r 1	T _h 3
Fenotyp:			
CD25	++	+	+
GITR	++	-	?
CTLA-4	+++	+	++
Foxp3	++	?	?
Sekrece cytokinů:			
IL-10	+/-	+++	+
TGF-β	+/-	+	+++
Diferenciační faktory	?	IL-10, IFN-α	TGF-β, IL-4
Supresivní mechanismus:			
<i>In vitro</i>	buněčný kontakt	IL-10, TGF-β	TGF-β
<i>In vivo</i>	buněčný kontakt, IL-10, TGF-β	IL-10, TGF-β	TGF-β

2.6.1 Rozdělení

Na základě cytokinů způsobující jejich indukci rozlišujeme dvě hlavní podmnožiny iT_{regs}, kterými jsou buňky typu 1 (T_r1) a pomocné T buňky typu 3 (T_h3). Tyto podmnožiny jsou tvořeny v přítomnosti odlišných cytokinů. Svoji supresivní aktivitu uskutečňují prostřednictvím sekretování stejných cytokinů, které jsou zodpovědné za jejich indukci. Těmito cytokiny jsou **IL-10** a **TGF-β** (Workman a kol., 2009). T_r1 buňky jsou charakteristické pro svoji obrovskou produkcí IL-10 a nízkou tvorbou TGF-β. T_h3 buňky naopak převážně produkují TGF-β (Jonuleit a Schmitt, 2003).

2.6.2 Regulační lymfocyty typu 1

Regulační lymfocyty typu 1 (T_r1) jsou buňkami, které produkují velké množství **IL-10** a malé množství **TGF- β** (Jonuleit a Schmitt, 2003). Dále produkují střední množství **IL-5** a nízké hladiny **IL-2** a **IFN- γ** . Od nT_{regs} se liší odlišným cytokinovým sekrečním profilem, odpovědí na antigen, supresivními mechanismy a s největší pravděpodobností i některými buněčnými markery. nT_{regs} jsou rekrutovány a aktivovány během časných imunitních odpovědí. T_r1 buňky jsou indukovány opakovanou antigenní stimulací a zasahují pravděpodobně později, aby snížily imunitní odpověď, obnovily a zachovaly toleranci. Mechanismy **suprese** T_r1 buněk nejsou založeny na buněčném kontaktu, ale jsou zprostředkovány prostřednictvím cytokinů, kterými jsou IL-10 a TGF- β (Gol-Ara a kol., 2012).

T_r1 buňky také kontrolují aktivaci paměťových a naivních T buněk *in vivo* a *in vitro*. Potlačují imunitní odpověď zprostředkovanou Th1 a Th2 buňkami vůči patogenům, nádorům a aloantigenům (Jonuleit a Schmitt, 2003).

T_r1 buňky jsou pravděpodobně schopny exprimovat některé **chemokinové receptory** na svém povrchu, které jsou běžně exprimovány Th1 (CXCR3 a CCR5) a Th2 buňkami (CCR3, CCR4 a CCR8). Za marker T_r1 buněk je považován receptor GATA 3 (**ROG**), který je ale také exprimován aktivovanými T buňkami (Gol-Ara a kol., 2012).

Transkripční faktor **Foxp3** není exprimován T_r1 buňkami neustále. Jejich aktivace vede k up-regulaci Foxp3 exprese, která dosahuje hladiny exprese tohoto transkripčního faktoru jako u aktivovaných T buněk. Toto zjištění souvisí s tím, že T_r1 buňky nepotřebují Foxp3 pro svoji supresivní funkci. Je zaznamenáno, že T_r1 mohou suprimovat konvenční T buňky nezávisle na Foxp3 expresi. Bylo dokonce prokázáno, že se T_r1 buňky mohou diferenciovat z naivních T buněk pacientů s onemocněním IPEX, kteří mají nedostatek transkripčního faktoru Foxp3 (Gol-Ara a kol., 2012).

T_r1 buňky mohou být vytvořeny *in vitro* **TCR** stimulací v přítomnosti vysokých hladin **IL-10**. Předpokládá se, že přítomnost **IFN- α** je nezbytná pro účinnou diferenciaci T_r1 buněk spolu s IL-10. Opakovaná stimulace naivních $CD4^+$ T buněk nezralými alogenními dendritickými buňkami také vede k indukci T_r1 buněk (Gol-Ara a kol., 2012).

Identifikovány byly také **CD8⁺ T_r1** buňky, které produkují IL-10 a vznikají stimulací naivních $CD8^+$ buněk aktivovanými plazmacytoidními dendritickými buňkami nebo

myeloidními dendritickými buňkami *in vitro*. Supresivní funkce těchto buněk je zprostředkována prostřednictvím IL-10 (Gol-Ara a kol., 2012).

2.6.3 Pomocné lymfocyty typu 3

Pomocné lymfocyty typu 3 (T_h3) jsou další podmnožinou iT_{regs} . Tyto buňky sekretují zejména **TGF- β** , který je důležitý pro diferenciaci těchto buněk. Prostřednictvím TGF- β také uskutečňují svoji supresivní funkci (Gol-Ara a kol., 2012).

T_h3 regulační buňky byly identifikovány během zkoumání mechanismů asociovaných s orální tolerancí. Po příjmu cizího antigenu orální cestou jsou T_h3 buňky schopny se diferencovat z naivních $CD4^+$ T buněk (Gol-Ara, 2012). **Orální tolerance** je stav, kdy imunitní systém neodpovídá na antigeny přijaté ve stravě a na antigeny mikroflóry (Dubois a kol., 2003).

T_h3 buňky mají pravděpodobně významnou roli v řadě aspektů týkajících se modulace imunitního systému a T buněčné homeostázy. T_h3 buňky poskytují pomoc při sekreci IgA a mají supresivní účinek vůči $Th1$ a $Th2$ buňkám (Gol-Ara a kol., 2012).

Exprese transkripčního faktoru **Foxp3** je sporná. Některé studie detekovaly Foxp3 u T_h3 buněk. Další studie naopak navrhuji, že T_h3 buňky neexprimují tento transkripční faktor (Gol-Ara a kol., 2012).

2.6.4 T_{regs} indukované IL-35

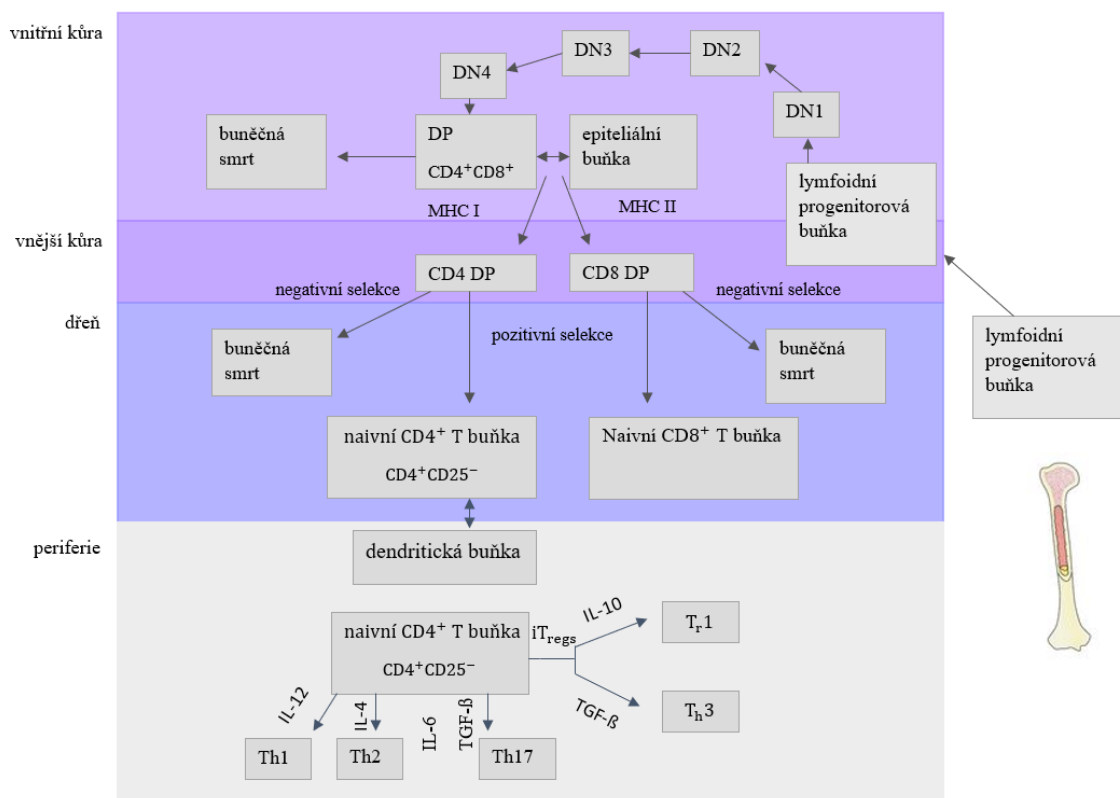
Cytokin IL-35 je schopen vyvolat přeměnu naivních T buněk u myši a lidí na populaci regulačních buněk iT_r35 , které jsou novým a jedinečným členem rodiny regulačních T lymfocytů. Tato populace buněk není schopna supresivní funkce prostřednictvím IL-10 a TGF- β , ale prostřednictvím IL-35. T_{regs} indukované IL-35 (iT_r35) neexprimují transkripční faktor Foxp3. Tyto regulační buňky jsou pravděpodobně klíčovým mediátorem infekční tolerance a také pravděpodobně přispívají k progresi nádoru (Collison a kol., 2010).

2.6.5 Vývoj

iT_{regs} se diferencují z naivních $CD4^+$ T buněk suboptimální prezentací antigenu v periférii (Chaudhary a Elkord, 2016).

Vývoj T buněk v thymu (tymocytů) zahrnuje několik dějů (viz Obr. 12). Nejprve dochází ke vstupu **lymfoidní progenitorové buňky** do thymu (Takahama, 2006). Tyto lymfoidní progenitorové buňky vznikají v kostní dřeni (Germain, 2002). Vstup těchto buněk do thymu není nepřetržitou událostí. Jedná se o nesouvislou a kontrolovanou událost, která se děje během embryogeneze a v dospělosti (Takahama, 2006). Časné T buňky postrádají expresi TCR, CD4 a CD8 a jsou označovány jako dvojitě negativní tymocyty (DN). Tyto **dvojitě negativní** tymocyty mohou být rozděleny do čtyř stádií diferenciaci (DN1: $CD44^+CD25^-$, DN2: $CD44^+CD25^+$, DN3: $CD44^-CD25^+$, DN4: $CD44^-CD25^-$). Během vývoje těmito stádii exprimují tymocyty pre-TCR. Tento T buněčný receptor je tvořen nepřeskupeným pre-TCR α řetězcem a přeskupeným pre-TCR β řetězcem. Úspěšná pre-TCR exprese vede k buněčné proliferaci a nahrazení pre-TCR α řetězce nově přeskupeným TCR α řetězcem. Dochází tak k vytvoření $\alpha\beta$ T buněčného receptoru. $\alpha\beta$ -TCR $^+CD4^+CD8^+$ **dvojitě pozitivní** tymocyty poté interagují s epiteliálními buňkami kůry kostní dřene. **Epiteliální buňky** exprimují MHC I a MHC II molekuly asociované se self-peptidy. Osud dvojitě pozitivních tymocytů závisí na síle signálu, který je zprostředkován interakcí TCR s komplexem self-peptid-MHC. Během **pozitivní selekce** se pouze ty tymocyty, které exprimují TCR vázající se ke komplexu self-peptid-MHC I se stávají $CD8^+$ buňkami. Ty tymocyty, které exprimují TCR vázající se ke komplexu self-peptid-MHC II se stávají $CD4^+$ pozitivními buňkami (Germain, 2002). Následuje **negativní selekce**, která se podílí na odstranění tymocytů, jejichž TCR se váže s vysokou afinitou ke komplexu self-peptid-MHC (Palmer, 2003). Proces negativní selekce přispívá k odstranění self-reaktivních T buněk, a tak zabránění vzniku autoimunity (Takahama, 2006). Vzniklé pozitivní buňky jsou připraveny k exportu z dřene do periférie (Germain, 2002).

Interakce takto vzniklých naivní $CD4^+$ T buněk s dendritickou buňkou v periférii vede k indukci odlišných typů efektorových buněk (Th1, Th2 a Th17) a indukovaných regulačních T lymfocytů (T_r1 , T_h3) v závislosti na cytokinech, které jsou produkovány v mikroprostředí (Basset a kol., 2010).



Obr.12: Vývoj T lymfocytů a iT_{regs} (DN – dvojitě negativní, DP – dvojitě pozitivní).

2.7 CTLA-4

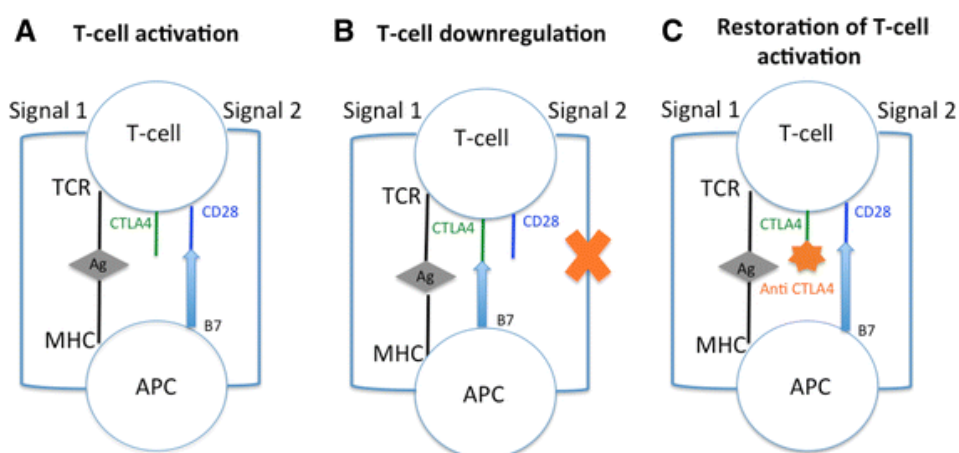
CTLA-4 (*T-lymphocyte associated antigen 4*) je checkpointová molekula (Winograd a kol., 2015), která inhibuje aktivaci T buněk a jejich proliferaci. Důvodem je zachování self-tolerance a zamezení rozvoje autoimunitních reakcí (Bertrand a kol., 2015). CTLA-4 je neustále exprimována T_{regs} (Wing a kol., 2008) intracelulárně a také na jejich povrchu (Chaudhary a Elkord, 2016). Exprese CTLA-4 je u T_{regs} kontrolována prostřednictvím transkripčního faktoru Foxp3. Bylo zjištěno, že CTLA-4 je také exprimována aktivovanými T buňkami (Wing a kol., 2008).

