

Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity

Bakalářská práce:

POUŽITÍ PATOGENNÍCH ORGANISMŮ A JEJICH
ČÁSTÍ K TERAPII NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ



Autor: Veronika Caisová

Vedoucí práce: RNDr. Jan Fienka, CSc.

České Budějovice 2011

Caisová, V., (2011): Použití patogenních organismů a jejich částí k terapii nádorových onemocnění. [The application of the pathogen organisms and their parts to tumor immunotherapy. Bc. Thesis, in Czech], 47p, Faculty of Sciences, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace

The present study is dealing with the possibility of the application either complete pathogen organisms or their parts to tumor immunotherapy. The complete history from the first observations of the spontaneous regressions induced by infection diseases leading to the current treatment using pathogen associated molecular patterns has been evaluated.

Prohlášení

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

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

Ve Českých Budějovicích, 26. 4. 2011

Veronika Caisová

Poděkování

V této části práce bych chtěla poděkovat svému školiteli RNDr. Janu Fienkovi, CSc, který mi byl vždy nápomocen, poskytoval mi řadu materiálů a trpělivě snášel veškeré mé dotazy. Díky si zaslouží samozřejmě i má rodina, která mě podporuje v celém průběhu studia.

Obsah

1. ÚVOD	1
2. CÍLE PRÁCE	1
3. REŠERŠE	2
3.1. Co jsou to nádorová onemocnění	2
3.2. Faktory vzniku nádorového onemocnění	2
3.3. Způsoby léčby nádorových onemocnění	3
3.4. Imunoterapie nádorových onemocnění	4
3.4.1. Mechanismy úniku nádorových buněk.....	4
3.4.2. Imunoterapie za pomoci získané (adaptivní) imunity.....	5
3.4.3. Imunoterapie za pomoci přirozené (vrozené) imunity.....	5
3.5. Role infekčních onemocnění v nádorovém bujení	7
3.5.1. Infekce jako příčina vzniku nádorových onemocnění.....	7
3.5.2. Infekce jako způsob léčby nádorových onemocnění.....	8
3.6. Historie bakteriální terapie nádorových onemocnění	9
3.6.1. Spontánní regrese nádorových onemocnění	10
3.6.2. William B. Coley	12
3.6.3. Coleyho toxiny.....	13
3.6.4. BCG vakcíny	15
3.6.5. Terapie bakteriemi specificky rostoucími v nádorovém mikroprostředí	16
3.6.6. Léčba pomocí PAMPs.....	18
3.6.6.1. Využití PAMPs v protinádorové imunoterapii	23
3.6.6.2. Budoucnost léčby pomocí PAMPs.....	28
4. ODPOVĚDI NA OTÁZKY POSTULOVANÉ V KAPITOLE -CÍLE PRÁCE	29
5. ZÁVĚR	39
POUŽITÁ LITERATURA	40

1. Úvod

Nádorová onemocnění jsou stále závažným zdravotním problémem. Jedním z moderních směrů léčby je imunoterapie. Ta má velmi staré základy, již před mnoha lety si lékaři všíli vztahu infekčních onemocnění a nádorové regrese. Je proto velmi zajímavé procházet celou historií, hledat souvislosti a pokusit se najít poučení i pro současný výzkum.

2. Cíle práce

Cílem práce je poskytnout odpovědi na otázky možnosti použití patogenních organismů a jejich částí k terapii nádorových onemocnění zmapováním vývoje poznání od historických prvopokřádků až do současné doby.

1/ Je nějaký rozdíl v používání gram pozitivních nebo gram negativních bakterií v léčbě nádorových onemocnění a je jejich síla stimulace imunitního systému stejná intenzivní?

2/ Je efektivnější používat živé, atenuované nebo inaktivované bakterie?

3/ Je lepší používat celá těla bakterií nebo jen části bakterií?

4/ Je lepší použít jeden TLR ligand nebo směs TLR ligandů?

5/ Má lepší léčebný efekt aktivace vnitřních i vnějších TLRů?

3. Rešerše

3.1. Co jsou to nádorová onemocnění

Termín nádorová onemocnění i ve ejnosti znám j-í p ízvisko rakovina je v sou asné dob velmi diskutovaným tématem, týká se totiž velké ásti lidské populace. Nádorová bujení se dokonce stala jednou ze t í nej ast j-ích p í in smrtí lov ka (Krejsek a Kopecký 2004).