Exprese CTLA-4 je nezbytná pro **supresivní schopnost** T_{regs} *in vivo* a *in vitro*. T_{regs} jsou schopny down-regulovat CD80 a CD86 na APC buňkách (Wing a kol., 2008). Dochází tak ke snížení kostimulačního signálu CD28, který je potřebný pro aktivaci T buněk (Buchbinder a Desai, 2016). T_{regs} mohou také interagovat s APC buňkami prostřednictvím CTLA-4, která je charakterizována vysokou afinitou k CD80/CD86 (viz Obr 11). Interakce mezi CTLA-4 na T_{regs} a CD80/86 na APC způsobuje řadu událostí (Arce-Sillas a kol., 2016).

T_{regs} tak mohou například negativně ovlivňovat schopnost DC buněk zahájit imunitní odpověď (Liberal a kol., 2015) aktivací T buněk (Wing a kol., 2008) (viz Obr.13).

Nedostatečná exprese CTLA-4 u T_{regs} vede k **lymfoproliferaci, autoimunitním onemocněním** a nadprodukcí IgE u myši (Wing a kol., 2008). Exprese CTLA-4 u T_{regs} je proto nezbytná pro zabránění vzniku autoimunity *in vivo* (Tai a kol., 2012). U 60 % pacientů léčených pomocí ipilimumabu dochází k rozvoji **irAEs** (*immune related adverse events*), které se projevují například poškozením kůže, gastrointestinálního traktu, neurologickými a hematologickými autoimunitními chorobami (Bertrand a kol., 2015).

Inhibice CTLA-4 pomocí **monoklonálních protilátek** (Winograd a kol., 2015) zesiluje protinádorovou imunitu díky podpoření aktivace T buněk (viz Obr.13) a proliferace cytotoxických T lymfocytů (Bertrand a kol., 2015). Bylo zjištěno, že anti-CTLA-4 vede k pozměnění poměru efektorových T buněk:T_{regs} (Wolchok a Saenger, 2008). Schválenými monoklonálními protilátkami, které blokují CTLA-4 jsou ipilimumab (Buchbinder a Desai, 2016) a tremelimumab (Chaudhary a Elkord, 2016). **Ipilimumab** a **tremelimumab** jsou monoklonálními protilátkami typu IgG1 a IgG2 (Chaudhary a Elkord, 2016). Ipilimumab je schválený pro léčbu pokročilého melanomu (Buchbinder a Desai, 2016). U myších modelů bylo zjištěno, že monoklonální protilátka anti-CTLA-4 uskutečňuje protinádorovou aktivitu prostřednictvím deplece T_{regs} (Chaudhary a Elkord, 2016). Deplece T_{regs} může být zesílena kombinací imunoterapie s chemoterapií (Curiel, 2007).



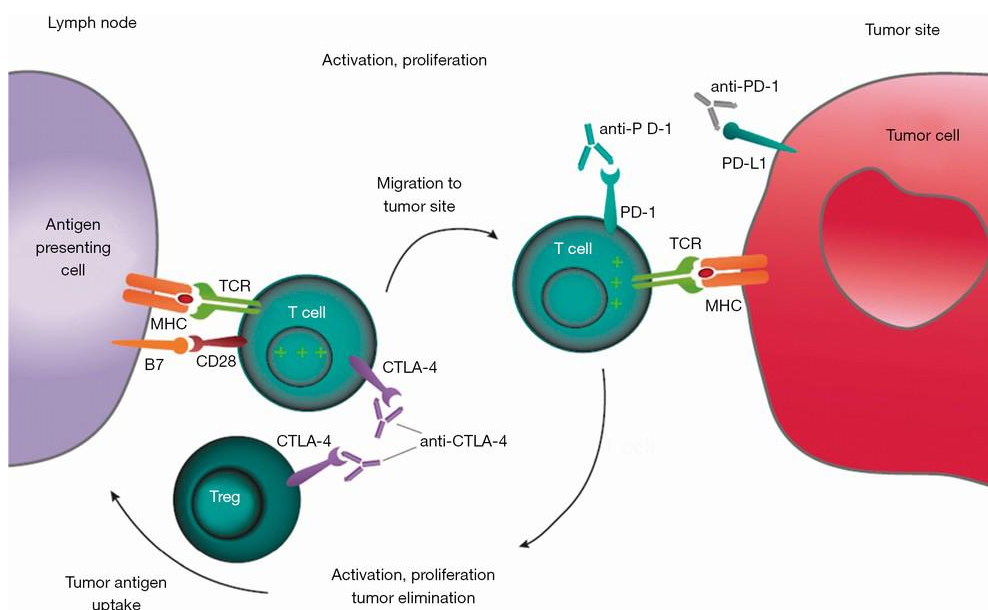
Obr.13: Schéma aktivace T buněk, down-regulace T buněk a účinku anti-CTLA-4 (zleva doprava) (Převzato a upraveno z Bertrand a kol., 2015).

A – Aktivace T buněk vyžaduje interakci T buněčného receptoru s komplexem MHC-antigen a vazbu CD80/CD86 (B7) na APC s CD28 receptorem na T buňkách. B – CTLA-4 je schopna inhibovat proliferativní odpověď T buněk tím, že s nimi soutěží o vazbu s ligandem B7. C – Anti-CTLA-4 protilátka inhibuje CTLA-4 a tím umožňuje aktivaci a proliferaci T buněk (Bertrand a kol., 2015).

2.7.1 Využití checkpointové blokády v léčbě pankreatického adenokarcinomu

Pankreatický duktální adenokarcinom (PDA) je smrtelné a agresivní onemocnění, které je bohaté na fibroblasty, extracelulární matrix, zánětlivé leukocyty a je pro něho charakteristické husté stroma. Odhaduje se, že toto onemocnění se stane druhou nejčastější příčinou smrti ve Spojených státech v roce 2025 (Winograd a kol., 2015).

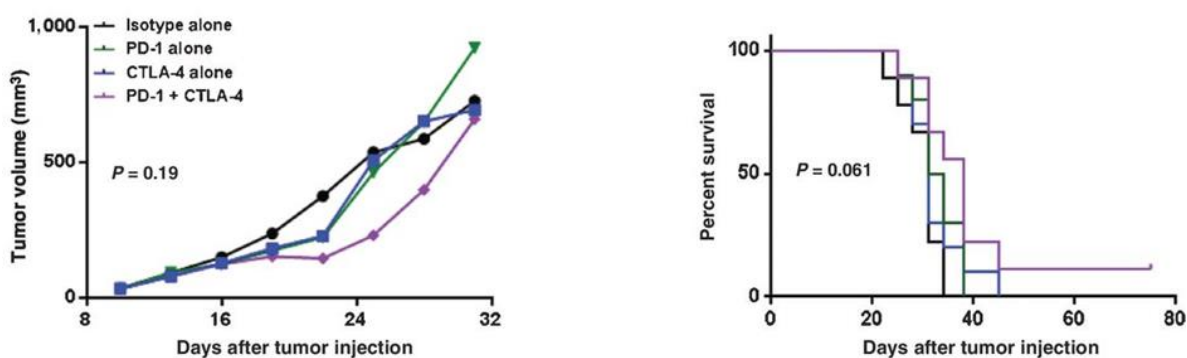
Pankreatický adenokarcinom je odolný vůči **monoklonálním protilátkám**. Agonistická monoklonální protilátka **anti-CD40** spolu s **chemoterapií** je ale schopna indukovat T buněčnou imunitu a zvrátit rezistenci pankreatického adenokarcinomu k **anti-PD-1** a **anti-CTLA-4**. (Winograd a kol., 2015) PD-1 je také checkpointovou molekulou, která down-reguluje aktivaci T buněk (Buchbinder a Desai, 2016). Schéma účinku anti-PD-1 a anti-CTLA-4 viz Obr.14.



Obr.14: Schéma účinku anti-CTLA-4 a anti-PD-1 (Převzato z Buchbinder a Desai, 2016).

Inhibice CTLA-4 umožňuje aktivaci, proliferaci T buněk a také snížení supresivní schopnosti T_{regs} . Inhibice PD-1 umožňuje obnovení aktivity protinádorových T buněk. Současná inhibice CTLA-4 a PD-1 s velkou pravděpodobností vykazuje synergii a vede k delší protinádorové imunitní odpovědi. (Buchbinder a Desai, 2016).

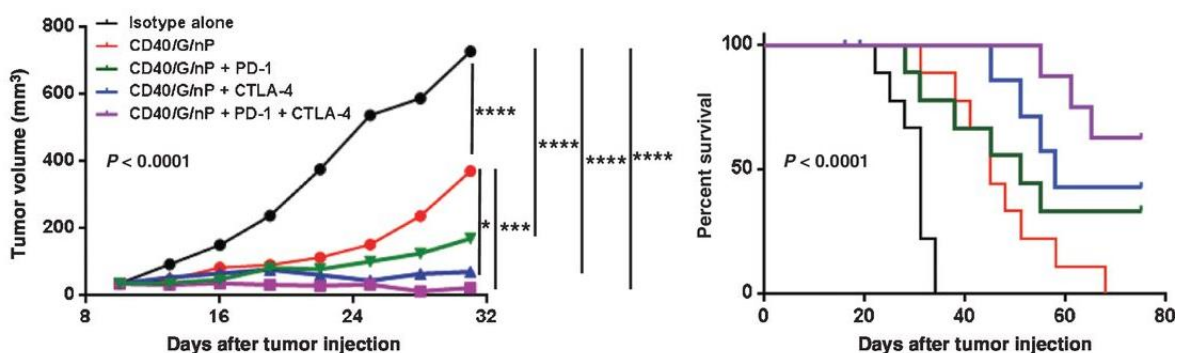
Winograd se svými kolegy testoval vliv anti-CTLA-4 a anti-PD-1 na růst PDA nádorů (viz Obr.15). V tomto pokusu bylo zjištěno, že léčba pomocí pouze anti-PD-1 nebo pouze anti-CTLA-4 má minimální protinádorový účinek (Winograd a kol., 2015).



Obr.15: Vlevo – Léčba PDA nádorů pomocí monoklonálních protilátek blokující PD-1 a CTLA-4, vpravo – Graf přežití v závislosti na použitých terapeutikách (Převzato z Winograd a kol., 2015).

Winograd se svými kolegy dále provedl další pokus během kterého zjistil, že kombinace anti-CD40+chemoterapie+anti-PD-1/nebo anti-CTLA-4 a terapie založená na anti-CD40+chemoterapie+anti-PD-1+anti-CTLA-4 způsobuje regresi subkutánních nádorů PDA u myšího kmene KPC, zlepšuje přežití (viz Obr.16) a také chrání před opětovným výskytem nádorů. S použitím $CD4^+$ a $CD8^+$ knockout myší bylo zjištěno, že protinádorový účinek byl zprostředkován T buňkami. V jejich nepřítomnosti nedošlo k inhibování růstu nádorů. Následně byla analyzována infiltrace T buněk v nádorech. Nádory myší léčené anti-PD-1+anti-CTLA-4+anti-CD40+chemoterapie měly 7x vyšší podíl $CD8^+$ T buněk: T_{regs} v porovnání s kontrolou. Myši, které byly léčeny pouze s anti-PD-1+anti-CTLA-4, nebo s anti-CD40+chemoterapie nedosáhly takového zvýšeného podílu $CD8^+$ T buněk: T_{regs} jako myši léčené s anti-PD-1+anti-CTLA-4+anti-CD40+chemoterapie. K testování imunologické

paměti bylo myším následně aplikováno stejné množství buněk PDA linie, ale na opačný bok. U 67 až 86 % myší nedošlo k uchycení nádoru. Tento pokus ukazuje, že kombinovaná léčba u PDA vede k indukci protinádorové odpovědi s léčebným potenciálem. Naopak samotná checkpointová blokáda je dostačující například u myších modelů rakoviny střeva, melanomu a močového měchýře, kdy dochází k inhibici růstu nádorů a zlepšení přežití (Winograd a kol., 2015).



Obr.16: Vlevo – Léčba PDA nádorů pomocí monoklonálních protilátek blokujících PD-1 a CTLA-4 v kombinaci s chemoterapií (G - Gemcitabine, Np – nab-paclitaxel), vpravo – Graf přežití v závislosti na použitých terapeutikách (Převzato z Winograd a kol., 2015).

3 Cíle práce

- Studium regulačních T lymfocytů, jejich úloha v nádorovém onemocnění a možnosti jejich zacílení v nádorové imunoterapii.
- Studium účinku terapie R-848+poly (I:C)+LTA+manan-BAM+anti-CD40 na nádory pankreatického adenokarcinomu dosahující větších objemů.
- Studium účinku terapie R-848+poly (I:C)+LTA+manan-BAM+anti-CD40+anti-CTLA-4 na růst nádorů pankreatického adenokarcinomu.

4 Praktická část

4.1 Chemikálie

Anti-CD40 (BioXCell, USA, clone FGK 4.5/FGK45)

Anti-CTLA-4 (BioXCell, USA, clone 9H10)

BAM, *Biocompatible anchor for cell membranes* (NOF Corporation, USA)

D-MEM, *Dulbecco's modified eagle medium* (Sigma-Aldrich, USA)

EDTA, *Ethylendiamineteraacetic acid* (Sigma-Aldrich, USA)

FCS, *Fatal Calf Serum* (Sigma-Aldrich, USA)

HCl, *kyselina chlorovodíková* (Sigma-Aldrich, USA)

LTA, *Lipoteichoic acid from Bacillus subtilis* (Sigma-Aldrich, USA)

Manan (Sigma-Aldrich, USA)

PBS, *Phosphate buffered saline* (Sigma-Aldrich, USA)

Poly (I:C), *Polyinosinic:polycytidylic acid* (Sigma-Aldrich, USA)

R-848, *Resiquimod* (Torcis Bioscience, UK)

Trypanová modř (Sigma-Aldrich, USA)

Trypsin (Sigma-Aldrich, USA)

4.2 Laboratorní zvířata

V těchto pokusech byly použity samice kmene C57BL/6N z chovu Charles River Laboratories. Myši byly čtyři týdny staré při příchodu do laboratoře. K pokusům byly použity ve věku 8 týdnů s hmotností 18-20 g. Myši byly chovány za standardních podmínek ve sterilních boxech s podestýlkou z dřevěné drtě ve zvěřinci Parazitologického ústavu, BC AVČR. Myši měly neustálý příjem sterilní vody a stravy ve formě suchých pelet. V místnosti byla udržována konstantní teplota 22 °C, relativní vlhkost 65 % a fotoperioda 12/12 hodin.

4.3 Nádorová buněčná linie

Buňky myšího pankreatického adenokarcinomu Panc02 byly kultivovány v D-MEM s 10 % FCS obsahujícím penicilin (100 j/ml), streptomycin (100 µg/ml), amfotericin B (0,25 µg/ml), L-glutamin (2,2 mM) a merkaptoethanol (50 µM). Nádorové buňky, které věnoval darem prof. Lars Ivo Partecke (Greifswald, Německo), byly uchovány v termostatu za teploty 37 °C v atmosféře nasycené vodními parami a 5% CO₂.

4.4 Příprava nádorových buněk Panc02

Po odstranění média z kultivační nádoby byly nádorové buňky Panc02 3x propláchnuty sterilním PBS. Po propláchnutí byla provedena trypsinizace po dobu 5 minut v termostatu za teploty 37 °C (0,02% trypsin a 0,02% EDTA v PBS). Po uplynutí této doby byla trypsinizace ukončena přidáním malého množství D-MEM s 10% FCS. Následně byly buňky centrifugovány 5 minut při přetížení 160g a teplotě 4 °C. Po centrifugaci došlo k odstranění média od peletu. K peletu buněk bylo přidáno D-MEM médium bez séra na objem 3 ml. Buňky byly následně rozvolněny pomocí Pasteurovy pipety. Z takto rozvolněné buněčné suspenze bylo napipetováno 30µl do zkumavky. Do této zkumavky bylo dále přidáno 30µl trypanové modři, umožňující rozlišení mrtvých a živých buněk. Počet buněk byl následně spočítán v Bürkerově počítací komůrce a jejich množství bylo upraveno na požadovanou koncentraci.

4.5 Transplantace nádorových buněk

Do předem vyholeného pravého boku myši bylo subkutánně aplikováno 0,1 ml D-MEM bez séra obsahující 400 000 nádorových buněk Panc02.

4.6 Měření a výpočet velikosti nádorů

Velikost nádorů byla měřena obden po dobu 30 dní pomocí kaliperu. Po ukončení terapie byla velikost nádorů kontrolována jednou za 14 dní. Následně byl spočítán objem nádorů pomocí vzorce $V = \pi/6 AB^2$. A představuje největší rozměr v mm a B nejmenší rozměr v mm.

4.7 Složení terapeutických látek

Směs R-848+poly (I:C)+LTA+manan-BAM

0,5 mg R-848 (s 5,6 μ l 3,5% HCl+50 μ l PBS) + 0,5 mg poly (I:C)+0,5 mg LTA/ml 0,2 mM manan-BAM v PBS

Směs R-848+poly (I:C)+LTA+manan-BAM+anti-CD40

0,5 mg R-848 (s 5,6 μ l 3,5% HCl+50 μ l PBS) + 0,5 mg poly (I:C)+0,5 mg LTA + 0,4 mg anti-CD40/ml 0,2 mM manan-BAM v PBS

Anti-CD40+anti-CTLA-4

0,4 mg anti-CD40 + 0,4 mg anti-CTLA-4/ml PBS

Směs R-848+poly (I:C)+LTA+manan-BAM+anti-CD40+anti-CTLA-4

0,5 mg R-848 (s 5,6 μ l 3,5% HCl+50 μ l PBS) + 0,5 mg poly (I:C)+0,5 mg LTA + 0,4 mg anti-CD40 + 0,4 mg anti-CTLA-4/ml 0,2 mM manan-BAM v PBS

4.8 Statistické vyhodnocení dat

Data pro průměrný objem nádoru (AUC%) byla statisticky vyhodnocena v programu Statistica 13.2 pomocí jednocestné analýzy variance (ANOVA). Pro analýzu přežití byl použit Kaplan-Myerův test. Data pro průměrný objem nádoru (AUC%) a vliv terapie na velikost nádoru byla graficky vyhodnocena v programu MS Excel 2016. V grafech je vyznačena střední chyba průměru (SEM).

4.9 Experimenty

4.9.1 Studium terapie pankreatického adenokarcinomu pomocí směsi R-848+poly (I:C)+LTA+manan-BAM+anti-CD40

V tomto pokusu bylo použito 18 myší, kterým bylo transplantováno 4×10^5 nádorových buněk Panc02 do vyholeného pravého boku. Po 16 dnech byly myši náhodně rozděleny do 3 skupin (A, B a K) (viz Tab. V) po 6 a byla zahájena terapie (den 0). Ve dnech 0, 1, 2, 8, 9, 10,

16, 17, 18, 24, 25 a 26 bylo aplikováno 50 µl terapeutika intratumorálně. Měření nádorů probíhalo každý druhý den před aplikací terapeutika až do dne 30. Následně bylo zaznamenáváno přežití myši a každých 14 dní byl kontrolován přibližný stav velikosti a vzhled nádorů.

Tab. V: Rozdělení myši do skupin podle aplikovaného terapeutika.

Skupina	Terapeutikum
A R-848+poly (I:C)+LTA+manan- BAM+anti-CD40	0,5 mg R-848 (s 5,6 µl 3,5% HCl+50 µl PBS) + 0,5 mg POLY I:C+0,5 mg LTA + 0,4 mg anti-CD40/ml 0,2 mM manan-BAM v PBS
B R-848+poly (I:C)+LTA+manan- BAM	0,5 mg R-848 (s 5,6 µl 3,5% HCl+50 µl PBS) + 0,5 mg POLY I:C+0,5 mg LTA + 0,4 mg /ml 0,2 mM manan-BAM v PBS
K PBS	PBS

4.9.2 Studium terapie pankreatického adenokarcinomu pomocí anti-CTLA-4 v kombinaci se směsí R-848+poly (I:C)+LTA+manan-BAM+anti-CD40

V tomto pokusu bylo použito 24 myši, kterým bylo transplantováno 4×10^5 nádorových buněk Panc02 do vyholeného pravého boku. Po 16 dnech byly myši náhodně rozděleny do 4 skupin (A, B, C a K) (viz Tab.VI) po 6 a byla zahájena terapie (den 0). Ve dnech 0, 1, 2, 8, 9, 10, 16, 17, 18, 24, 25 a 26 bylo aplikováno 50 µl terapeutika intratumorálně. Měření nádorů probíhalo každý druhý den před aplikací terapeutika až do dne 30. Následně bylo zaznamenáváno přežití myši a každých 14 dní byl kontrolován přibližný stav velikosti a vzhled nádorů.

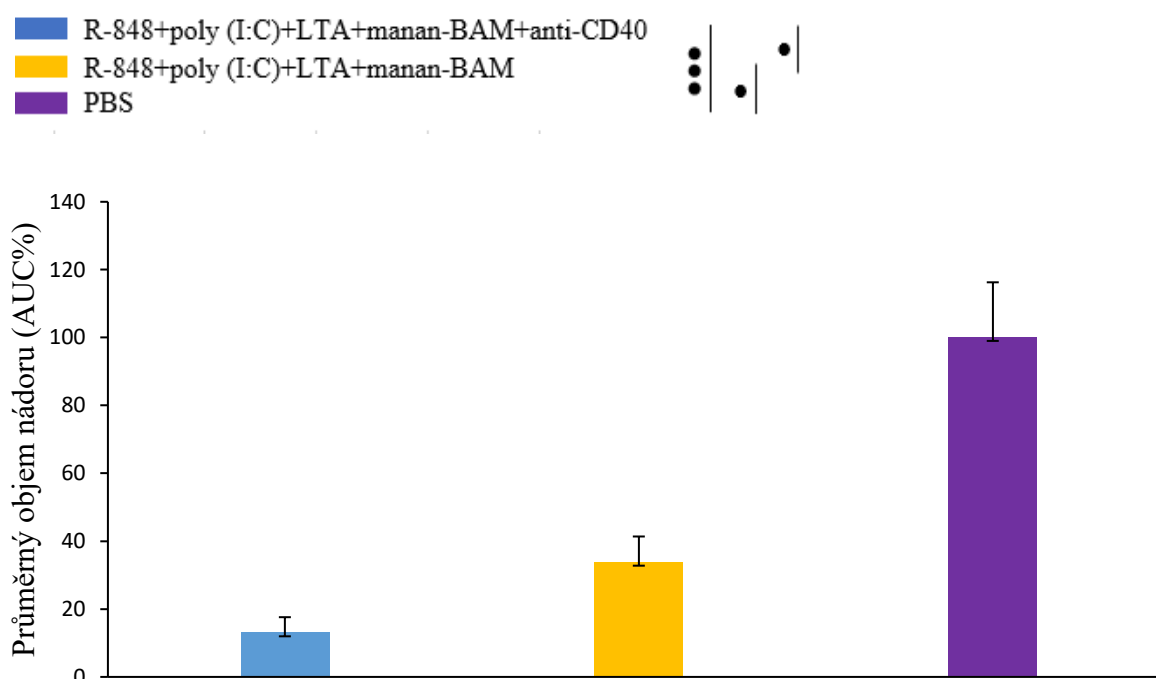
Tab. VI: Rozdělení myši do skupin podle aplikovaného terapeutika.

Skupina	Terapeutikum
A R-848+poly (I:C)+LTA-manan-BAM +anti-CD40	0,5 mg R-848 (s 5,6 µl 3,5% HCl+50 µl PBS) + 0,5 mg POLY I:C+0,5 mg LTA + 0,4 mg anti-CD40/ml 0,2 mM manan-BAM v PBS
B Anti-CD40+anti-CTLA-4	0,4 mg anti-CD40 + 0,4 mg anti-CTLA-4/ml PBS
C R-848+poly (I:C)-LTA+manan-BAM +anti-CD40+ anti-CTLA-4	0,5 mg R-848 (s 5,6 µl 3,5% HCl+50 µl PBS) + 0,5 mg POLY I:C+0,5 mg LTA + 0,4 mg anti-CD40 + 0,4 mg anti-CTLA-4/ml 0,2 mM manan-BAM v PBS
K PBS	PBS

5 Výsledky

5.1 Studium terapie pankreatického adenokarcinomu pomocí směsi R-848+poly (I:C)+LTA+manan-BAM+anti-CD40

Cílem tohoto pokusu bylo otestovat účinek terapeutické směsi R-848+poly (I:C)+LTA+manan-BAM+anti-CD40 na nádory dosahující větších objemů. Na Obr.17 je znázorněn průměrný objem nádoru pankreatického adenokarcinomu (AUC%) vůči kontrolní skupině. Z grafu je patrné, že terapeutická směs R-848+poly (I:C)+LTA+manan-BAM+anti-CD40 má oproti terapeutické směsi R-848+poly (I:C)+LTA+manan-BAM větší vliv na redukci nádorového růstu.

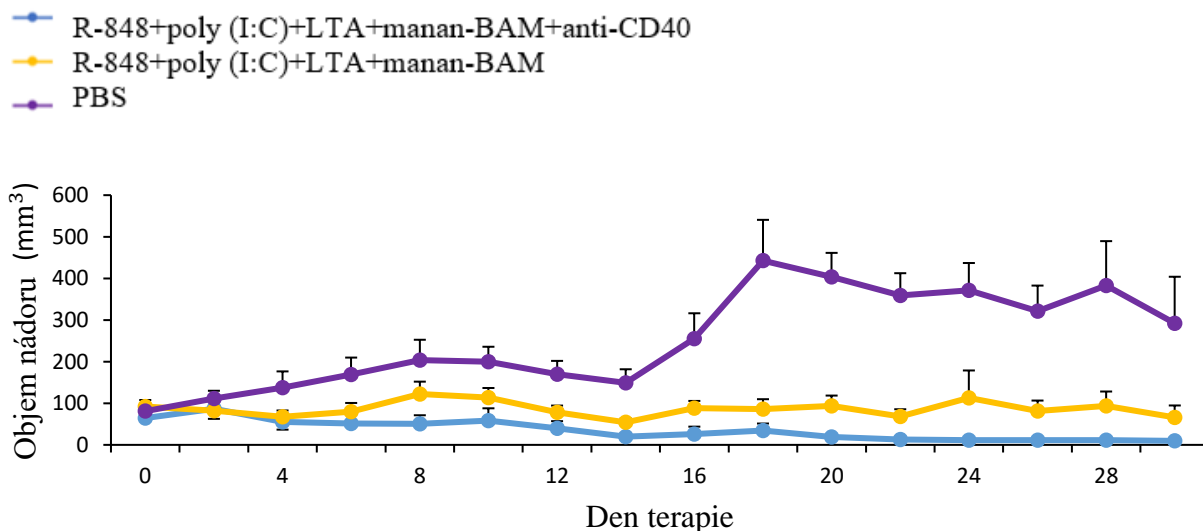


Obr.17: Průměrný objem nádoru (AUC%).

Hladiny statistické významnosti:

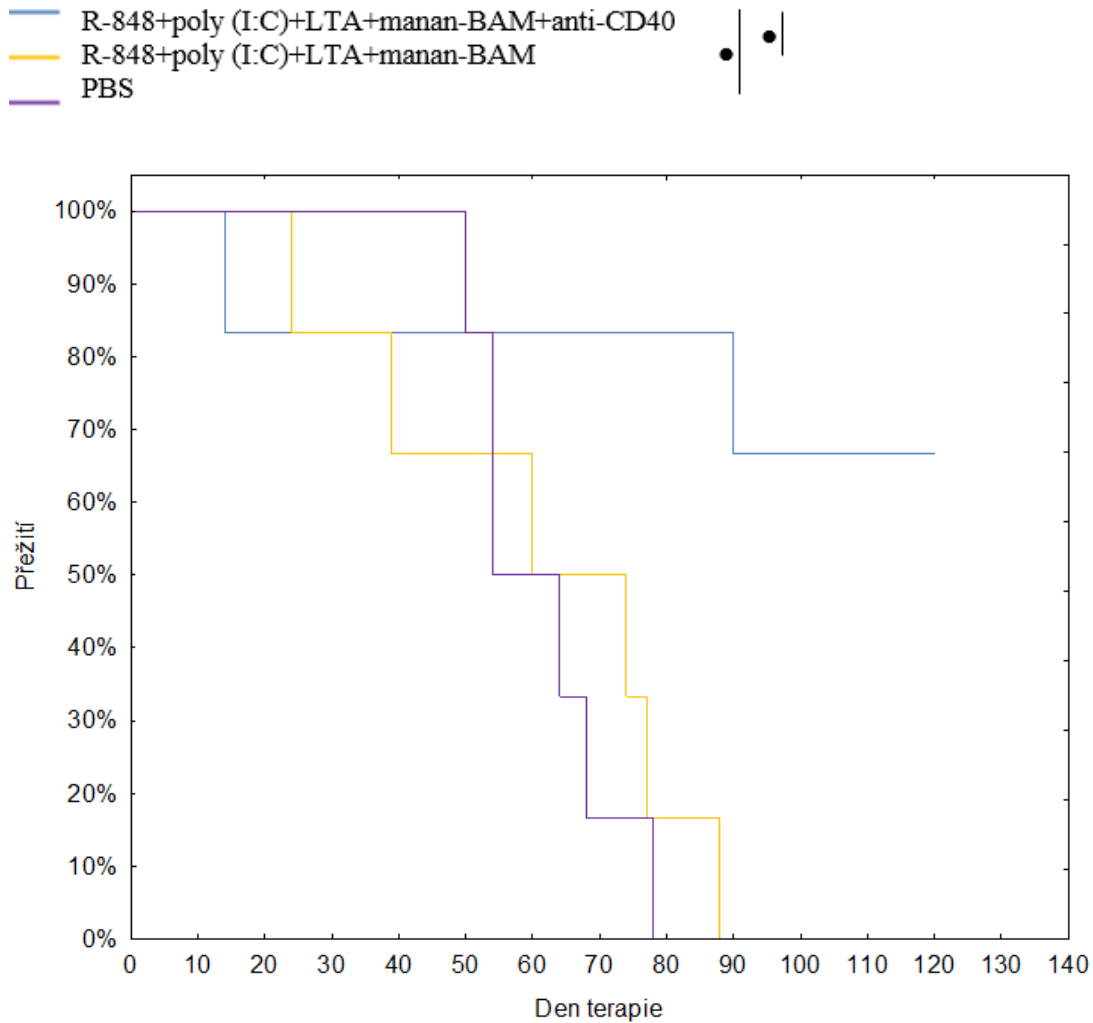
● $p \leq 0,05$, ●●● $p \leq 0,005$

Na Obr.18 je graficky zobrazen vliv výše zmíněných terapií na objem nádoru (mm^3) v průběhu terapie trvající 30 dní. Odchylna hodnoty (den 18) pro kontrolní skupinu je s největší pravděpodobností způsobena charakterem pankreatického adenokarcinomu. Pro pankreatický adenokarcinom je charakteristická nekróza tkáně a její následné odpadávání (Ženka, ústní sdělení).



Obr.18: Vliv terapie na velikost nádoru.

Po skončení terapie bylo sledováno přežití myši do dne 120 (viz Obr.19). Terapie R-848+poly (I:C)+LTA+manan-BAM+anti-CD40 vedla k vyléčení 4 myši z 6. Oproti tomu terapie založená na stejném složení bez anti-CD40 vedla k úmrtí všech 6 myši do 78. dne terapie.



Obr.19: Vliv terapie na přežití myši.

Hladiny statistické významnosti:

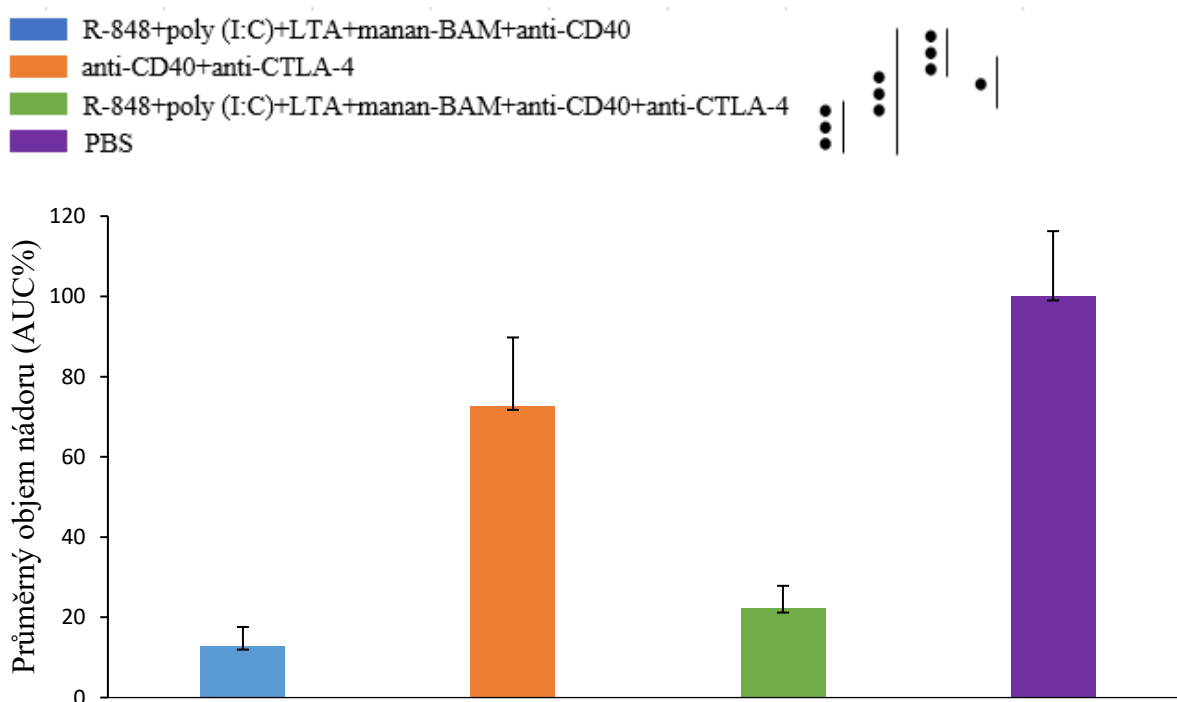
- $p \leq 0,05$

Přeživším myším bylo následně aplikováno 10^6 buněk Panc02 do pravého boku. Úspěšnost retransplantace byla sledována do 145. dne. U myši léčených terapií R-848+poly (I:C)+LTA+mana-BAM+anti-CD40 nedošlo k uchycení nádorových buněk. Tato odolnost ukazuje na zapojení získané imunity a tvorbu imunologické paměti.

5.2 Studium terapie pankreatického adenokarcinomu pomocí anti-CTLA-4 v kombinaci se směsí R-848+poly (I:C)+LTA+manan-BAM+anti-CD40

Cílem tohoto pokusu bylo vylepšit účinek terapeutické směsi R-848+poly (I:C)+LTA+manan-BAM+anti-CD40 v předchozím pokuse o anti-CTLA-4. Bohužel terapie obohacená o anti-CTLA-4 nedosáhla účinnější redukce nádorového růstu oproti R-848+poly (I:C)+LTA+manan-BAM+anti-CD40. Nádory léčené směsí R-848+poly (I:C)+LTA+manan-BAM+anti-CTLA-4 dosáhly 78% redukce objemu nádoru vůči kontrolní skupině. Terapie založená pouze na anti-CD40 a anti-CTLA-4 dosáhla jen 28% redukce průměrného objemu nádoru vůči kontrolní skupině. Naopak terapie bez anti-CTLA-4 dosáhla 87% redukce objemu nádoru vůči kontrolní skupině.

Níže je na Obr.20 graficky zobrazen průměrný objem nádorů (AUC%).

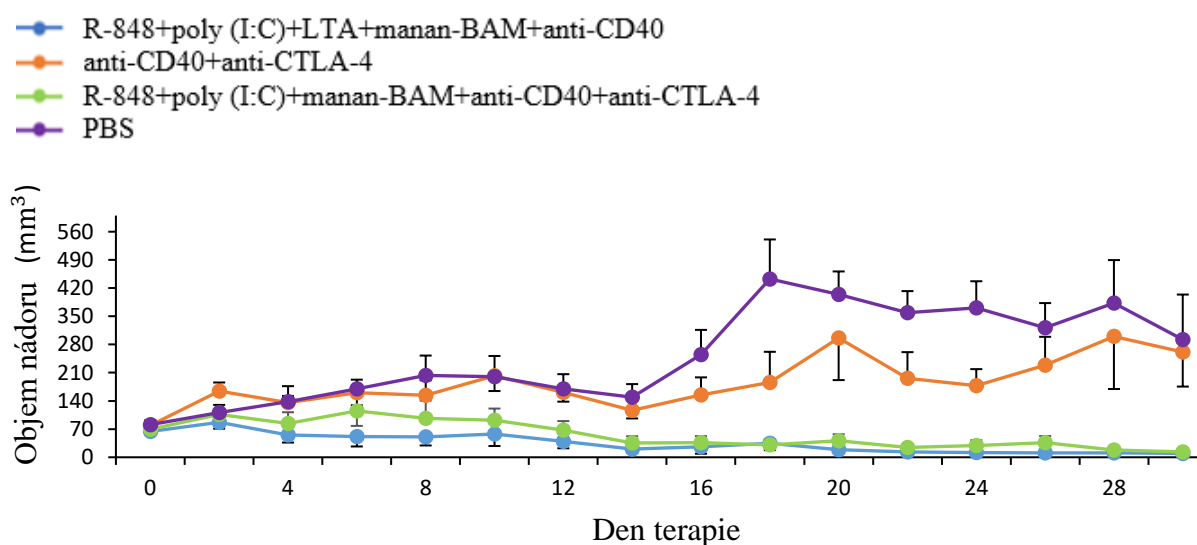


Obr.20: Průměrný objem nádoru (AUC%).

Hladiny statistické významnosti:

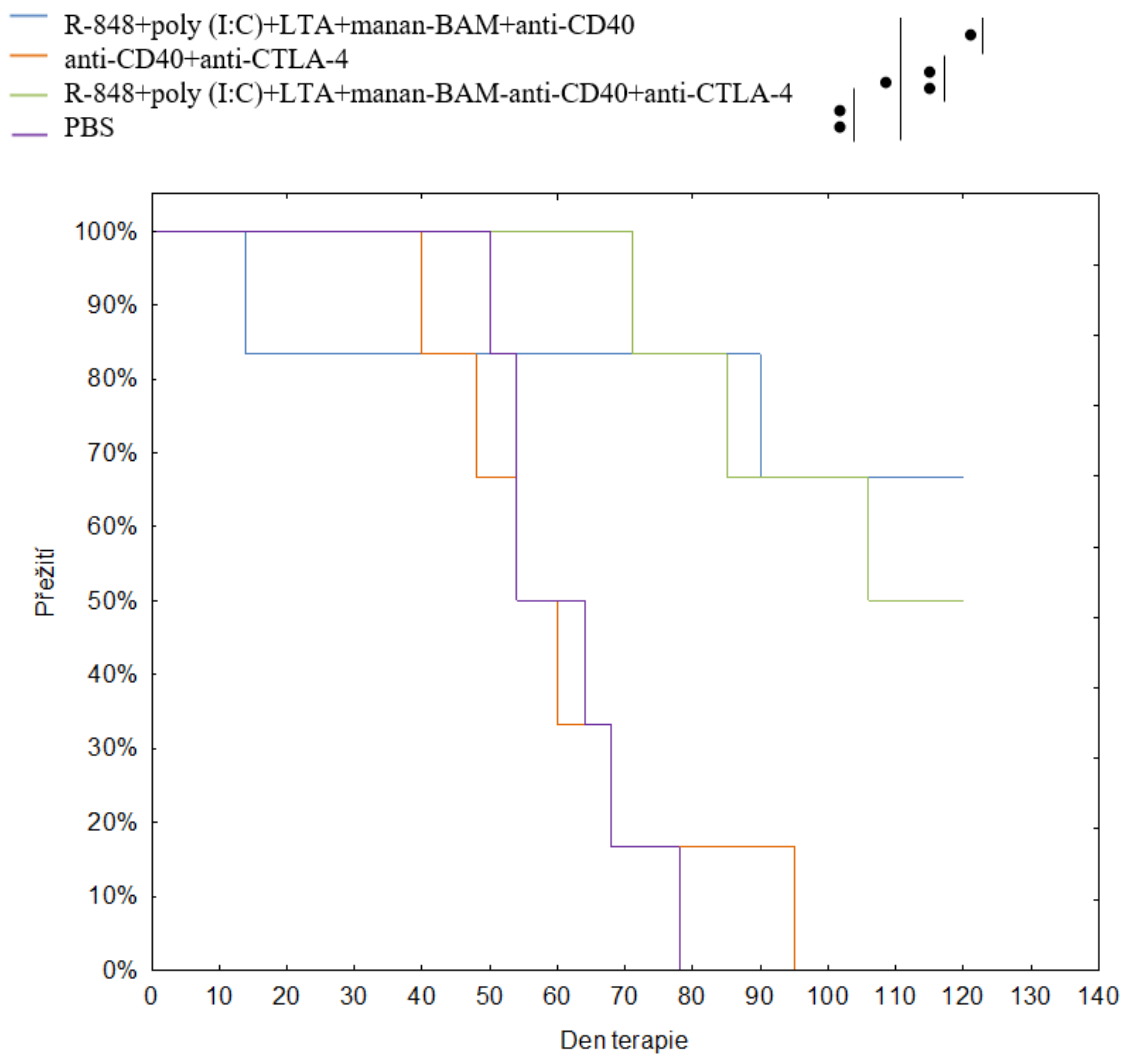
- $p \leq 0,05$, ●●● $p \leq 0,005$

Obr. 21 ukazuje vliv výše uvedených terapií na objem nádoru (mm^3) v průběhu terapie trvající 30 dní. Odchylka hodnoty (den 18) pro kontrolní skupinu je s největší pravděpodobností způsobena charakterem pankreatického adenokarcinomu. Pro pankreatický adenokarcinom je charakteristická nekróza tkáně a její následné odpadávání (Ženka, *ústní sdělení*). Přídavek anti-CTLA-4 k terapeutické směsi R-848 + poly(I:C) + LTA + manan-BAM v prvních 18 dnech účinnost terapie mírně snižoval, pak jeho vliv byl zanedbatelný. Terapie pouze pomocí anti-CD40 a anti-CTLA-4 nevedla k výraznější redukci nádorového růstu ve srovnání s kontrolou.



Obr.21: Vliv terapie na velikost nádoru.

Třicátý den byla ukončena terapie a zahájeno sledování přežití myši do dne 120. Vliv terapie na přežití myši je zobrazen na Obr.22. Z grafu je patrné, že terapie pomocí R-848+poly (I:C)+LTA+manan-BAM+anti-CD40 vedla k přežití 4/6 myši. Terapie, která byla obohacena ještě o anti-CTLA-4 vedla k přežití 3/6 myši. Terapie založená pouze na anti-CD40 a anti-CTLA-4 se od kontrolní skupiny nelišila.



Obr.22: Vliv terapie na přežití myši.

Hladiny statistické významnosti:

● $p \leq 0,05$, ●● $p \leq 0,01$

Přeživším myším bylo následně aplikováno 10^6 buněk Panc02 do pravého boku. Úspěšnost retransplantace byla sledována do 145. dne. U myši léčených terapií R-848+poly (I:C)+LTA+mana-BAM+anti-CD40 nedošlo k uchycení nádorových buněk. U myši léčených R-848+poly (I:C)+LTA+mana-BAM+anti-CD40+anti-CTLA-4 došlo k uchycení nádorových buněk u 1/3 myši. Tato odolnost ukazuje na zapojení získané imunity a tvorbu imunologické paměti.

6 Diskuze

Tým vedený RNDr. Janem Ženkou, CSc. se již několik let zabývá otázkou nádorové imunoterapie se zaměřením se na mechanismy vrozené imunity. CD8⁺ cytotoxické T buňky jsou považovány za hlavní vykonavatele imunitních odpovědí vůči nádorům u myši a lidí. Zjištěno ale také bylo, že nejenom buňky získané imunity, ale i buňky vrozeného imunitního systému se mohou účastnit rozpoznání a destrukce nádorů (Hamaï a kol., 2010). Z buněk vrozené imunity mají pravděpodobně nejdůležitější úlohu NK buňky, které jsou schopny nádorové buňky rozpoznat a zlyzovat. NK buňky také úzce spolupracují s APC buňkami a napomáhají tak indukci T buněčné protinádorové imunitní odpovědi (Jacobs a kol., 2012). Velikost odpovědi získaného imunitního systému je závislá na časných signálech vrozené imunity vůči patogenům. Z toho vyplývá, že získaný a vrozený imunitní systémem jsou úzce propojeny (Le Bon a Tough, 2002).

Tým vedený RNDr. Janem Ženkou, CSc. se zabývá aktivací vrozeného imunitního systému prostřednictvím terapie R-848+poly (I:C)+LTA+manan-BAM, která je neustále vylepšována, na redukci nádorových buněk B16-F10 a Panc02. Ale u i této terapie je potřeba zvažovat možný vliv získané imunity díky jejich úzkému propojení.

Cílem této bakalářské práce bylo studovat účinek terapie na nádory dosahující větších objemů a pokusit se vylepšit účinek terapie na modelu pankreatického adenokarcinomu, u kterého nebylo zatím dosaženo vyléčení všech myši v experimentální skupině. Snahou tak bylo přispět k problematice spojené s imunoterapií pankreatického adenokarcinomu.

V teoretické části této bakalářské práce byla studována úloha regulačních T lymfocytů, jejich role v nádorovém onemocnění a možnost jejich zacílení v nádorové imunoterapii. Na základě zjištěných informací je vhodnou kombinací **anti-CTLA-4** s monoklonální protilátkou **anti-CD40** a **chemoterapií** v léčbě pankreatického adenokarcinomu.

V prvním experimentu je použita terapie založená na TLR agonistech (R-848+poly (I:C)+LTA) vyvolávajících zánětlivou infiltraci nádoru a PAMPs stimulujících fagocytózu nádorových buněk (manan) (Janotová a kol., 2014; Caisová a kol., 2016; Waldmannová a kol., 2016). Je známo, že aktivace TLR receptorů vyvolává odpověď vrozeného i získaného imunitního systému. Během aktivace dochází k transkripci genů IFN typu I a prozánětlivých cytokinů jako například TNF- α , IL-1 a IL-6 (Adams, 2009). Ze studování účinku této terapie

na melanomu je známo, že kombinace TLR agonistů a agonistů fagocytárních receptorů vede k synergii vyvolávající zánětlivou infiltraci a aktivaci lektinové cesty komplementu. Dochází tím tak k redukci nádorového růstu (Waldmannová a kol., 2016). Aktivované zánětlivé buňky jsou schopny rozpoznat nádorové buňky díky jejich opsonizaci prostřednictvím agonistů fagocytárních receptorů. Ze zánětlivých buněk hrají pravděpodobně nejdůležitější úlohu neutrofilů (Caisová a kol., 2016).

U léčby pankreatického adenokarcinomu pomocí R-848+LTA+manan-BAM+poly (I:C) byl pozorován pozitivní vliv na redukci nádorů a nižší výskyt metastáz. Terapie ale nedosáhla takových výsledků jako u melanomu (Jandová, 2017), u kterého bylo dosaženo dokonce vyléčení 83 % myší (Caisová a kol., 2016). Ukázalo se tak, že tato terapie může být použita i v léčbě jiných nádorových onemocnění (Masáková, 2016), ale s nutností vylepšit její složení (Nedbalová, 2017).

Vyšší odolnost pankreatického adenokarcinomu vůči terapii vedla k využití inhibitorů a aktivátorů checkpointových molekul. Vliv monoklonálních protilátek anti-PD-1 a anti-CD40 byl nejprve studován u melanomu B16-F10. Bylo zjištěno, že samotná anti-PD-1 neměla na rozdíl od anti-CD40 vliv na redukci nádorového růstu a ani vliv samotné anti-CD40 nebyl výrazný. Kombinace R-848+LTA+manan-BAM-anti-CD40 vedla k 85% průměrné redukci nádorového růstu u melanomu. Bylo tak navrženo obohacení terapie o monoklonální protilátku **anti-CD40**, kdy bylo zjištěno, že kombinace anti-CD40 a směsi TLR agonistů s kotveným mananem vede k zesílení účinku terapie. Cytotoxický účinek vůči nádorovým buňkám B16-F10 a Panc02 vykazovaly **NK buňky** a **neutrofilů** pouze v přítomnosti kotveného mananu v *in vitro* pokusech. Tento cytotoxický účinek u pankreatického adenokarcinomu byl v porovnání s melanomem o něco nižší (Nedbalová, 2017).

V této bakalářské práci vedla terapie založená na R-848+LTA+poly (I:C)+manan-BAM+anti-CD40 k vyléčení 4 myší z 6. Nádory průměrně dosahovaly 13,2 % objemu kontrolní skupiny. Terapeutický účinek byl nižší než u terapie melanomu, kdy bylo vyléčeno 5 z 6 myší (Nedbalová, 2017). Co se týče srovnání s terapií totožných Panc02 nádorů, je možno konstatovat, že účinnost terapie s počáteční velikostí nádorů klesá. V případě nádorů o 30 mm³ je dosahováno 83% vyléčení, 40 mm³ 80% (Jan Ženka, *ústní sdělení*) a v tomto experimentu, kdy nádory před zahájením terapie dosahovaly průměrné velikosti 79 mm³ bylo dosaženo 66% vyléčení. Možným důvodem je přítomnost T_{regs} potlačující protinádorovou imunitní odpověď (Chaudhary a Elkord, 2016) a také zvýšená odolnost pankreatického

adenokarcinomu vůči terapiím. Tato odolnost řadí pankreatický adenokarcinom mezi jedno z nejzávažnějších nádorových onemocnění (Ryan a kol., 2014).

Co se týče úlohy jednotlivých složek terapeutické směsi použité v prvním pokusu, jedná se o tyto aktivity:

Manan-BAM se podílí na opsonizaci nádorových buněk (Caisová a kol., 2016) a aktivaci lektinové cesty komplementu (Waldmannová a kol., 2016).

R-848 je TLR7 agonista u myši a TLR7 a 8 agonista u lidí, který vykazuje synergii s manan-BAM. V předchozích letech byl studován vliv TLR4 agonisty, lipopolysacharidu (LPS), ale z důvodu jeho schopnosti vyvolat septický šok u lidí byl nahrazen R-848. R-848 je schopen indukovat zrání plazmacytoidních DC buněk (pDCs), podporovat produkci protilátek a zesilovat Th1 odpověď u myši. (Caisová a kol., 2016). Maturace DC buněk je charakterizována up-regulací MHC II a kostimulačních molekul (CD80/86), které poskytují signály nezbytné pro aktivaci naivních T buněk (Pasare a Medzhitov, 2003). R-848 také v synergii s poly (I:C) indukuje velmi výraznou tvorbu IL-12 (Napolitani a kol., 2015).

Poly (I:C) je TLR3 agonista který kromě výše popsané indukce tvorby IL-12 stimuluje zrání DC buněk u myši a lidí, čímž může zesílit prezentaci antigenu buňkám získané imunity. U poly (I:C) bylo zjištěno, že také zvyšuje odolnost myši vůči retransplantaci (Caisová a kol., 2016).

LTA je TLR2 agonista (Takeuchi, 1999). LTA indukuje aktivaci makrofágů, které produkují IL-12. LTA se kromě indukování tvorby IL-12 podílí také na produkci řady dalších cytokinů makrofágy jako například TNF- α , IL-6, IL-10 (Cleveland a kol., 1996). **IL-12** je cytokinem zesilujícím aktivitu NK buněk (Cleveland a kol., 1996) a T buněk (Hessle a kol., 2000). IL-12 dále zvyšuje produkci IFN- γ u NK a T buněk (Cleveland a kol., 1996) a podporuje vývoj CTL a Th1 buněk (Cleveland a kol., 1996). IL-12 je tak důležitým cytokinem spojujícím vrozený a získaný imunitní systém (Hessle a kol., 2000).

CD40 molekula je členem rodiny TNFR, která je exprimována DC buňkami, makrofágy a B buňkami. CD40 je nezbytná pro T a B buňčnou odpověď. Bylo zjištěno, že synergie mezi anti-CD40 a TLR7 vede k expanzi CD8⁺ T buněk produkujících IFN γ a tvorbě paměťových buněk. Tato synergie vede k 10-20x vyšší odpovědi než při použití samotné monoklonální protilátky anti-CD40 (Ahonen a kol., 2004). Monoklonální protilátka **anti-CD40** je obecně

schopna aktivovat APC buňky a podpořit protinádorovou odpověď zprostředkovanou T buňkami (Vonderheide a Glennie, 2013).

V druhém experimentu jsme se přidáním protilátky anti-CTLA-4 ke směsi R-848+poly (I:C)+LTA+manan-BAM+anti-CD40 pokusily zvýšit terapeutický účinek směsi na redukci růstu pankreatického adenokarcinomu. Monoklonální protilátka **anti-CTLA-4** byla zavedena do terapeutické směsi díky přítomnosti T_{regs} v nádoru, které jsou schopny molekulu CTLA-4 exprimovat (Wing a kol., 2008). CTLA-4 se podílí na supresivním účinku T_{regs} (Buchbinder a Desai, 2016), které jsou schopny ovlivnit APC buňky a inhibovat aktivaci a proliferaci T buněk (Buchbinder a Desai, 2016). Monoklonální protilátka anti-CTLA-4 zesiluje protinádorovou imunitu prostřednictvím podpoření aktivace T buněk (viz Obr.12), proliferace cytotoxických T lymfocytů (Bertrand a kol., 2015) a vede k pozměnění poměru efektorových T buněk: T_{regs} (Wolchok a Saenger, 2008). Cílem bylo zjistit, zda deplece T_{regs} prostřednictvím anti-CTLA-4 vylepší terapeutickou směs a podpoří vrozenou a získanou imunitu, která je supresivním účinkem T_{regs} potlačena.

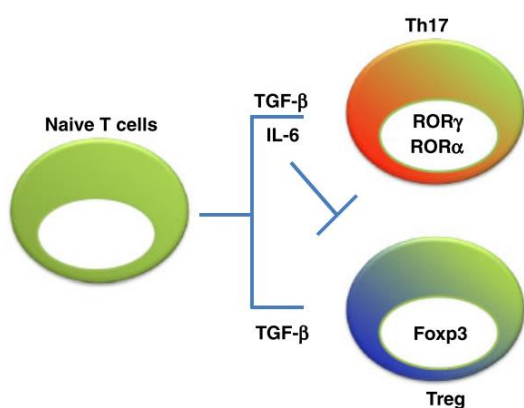
Terapie s anti-CTLA-4 vedla k výrazné redukci nádorového růstu vůči kontrolní skupině. Lepších výsledků v porovnání s terapií bez anti-CTLA-4 dosaženo ale nebylo. Redukce nádorového růstu nebyla nižší než u terapie bez anti-CTLA-4. Přesný důvod není znám. Možný je vliv zánětlivého prostředí na T_{regs} , které je terapií vyvoláno. Úloha T_{regs} v místě zánětu zůstává stále sporná. Některé studie tvrdí, že prozánětlivé prostředí vede ke snížení suprese T_{regs} , naopak některé studie tvrdí, že supresivní účinek T_{regs} narušen není (Zhao a kol., 2012). Je možné, že výsledný účinek terapie je založen na kombinaci účinku anti-CTLA-4, která má schopnost zesílit protinádorovou imunitu, a na účinku IL-6 a IL-12, které vznikají v průběhu terapie. V úvahu je potřeba brát, jak jejich možný supresivní účinek, který je popisován některými studiemi, tak i jejich vliv na diferenciaci T_{regs} na Th17 buňky. Tyto informace jsou popsány níže.

Terapie použitá v této bakalářské práci je založena na směsi **TLR** agonistů. Je známo, že použití agonistů TLR (TLR 3, TLR 7/8 a TLR 9) vede například k zvýšení fagocytózy, up-regulaci MHC a kostimulačních molekul (CD80, CD86 a CD40), produkci IFN typu I plazmacytoidními DC buňkami (pDC), IL-12 myeloidními DC buňkami (mDC) a produkci

IL-6 (Adams, 2009). U **IL-12** byla zjištěna jeho schopnost zesílit aktivaci a proliferaci konvenčních T buněk i v přítomnosti T_{regs} . Zhao se svými kolegy předpokládá, že IL-12 je schopen indukovat tvorbu IFN- γ u T_{regs} , inhibovat proliferaci T_{regs} a expresi Foxp3. IL-12 je tak pravděpodobně schopen snížit supresivní schopnost regulačních T lymfocytů. Možná je také konverze T_{regs} na konvenční T buňky (Zhao a kol., 2012).

IL-6, který je také produkován aktivací TLR, pravděpodobně hraje důležitou roli v aktivaci T buněk prostřednictvím překonání suprese zprostředkované T_{regs} (Pasare a Medzhitov, 2003). Bylo také zjištěno, že IL-6 spolu s TGF- β indukuje diferenciaci naivních T buněk na **Th17** buňky a inhibuje diferenciaci iT_{regs} (Kimura a Kishimoto, 2010) (viz Obr.23). Některé studie se domnívají, že i aktivované T_{regs} jsou schopny diferenciaci na Th17 buňky v přítomnosti IL-6 (Xu a kol., 2007). Tyto efektorové T buňky (Li, 2015) jsou schopny produkovat zánětlivé cytokiny (Li a Zheng, 2015) a účastnit se indukce autoimunitních onemocnění a obrany proti bakteriím (Kimura a Kishimoto, 2010).

Výsledek druhého experimentu podporuje představu, že primárně zánětlivé prostředí vyvolané aplikací terapeutika se třemi agonisty TLR receptorů samo o sobě potlačuje imunosupresivní účinek T_{regs} a tudíž jejich deplece prostřednictvím anti-CTLA-4 nemá již na účinek terapie vliv.



Obr. 23: Účinek IL-6 na rovnováhu Th17 buněk a T_{regs} (Převzato z Kimura a Kishimoto, 2010).

7 Závěr

- V teoretické části této bakalářské práce bylo zjištěno, že vhodnou terapií v léčbě pankreatického adenokarcinomu je kombinace anti-CTLA-4, anti-CD40 a chemoterapie.
- Účinnost terapie R-848+poly (I:C)+LTA+manan-BAM+anti-CD40 u Panc02 nádorů větších počátečních objemů klesá, nicméně i u rozvinutých nádorů je dosahováno 66% úplného vyléčení.
- Terapie založená na R-848+poly (I:C)+LTA+manan-BAM+anti-CD40+anti-CTLA-4 nevede k výraznější redukci nádorového růstu vůči terapii bez anti-CTLA-4.
- K opětovnému uchycení nádorových buněk u terapie R-848+poly (I:C)+LTA+manan-BAM+anti-CD40 při retransplantaci nedošlo. U terapie R-848+poly (I:C)+LTA+manan-BAM+anti-CD40+anti-CTLA-4 došlo k uchycení nádorových buněk u 1/3 myši.
- IL-12 a IL-6, produkované touto terapií, mají na základě zjištěných informací vliv na funkci T_{regs} a jejich vliv by mohl vysvětlit neúčinnost přídavku anti-CTLA-4 k terapii.
- Je potřeba provést odpovídající experimenty zaměřující se na bližší pochopení vlivu cytokinů, vznikajících v průběhu terapie, a zánětlivého prostředí na funkci T_{regs} .

8 Seznam použitých zkratek

AC – buňka adenokarcinomu (*adenocarcinoma cell*)

ADCC – buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách (*antibody dependent cellular cytotoxicity*)

ADP – adenosindifosfát (*adenosine diphosphate*)

Aire – autoimunitní regulátor (*autoimmune regulator*)

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

APECED – *autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal cystrophy*

ATP – adenosintrifosfát (*adenosine triphosphate*)

BAM – *bicompatible anchor for membrane*

BPC – benigní pankreatická buňka (*benign pancreatic cell*)

CCL – *chemokine (C-C motif) ligand*

CCR – *chemokine (C-C motif) receptor*

CD – diferenciační skupina (*cluster of differentiation*)

CTL – cytotoxická T buňka (*cytotoxic T cell*)

CTLA – *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein*

CXCL – *C-X-C motif chemokine ligand*

CXCR – *C-X-C motif chemokine receptor*

DC – dendritická buňka (*dendritic cell*)

D-MEM – *dulbecco's modified eagle medium*

DNA – deoxyribonukleová kyselina (*deoxyribonucleic acid*)

EDTA – ethylendiamidtetraoctová kyselina (*ethylenediamineteraacetic acid*)

FAS – *first apoptosis signal*

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

HCl – *kyselina chlorovodíková (hydrochlorid acid)*

HIF – *hypoxia inducible factor*

HLA-DR – *human leukocyte antigen-antigen D related*

ICOS – *inducible co-stimulatory molecule*

IL – *interleukin (interleukin)*

KRAS – *K-ras*

LAG – *lymphocyte-activation gene*

LTA – *lipoteichoová kyselina (lipoteichoic acid)*

MART – *melanoma-associated antigen recognized by T cells*

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

NF- κ B – *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*

NK – *přirozený zabíječ (natural killer)*

NKT – *NK T-lymfocyt (natural killer T cell)*

NRP – *neuropilin*

PBS – *fosfátový pufr (phosphate buffered saline)*

PD – *programmed cell death protein*

POLY (I:C) – *polyinosinic:polycytidylic acid*

PRR – *pattern recognition receptor*

R-848 – *resiquimod*

RNA – ribonukleová kyselina (*ribonucleic acid*)

STAT – *signal transducer and activator of transcription*

TAA – *tumor associated antigen*

TAM – *tumor-associated macrophage*

TCR – T-buněčný receptor (*T-cell receptor*)

Teff – efektorová T buňka (*effector T cell*)

TGF – *transforming growth factor*

TIM – *T cell immunoglobulin and mucin-domain*

TLR – *toll like receptor*

TME – tumorové mikroprostředí (*tumor microenvironment*)

TNF – *tumor necrosis factor*

TNFR – *tumor necrosis factor receptor*

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

WBC – bílá krvinka (*white blood cell*)

9 Použitá literatura

ADAMS, Sylvia. Toll-like receptor agonists in cancer therapy. *Immunotherapy* [online]. 2009, **1**(6), 949-964 [cit. 2018-03-04]. DOI: 10.2217/imt.09.70. ISSN 1750-743X. Dostupné z: <http://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/imt.09.70>

AHONEN, Cory, Christie DOXSEE, Sean MCGURRAN, et al. Combined TLR and CD40 Triggering Induces Potent CD8 T Cell Expansion with Variable Dependence on Type I IFN. *The Journal of Experimental Medicine* [online]. 2004, **199**(6), 775-784 [cit. 2018-03-04]. DOI: 10.1084/jem.20031591. ISSN 0022-1007. Dostupné z: <http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20031591>

ANDERSON, Mark a Maureen SU, 2011. Aire and T cell development. *Current Opinion in Immunology* [online]. **23**(2), 198-206 [cit. 2018-01-11]. DOI: 10.1016/j.coi.2010.11.007. ISSN 09527915. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0952791510001901>

ANTONIOLI, Luca, Pál PACHER, E. Sylvester VIZI a György HASKÓ, 2013. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends in Molecular Medicine* [online]. **19**(6), 355-367 [cit. 2018-01-13]. DOI: 10.1016/j.molmed.2013.03.005. ISSN 14714914. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471491413000543>

ARCE-SILLAS, Asiel, Diana Denisse ÁLVAREZ-LUQUÍN, Beatriz TAMAYA-DOMÍNGUEZ, et al., 2016. Regulatory T Cells: Molecular Actions on Effector Cells in Immune Regulation. *Journal of Immunology Research* [online]. **2016**(1720827), 1-12 [cit. 2017-11-08]. DOI: 10.1155/2016/1720827. ISSN 2314-8861. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/jir/2016/1720827/>

ARPAIA, Nicholas, Jesse GREEN, Bruno MOLTEDO, Aaron ARVEY, Saskia HEMMERS, Shaopeng YUAN, Piper TREUTING a Alexander RUDENSKY, 2015. A Distinct Function of Regulatory T Cells in Tissue Protection. *Cell* [online]. **162**(5), 1078-1089 [cit. 2018-01-28]. DOI: 10.1016/j.cell.2015.08.021. ISSN 00928674. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S009286741501034X>

BASSET, Christelle, Fatou THIAM, Cyrille DI MARTINO, John HOLTON, John CLEMENTS a Evelyne KOHLI, 2010. Cholera-Like Enterotoxins and Regulatory T cells. *Toxins* [online]. **2**(7), 1774-1795 [cit. 2017-10-29]. DOI: 10.3390/toxins2071774. ISSN 2072-6651. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2072-6651/2/7/1774/>

BERTRAND, Anne, Marie KOSTINE, Thomas BARNETCHE, Marie-Elise TRUCHETET a Thierry SCHAEVERBEKE, 2015. Immune related adverse events associated with anti-CTLA-4 antibodies: systematic review and meta-analysis. *BMC Medicine* [online]. **13**(211), 1-14 [cit. 2018-02-04]. DOI: 10.1186/s12916-015-0455-8. ISSN 1741-7015. Dostupné z: <http://bmcmmedicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12916-015-0455-8>

BLATTMAN, Joseph a Philip GREENBERG, 2004. Cancer Immunotherapy: A Treatment for the Masses. *Science* [online]. **305**(5681), 200-205 [cit. 2018-01-29]. DOI: 10.1126/science.1100369. ISSN 0036-8075. Dostupné z: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1100369>

BUCHBINDER, Elizabeth a Anupam DESAI, 2016. CTLA-4 and PD-1 Pathways. *American Journal of Clinical Oncology* [online]. **39**(1), 98-106 [cit. 2018-02-03]. DOI: 10.1097/COC.0000000000000239. ISSN 0277-3732. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26558876>

BURR, Stephen, Francesco DAZZI a Oliver GARDEN. Mesenchymal stromal cells and regulatory T cells: The Yin and Yang of peripheral tolerance. *Immunology and Cell Biology* [online]. 2013, **91**(1), 12-18 [cit. 2018-03-04]. DOI: 10.1038/icb.2012.60. ISSN 08189641. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1038/icb.2012.60>

CAISOVÁ, Veronika, Andra VIERU, Zuzana KUMŽÁKOVÁ, et al., 2016. Innate immunity based cancer immunotherapy: B16-F10 murine melanoma model. *BMC Cancer* [online]. **16**(940), 1-11 [cit. 2018-02-05]. DOI: 10.1186/s12885-016-2982-x. ISSN 1471-2407. Dostupné z: <http://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-016-2982-x>

CLEVELAND, Mark, James GORHAM, Theresa MURPHY, Elaine TUOMANEN a Kenneth MURPHY. Lipoteichoic Acid Preparations of Gram-positive Bacteria Induce Interleukin-12 through a CD14-Dependent Pathway. *Infection and Immunity* [online]. 1996, **64**(6), 1906-1912 [cit. 2018-03-04].

COLLISON, Lauren W, Vandana CHATURVEDI, Abigail L HENDERSON, et al., 2010. IL-35-mediated induction of a potent regulatory T cell population. *Nature Immunology* [online]. **11**(12), 1093-1101 [cit. 2018-01-14]. DOI: 10.1038/ni.1952. ISSN 1529-2908. Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ni.1952>

CORTHAY, Alexandre, 2009. How do Regulatory T Cells Work? *Scandinavian Journal of Immunology* [online]. **70**(4), 326-336 [cit. 2018-01-10]. DOI: 10.1111/j.1365-

3083.2009.02308.x. ISSN 03009475. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-3083.2009.02308.x>

COUZIN-FRANKEL, Jennifer, 2013. Cancer Immunotherapy. *Science* [online]. **342**(6165), 1432-1433 [cit. 2018-01-28]. DOI: 10.1126/science.342.6165.1432. ISSN 0036-8075. Dostupné z: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.342.6165.1432>

CURIEL, Tyler, 2007. Tregs and rethinking cancer immunotherapy. *Journal of Clinical Investigation* [online]. **117**(5), 1167-1174 [cit. 2018-02-03]. DOI: 10.1172/JCI31202. ISSN 0021-9738. Dostupné z: <http://www.jci.org/cgi/doi/10.1172/JCI31202>

DUBOIS, B., 2003. Innate CD4 CD25 regulatory T cells are required for oral tolerance and inhibition of CD8 T cells mediating skin inflammation. *Blood* [online]. **102**(9), 3295-3301 [cit. 2017-11-30]. DOI: 10.1182/blood-2003-03-0727. ISSN 0006-4971. Dostupné z: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2003-03-0727>

DUTTA, Avijit, Ching-Tai HUANG, Chun-Yen LIN, Tse-Ching CHEN, Yung-Chang LIN, Chia-Shiang CHANG a Yueh-Chia HE, 2016. Sterilizing immunity to influenza virus infection requires local antigen-specific T cell response in the lungs. *Scientific Reports* [online]. **6**(32973), 1-14 [cit. 2017-11-02]. DOI: 10.1038/srep32973. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/srep32973>

ELKORD, Eyad, May Abd AL SAMID a Belal CHAUDHARY, 2015. Helios, and not FoxP3, is the marker of activated Tregs expressing GARP/LAP. *Oncotarget* [online]. **6**(24), 20026-20036 [cit. 2018-01-13]. DOI: 10.18632/oncotarget.4771. ISSN 1949-2553. Dostupné z: <http://www.oncotarget.com/fulltext/4771>

EMENS, Leisha a Gary MIDDLETON, 2015. The Interplay of Immunotherapy and Chemotherapy: Harnessing Potential Synergies. *Cancer Immunology Research* [online]. **3**(5), 436-443 [cit. 2018-01-30]. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-15-0064. ISSN 2326-6066. Dostupné z: <http://cancerimmunolres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/2326-6066.CIR-15-0064>

FRIEDL, Peter a Stephanie ALEXANDER, 2011. Cancer Invasion and the Microenvironment: Plasticity and Reciprocity. *Cell* [online]. **147**(5), 992-1009 [cit. 2018-01-18]. DOI: 10.1016/j.cell.2011.11.016. ISSN 00928674. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867411013547>

GERMAIN, Ronald, 2002. T-cell development and the CD4–CD8 lineage decision. *Nature Reviews Immunology* [online]. **2**(5), 309-322 [cit. 2017-11-12]. DOI: 10.1038/nri798. ISSN 1474-1733. Dostupné z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nri798>

GOL-ARA, Maryam, Farhad JADIDI-NIARAGH, Reza SADRIA, Gholamreza AZIZI a Abbas MIRSHAFIEY, 2012. The Role of Different Subsets of Regulatory T Cells in Immunopathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis* [online]. **2012**(805875), 1-16 [cit. 2017-11-26]. DOI: 10.1155/2012/805875. ISSN 2090-1984. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/arthritis/2012/805875/>

GRIVENNIKOV, Sergei, Florian GRETEN a Michael KARIN, 2010. Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell* [online]. **140**(6), 883-899 [cit. 2018-01-27]. DOI: 10.1016/j.cell.2010.01.025. ISSN 00928674. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867410000607>

HAMAĚ, A., H. BENLALAM, F. MESLIN, et al. Immune surveillance of human cancer: if the cytotoxic T-lymphocytes play the music, does the tumoral system call the tune?. *Tissue Antigens* [online]. 2010, **75**(1), 1-8 [cit. 2018-03-04]. DOI: 10.1111/j.1399-0039.2009.01401.x. ISSN 00012815. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1399-0039.2009.01401.x>

HANAHAN, Douglas a Robert WEINBERG, 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* [online]. **144**(5), 646-674 [cit. 2018-01-24]. DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013. ISSN 00928674. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867411001279>

HESSLE, Christina, Bengt ANDERSSON a Agnes WOLD. Gram-Positive Bacteria Are Potent Inducers of Monocytic Interleukin-12 (IL-12) while Gram-Negative Bacteria Preferentially Stimulate IL-10 Production. *Infection and Immunity* [online]. 2000, **68**(6), 3581-3586 [cit. 2018-03-04]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10816515>

HOŘEJŠÍ, Václav, Jiřina BARTUŇKOVÁ, Tomáš BRDLIČKA a Radek ŠPÍŠEK, 2017. *Základy imunologie*. 6. Praha: Triton, s. 58-198. ISBN 978-80-7553-250-3.

HOŘEJŠÍ, Václav, Jiřina BARTUŇKOVÁ, Tomáš BRDLIČKA a Radek ŠPÍŠEK, 2013. *Základy imunologie*. *Základy imunologie*. 5. vyd. Praha: Triton, s. 148-150. ISBN 978-80-7387-713-2.

CHAUDHARY, Belal a Eyad ELKORD, 2016. Regulatory T Cells in the Tumor Microenvironment and Cancer Progression: Role and Therapeutic Targeting. *Vaccines* [online]. **4**(28), 1-25 [cit. 2017-12-21]. DOI: 10.3390/vaccines4030028. ISSN 2076-393x. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2076-393X/4/3/28>

CHAUDHARY, Belal, Yazan KHALED, Basil AMMORI a Eyad ELKORD, 2014. Neuropilin 1: function and therapeutic potential in cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy* [online]. **63**(2), 81-99 [cit. 2018-01-13]. DOI: 10.1007/s00262-013-1500-0. ISSN 0340-7004. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00262-013-1500-0>

CHEN, Xin a Joost OPPENHEIM, 2011. Resolving the identity myth: Key markers of functional CD4 FoxP3 regulatory T cells. *International Immunopharmacology* [online]. **11**(10), 1489-1496 [cit. 2018-01-13]. DOI: 10.1016/j.intimp.2011.05.018. ISSN 15675769. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567576911002293>

CHURLAUD, Guillaume, Fabien PITOISET, Fadi JEBBAWI, Roberta LORENZON, Bertrand BELLIER, Michelle ROSENZWAJG a David KLATZMANN, 2015. Human and Mouse CD8 CD25 FOXP3 Regulatory T Cells at Steady State and during Interleukin-2 Therapy. *Frontiers in Immunology* [online]. **6**(171), - [cit. 2017-11-09]. DOI: 10.3389/fimmu.2015.00171. ISSN 1664-3224. Dostupné z: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2015.00171/abstract>

JACOBS, Nathalie, Inge LANGERS, Virginie RENOUX, Marc THIRY a Philippe DELVENNE. Natural killer cells: role in local tumor growth and metastasis. *Biologics: Targets and Therapy* [online]. 2012, **6**, 73-82 [cit. 2018-03-04]. DOI: 10.2147/BTT.S23976. ISSN 1177-5475. Dostupné z: <http://www.dovepress.com/natural-killer-cells-role-in-local-tumor-growth-and-metastasis-peer-reviewed-article-BTT>

JANDOVÁ, Linda. (2017). Imunoterapie melanomu a pankreatického adenokarcinomu na myším modelu. Bakalářská práce. *Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích*, 51 s.

JANOTOVÁ, Tereza, Marie JALOVECKÁ, Marie AUEROVÁ, et al., 2014. The Use of Anchored Agonists of Phagocytic Receptors for Cancer Immunotherapy: B16-F10 Murine Melanoma Model. *PLoS ONE* [online]. **9**(1), 1-14 [cit. 2018-01-27]. DOI: 10.1371/journal.pone.0085222. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0085222>

- JONULEIT, Helmut a Edgar SCHMITT, 2003. The Regulatory T Cell Family: Distinct Subsets and their Interrelations. *The Journal of Immunology* [online]. **171**(12), 6323-6327 [cit. 2017-11-21]. DOI: 10.4049/jimmunol.171.12.6323. ISSN 0022-1767. Dostupné z: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.171.12.6323>
- JOSEFOWICZ, Steven, Li-Fan LU a Alexander RUDENSKY, 2012. Regulatory T Cells: Mechanisms of Differentiation and Function. *Annual Review of Immunology* [online]. **30**(1), 531-564 [cit. 2017-10-27]. DOI: 10.1146/annurev.immunol.25.022106.141623. ISSN 0732-0582. Dostupné z: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141623>
- KIMURA, Akihiro a Tadimitsu KISHIMOTO. IL-6: Regulator of Treg/Th17 balance. *European Journal of Immunology* [online]. 2010, **40**(7), 1830-1835 [cit. 2018-03-04]. DOI: 10.1002/eji.201040391. ISSN 00142980. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/eji.201040391>
- KLENER, Pavel, 2006. KLENER, Pavel. *Vnitřní lékařství*. 3. Praha: Galén, s. 95-100. ISBN 80-7262-430-X.
- KORNILUK, A., O. KOPER, H. KEMONA a V. DYMICKA-PIEKARSKA, 2017. From inflammation to cancer. *Irish Journal of Medical Science (1971 -)* [online]. **186**(1), 57-62 [cit. 2018-01-25]. DOI: 10.1007/s11845-016-1464-0. ISSN 0021-1265. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11845-016-1464-0>
- KYDD, Janel, Rahul JADIA, Praveena VELPURISIVA, Aniket GAD, Shailee PALIWAL a Prakash RAI, 2017. Targeting Strategies for the Combination Treatment of Cancer Using Drug Delivery Systems. *Pharmaceutics* [online]. **9**(46), 1-26 [cit. 2018-01-28]. DOI: 10.3390/pharmaceutics9040046. ISSN 1999-4923. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1999-4923/9/4/46>
- LE BON, Agnes a David TOUGH. Links between innate and adaptive immunity via type I interferon. *Current Opinion in Immunology* [online]. 2002, **14**(4), 432-436 [cit. 2018-03-04]. DOI: 10.1016/S0952-7915(02)00354-0. ISSN 09527915. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0952791502003540>
- LEI, Hong, Katharina SCHMIDT-BLEEK, Anke DIENELT, Petra REINKE a Hans-Dieter VOLK, 2015. Regulatory T cell-mediated anti-inflammatory effects promote successful tissue repair in both indirect and direct manners. *Frontiers in Pharmacology* [online].

6(184), 1-10 [cit. 2018-01-20]. DOI: 10.3389/fphar.2015.00184. ISSN 1663-9812. Dostupné z: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fphar.2015.00184/abstract>

LEVY, Antonin, Cyrus CHARGARI, Morgane CHEMINANT, Noémie SIMON, Céline BOURGIER a Eric DEUTSCH, 2013. Radiation therapy and immunotherapy: Implications for a combined cancer treatment. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* [online]. **85**(3), 278-287 [cit. 2018-01-29]. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2012.09.001. ISSN 10408428. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1040842812001758>

LIBERAL, Rodrigo, Charlotte GRANT, Maria Serena LONGHI, Giorgina MIELI-VERGANI a Diego VERGANI, 2015. Regulatory T cells: Mechanisms of suppression and impairment in autoimmune liver disease. *IUBMB Life* [online]. **67**(2), 88-97 [cit. 2018-01-11]. DOI: 10.1002/iub.1349. ISSN 15216543. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/iub.1349>

LI, Bin a Song Guo ZHENG, 2015. How regulatory T cells sense and adapt to inflammation. *Cellular and Molecular Immunology* [online]. **12**(5), 519-520 [cit. 2018-01-27]. DOI: 10.1038/cmi.2015.65. ISSN 1672-7681. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/cmi201565>

LIN, Xiaohong, Ya LIU, Zhiyong GUO, Long Guo ZHENG, Song Guo HE, Xiaoshun BRAND a Maogen CHEN, 2013. Advances in distinguishing natural from induced Foxp3(+) regulatory T cells. *International journal of clinical and experimental pathology* [online]. **6**(2), 116-123 [cit. 2018-01-23]. ISSN 1936-2625/IJCEP1210016. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/2014GB005021>

LITTMAN, Dan a Alexander RUDENSKY, 2010. Th17 and Regulatory T Cells in Mediating and Restraining Inflammation. *Cell* [online]. **140**(6), 845-858 [cit. 2018-01-27]. DOI: 10.1016/j.cell.2010.02.021. ISSN 00928674. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867410001741>

LIU, Chang, Creg WORKMAN a Dario VIGNALI, 2016. Targeting regulatory T cells in tumors. *The FEBS Journal* [online]. **283**(14), 2731-2748 [cit. 2018-01-15]. DOI: 10.1111/febs.13656. ISSN 1742464x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/febs.13656>

LOURENÇO, Elaine a Antonio LA CAVA, 2011. Natural regulatory T cells in autoimmunity. *Autoimmunity* [online]. **44**(1), 33-42 [cit. 2017-11-05]. DOI:

10.3109/08916931003782155. ISSN 0891-6934. Dostupné z:
<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/08916931003782155>

LUCKHEERAM, Rishi Vishal, Rui ZHOU, Asha Devi VERMA a Bing XIA, 2012. CD4 T Cells: Differentiation and Functions. *Clinical and Developmental Immunology* [online]. **2012**(925135), 1-12 [cit. 2018-01-23]. DOI: 10.1155/2012/925135. ISSN 1740-2522. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/jir/2012/925135/>

MASÁKOVÁ, Kamila (2016). Nádorová imunoterapie založená na mechanismech vrozené imunity a její optimalizace. Bakalářská práce. *Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích*, 48 s.

MIHO, Ito, Makino NAOHIKO a Ueno YOSHIYUKI, 2013. Glucose intolerance and the risk of pancreatic cancer. *Translational Gastrointestinal Cancer* [online]. 2013, **2**(4), 223-229 [cit. 2018-01-17]. DOI: 10.3978/j.issn.2224-4778.2013.09.01. Dostupné z: <http://www.amepc.org/tgc/article/view/2711/3782>

MULTHOFF, Gabriele, Michael MOLLS a Jürgen RADONS, 2012. Chronic Inflammation in Cancer Development. *Frontiers in Immunology* [online]. **2**(98), 1-17 [cit. 2018-01-25]. DOI: 10.3389/fimmu.2011.00098. ISSN 1664-3224. Dostupné z: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2011.00098/abstract>

NAPOLITANI, Giorgio, Andrea RINALDI, Francesco BERTONI, Federica SALLUSTO a Antonio LANZAVECCHIA, 2005. Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1–polarizing program in dendritic cells. *Nature Immunology* [online]. **6**(8), 769-776 [cit. 2018-03-13]. DOI: 10.1038/ni1223. ISSN 1529-2908. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/ni1223>

NEDBALOVÁ, Pavla (2017). Úloha vrozené a získané imunity v imunoterapii melanomu a pankreatického adenokarcinomu. Diplomová práce. *Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích*, 61 s.

NOMURA, Takashi a Shimon SAKAGUCHI, 2007. Foxp3 and Aire in thymus-generated Treg cells: a link in self-tolerance. *Nature Immunology* [online]. **8**(4), 333-334 [cit. 2017-11-12]. DOI: 10.1038/ni0407-333. ISSN 1529-2908. Dostupné z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/ni0407-333>

OH, Hyunju a Sankar GHOSH, 2013. NF- κ B: roles and regulation in different CD4 T-cell subsets. *Immunological Reviews* [online]. **252**(1), 41-51 [cit. 2018-01-11]. DOI:

10.1111/imr.12033. ISSN 01052896. Dostupné z:
<http://doi.wiley.com/10.1111/imr.12033>

ONISHI, Hideya, Takashi MORISAKI a Mitsuo KATANO, 2016. Regulatory T Cells. *Immunotherapy of Cancer* [online]. Tokyo: Springer Japan, 2016-02-23, **625**(1-3), s. 309-322 [cit. 2017-11-09]. DOI: 10.1007/978-4-431-55031-0_21. ISBN 10.1007/978-4-431-55031-0_21. ISSN 00142999. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/978-4-431-55031-0_21

PALMER, Ed, 2003. Cell death and immunity: Negative selection — clearing out the bad apples from the T-cell repertoire. *Nature Reviews Immunology* [online]. **3**(5), 383-391 [cit. 2018-01-11]. DOI: 10.1038/nri1085. ISSN 14741733. Dostupné z:
<http://www.nature.com/doi/10.1038/nri1085>

PARTECKE, L.I., M. SENDLER, A. KAEDING, et al., 2011. A Syngeneic Orthotopic Murine Model of Pancreatic Adenocarcinoma in the C57/BL6 Mouse Using the Panc02 and 6606PDA Cell Lines. *European Surgical Research* [online]. **47**(2), 98-107 [cit. 2018-01-22]. DOI: 10.1159/000329413. ISSN 1421-9921. Dostupné z:
<https://www.karger.com/Article/FullText/329413>

PASARE, Chandrasherkar a Ruslan MEDZHITOV. Toll Pathway-Dependent Blockade of CD4+CD25+ T Cell-Mediated Suppression by Dendritic Cells. *Science* [online]. 2003, **299**(5609), 1033-1036 [cit. 2018-03-04]. DOI: 10.1126/science.1078231. ISSN 00368075. Dostupné z: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1078231>

PESCOVITZ, Mark, 2006. Rituximab, an Anti-CD20 Monoclonal Antibody: History and Mechanism of Action. *American Journal of Transplantation* [online]. **6**(5p1), 859-866 [cit. 2018-01-30]. DOI: 10.1111/j.1600-6143.2006.01288.x. ISSN 16006135. Dostupné z:
<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-6143.2006.01288.x>

PETERSON, Richard, 2012. Regulatory T-Cells: Diverse Phenotypes Integral to Immune Homeostasis and Suppression. *Toxicologic Pathology* [online]. **40**(2), 186-204 [cit. 2017-11-05]. DOI: 10.1177/0192623311430693. ISSN 0192-6233. Dostupné z:
<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0192623311430693>

POSTOW, Michael, Margaret CALLAHAN a Jedd WOLCHOK, 2015. Immune Checkpoint Blockade in Cancer Therapy. *Journal of Clinical Oncology* [online]. **33**(17), 1974-1982 [cit.

2018-01-30]. DOI: 10.1200/JCO.2014.59.4358. ISSN 0732-183x. Dostupné z:
<http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2014.59.4358>

PRIEBE, Teresa S., Edward N. ATKINSON, Bih-Fang PAN a J. Arly NELSON, 1992. Intrinsic resistance to anticancer agents in the murine pancreatic adenocarcinoma PANC02. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* [online]. **29**(6), 485-489 [cit. 2018-01-22]. DOI: 10.1007/BF00684853. ISSN 0344-5704. Dostupné z:
<http://link.springer.com/10.1007/BF00684853>

QIAO, Yong-chao, Yan-hong PAN, Wei LING, Fang TIAN, Yin-ling CHEN, Xiao-xi ZHANG a Hai-lu ZHAO, 2017. The Yin and Yang of regulatory T cell and therapy progress in autoimmune disease. *Autoimmunity Reviews* [online]. **16**(10), 1058-1070 [cit. 2017-10-28]. DOI: 10.1016/j.autrev.2017.08.001. ISSN 15689972. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1568997217302070>

RUDDON, Raymond, 2007. *Cancer biology* [online]. 4th ed. New York: Oxford University Press, s. 4-53 [cit. 2018-01-21]. ISBN 9780195175431. Dostupné z:
[http://ksrbiotech.com/uploads/Cancer%20Biology%204th%20ed%20-%20R.%20Ruddon%20\(Oxford,%202007\)%20WW.pdf](http://ksrbiotech.com/uploads/Cancer%20Biology%204th%20ed%20-%20R.%20Ruddon%20(Oxford,%202007)%20WW.pdf)

RYAN, David, Theodore HONG a Nabeel BARDEESY, 2014. Pancreatic Adenocarcinoma. *New England Journal of Medicine* [online]. **371**(11), 1039-1049 [cit. 2017-10-31]. DOI: 10.1056/NEJMra1404198. ISSN 0028-4793. Dostupné z:
<http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMra1404198>

SAKAGUCHI, Shimon, Kajsia WING a Makoto MIYARA, 2007. Regulatory T cells – a brief history and perspective. *European Journal of Immunology* [online]. **37**(S1), 116-123 [cit. 2017-10-27]. DOI: 10.1002/eji.200737593. ISSN 00142980. Dostupné z:
<http://doi.wiley.com/10.1002/eji.200737593>

SAKAGUCHI, Shimon, Kajsia WING, Yasushi ONISHI, Paz PRIETO-MARTIN a Tomoyuki YAMAGUCHI, 2009. Regulatory T cells: how do they suppress immune responses? *International Immunology* [online]. **21**(10), 1105-1111 [cit. 2017-11-08]. DOI: 10.1093/intimm/dxp095. ISSN 0953-8178. Dostupné z:
<https://academic.oup.com/intimm/article-lookup/doi/10.1093/intimm/dxp095>

SAKAGUCHI, Shimon, Tomoyuki YAMAGUCHI, Takashi NOMURA a Masahiro ONO, 2008. Regulatory T Cells and Immune Tolerance. *Cell* [online]. **133**(5), 775-787 [cit. 2017-

10-27]. DOI: 10.1016/j.cell.2008.05.009. ISSN 00928674. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867408006247>

SAWYERS, Charles, 2004. Targeted cancer therapy. *Nature* [online]. **432**, 294-297 [cit. 2018-01-28]. DOI: 10.1038/nature03095. ISSN 0028-0836. Dostupné z:
<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nature03095>

SCHMITT, Erica a Calvin WILLIAMS, 2013. Generation and Function of Induced Regulatory T Cells. *Frontiers in Immunology* [online]. **4**(152), 1-13 [cit. 2017-11-18]. DOI: 10.3389/fimmu.2013.00152. ISSN 1664-3224. Dostupné z:
<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2013.00152/abstract>

SIEGEL, Rebecca, Kimberly MILLER a Ahmedin JEMAL, 2016. Cancer statistics, 2016. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* [online]. **66**(1), 7-30 [cit. 2018-01-21]. DOI: 10.3322/caac.21332. ISSN 00079235. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.3322/caac.21332>

SMITH, Aaron, John OERTLE a Dino PRATO, 2014. Immunotherapy in Cancer Treatment. *Open Journal of Medical Microbiology* [online]. **4**(3), 178-191 [cit. 2018-01-30]. DOI: 10.4236/ojmm.2014.43020. ISSN 2165-3372. Dostupné z:
<http://www.scirp.org/journal/doi.aspx?DOI=10.4236/ojmm.2014.43020>

SUDHAKAR, Akulapalli, 2009. History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods. *Journal of Cancer Science and Therapy* [online]. **1**(2), 1-4 [cit. 2018-01-28]. DOI: 10.4172/1948-5956.100000e2. ISSN 19485956. Dostupné z:
<https://www.omicsonline.org/ArchiveJCST/2009/December/03/Editorial.php>

TAI, Xuguang, Francois VAN LAETHEM, Leonid POBEZINSKY, et al., 2012. Basis of CTLA-4 function in regulatory and conventional CD4 T cells. *Blood* [online]. **119**(22), 5155-5163 [cit. 2018-02-03]. DOI: 10.1182/blood-2011-11-388918. ISSN 0006-4971. Dostupné z: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2011-11-388918>

TAKAHAMA, Yousuke, 2006. Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nature Reviews Immunology* [online]. **6**(2), 127-135 [cit. 2017-11-12]. DOI: 10.1038/nri1781. ISSN 1474-1733. Dostupné z:
<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nri1781>

TAKEUCHI, Yoshiko a Hiroyoshi NISHIKAWA, 2016. Roles of regulatory T cells in cancer immunity. *International Immunology* [online]. **28**(8), 401-409 [cit. 2017-10-26].

DOI: 10.1093/intimm/dxw025. ISSN 0953-8178. Dostupné z:

<https://academic.oup.com/intimm/article-lookup/doi/10.1093/intimm/dxw025>

TANG, Qizhi a Jeffrey BLUESTONE, 2013. Regulatory T-Cell Therapy in Transplantation: Moving to the Clinic. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* [online]. **3**(11), 1-15

[cit. 2018-01-11]. DOI: 10.1101/cshperspect.a015552. ISSN 2157-1422. Dostupné z:

<http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a015552>

VAN DER VEEKEN, Joris, Alvaro GONZALEZ, Hyunwoo CHO, Aaron ARVEY, Christina LESLIE a Alexander RUDENSKY, 2016. Memory of Inflammation in Regulatory T Cells. *Cell* [online]. **166**(4), 977-990 [cit. 2018-01-27]. DOI: 10.1016/j.cell.2016.07.006.

ISSN 00928674. Dostupné z:

<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867416309126>

VELAGA, Sarvari, Sya N. UKENA, Ulrike DRINGENBERG, Christina ALTER, Julian PARDO, Olivia KERSHAW a Anke FRANZKE, 2015. Granzyme A Is Required for Regulatory T-Cell Mediated Prevention of Gastrointestinal Graft-versus-Host Disease. *PLOS ONE* [online]. **10**(4), 1-9 [cit. 2018-01-11]. DOI: 10.1371/journal.pone.0124927. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0124927>

VIGNALI, Dario, Lauren COLLISON a Creg WORKMAN, 2008. How regulatory T cells work. *Nature Reviews Immunology* [online]. **8**(7), 523-532 [cit. 2017-10-27]. DOI:

10.1038/nri2343. ISSN 1474-1733. Dostupné z:

<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nri2343>

VONDERHEIDE, Robert a Martin GLENNIE. Agonistic CD40 Antibodies and Cancer Therapy. *Clinical Cancer Research* [online]. 2013, **19**(5), 1035-1043 [cit. 2018-03-04]. DOI:

10.1158/1078-0432.CCR-12-2064. ISSN 1078-0432. Dostupné z:

<http://clincancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1078-0432.CCR-12-2064>

WALDMANNOVÁ, Eva, Veronika CAISOVÁ, Julie FÁBEROVÁ, et al., 2016. The use of Zymosan A and bacteria anchored to tumor cells for effective cancer immunotherapy: B16-F10 murine melanoma model. *International Immunopharmacology* [online]. **39**, 295-306

[cit. 2018-02-05]. DOI: 10.1016/j.intimp.2016.08.004. ISSN 15675769. Dostupné z:

<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567576916303216>

WALSH, Patrick, Devon TAYLOR a Laurence TURKA, 2004. Tregs and transplantation tolerance. *Journal of Clinical Investigation* [online]. **114**(10), 1398-1403 [cit. 2018-01-11].

DOI: 10.1172/JCI200423238. ISSN 0021-9738. Dostupné z:

<http://www.jci.org/articles/view/23238>

WHITESIDE, Theresa, 2015. The role of regulatory T cells in cancer immunology.

ImmunoTargets and Therapy [online]. **2015**(4), 159-171 [cit. 2018-01-23]. DOI:

10.2147/ITT.S55415. ISSN 2253-1556. Dostupné z: <http://www.dovepress.com/the-role-of-regulatory-t-cells-in-cancer-immunology-peer-reviewed-article-ITT>

WHITESIDE, Theresa L., 2014. Regulatory T cell subsets in human cancer: are they regulating for or against tumor progression? *Cancer Immunology, Immunotherapy* [online].

63(1), 67-72 [cit. 2018-01-22]. DOI: 10.1007/s00262-013-1490-y. ISSN 0340-7004.

Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00262-013-1490-y>

WILSON, Robert, Malavika CHANDRA, James SCHEIMAN, Diane SIMEONE, Barbara MCKENNA, Julianne PURDY a Mary-Ann MYCEK, 2009. Optical spectroscopy detects histological hallmarks of pancreatic cancer. *Optics Express* [online].

17(20), 17502-17516 [cit. 2017-10-31]. DOI: 10.1364/OE.17.017502. ISSN 1094-4087. Dostupné z:

<https://www.osapublishing.org/oe/abstract.cfm?uri=oe-17-20-17502>

WING, Kajsa, Yasushi ONISHI, Paz PRIETO-MARTIN, Tomoyuki YAMAGUCHI,

Makoto MIYARA, Zoltan FEHERVARI, Takashi NOMURA a Shimon SAKAGUCHI,

2008. CTLA-4 Control over Foxp3 Regulatory T Cell Function. *Science* [online]. **322**(5899),

271-275 [cit. 2018-02-04]. DOI: 10.1126/science.1160062. ISSN 0036-8075. Dostupné z:

<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1160062>

WINOGRAD, Rafael, Katelyn BYRNE, Rebecca EVANS, et al., 2015. Induction of T-cell Immunity Overcomes Complete Resistance to PD-1 and CTLA-4 Blockade and Improves Survival in Pancreatic Carcinoma. *Cancer Immunology Research* [online].

3(4), 399-411 [cit. 2018-02-04]. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-14-0215. ISSN 2326-6066. Dostupné z:

<http://cancerimmunolres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/2326-6066.CIR-14-0215>

WOLCHOK, Jedd a Yvonne SAENGER. The Mechanism of Anti-CTLA-4 Activity and the Negative Regulation of T-Cell Activation. *The Oncologist* [online]. 2008, **13**(Supplement 4),

2-9 [cit. 2018-03-04]. DOI: 10.1634/theoncologist.13-S4-2. ISSN 1083-7159. Dostupné z:

<http://theoncologist.alphamedpress.org/cgi/doi/10.1634/theoncologist.13-S4-2>

WORKMAN, Creg, Andrea SZYMCZAK-WORKMAN, Lauren COLLISON, Meenu

PILLAI a Dario VIGNALI, 2009. The development and function of regulatory T cells.

Cellular and Molecular Life Sciences [online]. **66**(16), 2603-2622 [cit. 2017-11-22]. DOI: 10.1007/s00018-009-0026-2. ISSN 1420-682x. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00018-009-0026-2>

XIE, Dacheng a Keping XIE. Pancreatic cancer stromal biology and therapy. *Genes and Diseases* [online]. 2015, **2**(2), 133-143 [cit. 2018-03-04]. DOI: 10.1016/j.gendis.2015.01.002. ISSN 23523042. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2352304215000070>

XU, Lili, Atsushi KITANI, Ivan FUSS a Warren STROBER. Cutting Edge: Regulatory T Cells Induce CD4+CD25-Foxp3- T Cells or Are Self-Induced to Become Th17 Cells in the Absence of Exogenous TGF- β . *The Journal of Immunology* [online]. 2007, **178**(11), 6725-6729 [cit. 2018-03-04]. DOI: 10.4049/jimmunol.178.11.6725. ISSN 0022-1767. Dostupné z: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.178.11.6725>

YAMAGUCHI, Yoshiyuki, 2016. Overview of Current Cancer Immunotherapy. *Immunotherapy of Cancer* [online]. Tokyo: Springer Japan, 2016-02-23, s. 3-17 [cit. 2018-01-30]. DOI: 10.1007/978-4-431-55031-0_1. ISBN 978-4-431-55031-0. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/978-4-431-55031-0_1

ZHAO, Jingxian, Jincun ZHAO a Stanley PERLMAN. Differential Effects of IL-12 on Tregs and Non-Treg T Cells: Roles of IFN- γ , IL-2 and IL-2R. *PLoS ONE* [online]. 2012, **7**(9), 1-12 [cit. 2018-03-04]. DOI: 10.1371/journal.pone.0046241. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0046241>

ZHANG, Huiyun, Hui KONG, Xiaoning ZENG, Lianyi GUO, Xiaoyun SUN a Shaoheng HE, 2014. Subsets of regulatory T cells and their roles in allergy. *Journal of Translational Medicine* [online]. **12**(125), 1-11 [cit. 2017-11-22]. DOI: 10.1186/1479-5876-12-125. ISSN 1479-5876. Dostupné z: <http://translational-medicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/1479-5876-12-125>