Nádorové bujení je v sou asnosti definováno jako proces, vedoucí k akumulaci genetických poruch v bu ce. Tyto poruchy aktivují bun né protoonkogeny a inaktivují antionkogeny (Krejsek a Kopecký 2004).

Ve v t-in p ípad je bun ný cyklus regulován adou mechanism , podstatnou roli zde hrají dv skupiny bílkovin (cyklin-dependentní kinázy a cykliny), ale z d vodu nahromad ných genetických poruch v bu ce m fle dojít k poru-ení regulace a bu ka se za ne nekontrolovateln množit (Hirama a Koeffler 1995). Celý proces je velmi složitý, a dlouho se ho v dci pokou-eli odhalit. Dnes je již celkem dob e zmapován, p esto zde z stává celá ada proces zahalených rou-kou tajemství. Co je ale skute n prokázané a zároveň velmi zajímavé, fle nádory vznikají z jedné jediné bu ky (Krejsek a Kopecký 2004).

Nádory mohou být maligní i benigní. Na rozdíl od benigních nádor , bu ky maligních nádor mají schopnost pronikat krevním e i-t m a lymfatickými cestami do tkání celého t la, což vede ke vzniku metastáz (Opdenakker a Van Damme 2004). Maligní nádor je pro pacienta velmi nebezpe ný a asto i smrtelný (Krejsek a Kopecký 2004).

3.2. Faktory vzniku nádorového onemocnění

P í in vzniku nádorových onemocnění je celá ada, jednou z nich je vy-í procento nahromad ných mutací, které souvisí s prodlufováním v ku lidí. Mutace mohou být způsobeny adou faktor . Lidé mutageny p íjímají například v potrav (Comings 1973). Známým mutagenem je UV zá ení a jiné chemické slou eniny nacházející se například v cigaretovém kou i a automobilových zplodinách. V-echny tyto faktory se mohou významn podílet na zvý-eném výskytu nádorového bujení (p ehled poznatk Ames a kol. 1995). V n kterých p ípadech je prokázána i genetická predispozice (p ehled poznatk Ames a kol. 1995).

3.3. Způsoby léčby nádorových onemocnění

Základním způsobem léčby nádorových onemocnění je chirurgická léčba, tedy operativní vyjmutí nádorové tkáně z těla pacienta. Ve většině případů poté následuje chemoterapie a radioterapie (Creech a kol. 1958).

Při chemoterapii se používají vysoké dávky cytostatik, které jsou toxické pro neustále se dělící buňky lidského těla. Některé druhy cytostatik fungují na principu napadání buněk ve fázi dělení, proto neustále se dělící nádorové buňky jsou tímto cytostatiky více zasaženy, než buňky zdravé. Nádorové buňky mají přibližně o polovinu nižší rychlost proliferace oproti jiným buňkám se dělícím buňkám v těle (např. buňky kostní dřeně). Díky tomuto faktu je možné opakovaným podáváním cytostatik redukovat (Creech a kol. 1958).

Dalším způsobem léčby je radioterapie fungující na principu ionizujícího záření. Energie tohoto záření je namířena na nádorové buňky a tím je poškozena a ničí (Delaney a kol. 2005). Každý typ nádorového bujení je velmi specifický, proto také nelze rakovinu léčit pouze jediným způsobem terapie. Některé nádory na chemoterapii reagují velmi dobře, jiné zase vůbec, proto je úspěšnost léčby individuální (Krejsek a Kopecký 2004). Velkým problémem těchto terapií je fakt, že nepoškozují jen nádorové buňky, ale i buňky zdravé. Celé tělo pacienta je velmi oslabené, imunita je neschopná chránit tělo před bakteriálními a virovými onemocněními. Dochází ke ztrátě vlasů, poškození nehtové tkáně a dalších buněk, které se v lidském těle přirozeně dělí rychleji než ostatní. Problémem může být i následná neplodnost jak u mužů, tak i u žen. Z tohoto důvodu se výzkumy v posledních desítkách let věnují hlavně cíleným terapiím, které by eliminovaly jen nádorové buňky bez dalšího poškození organismu (Chen a kol. 2000). Jednou z takovýchto terapií je i imunoterapie.

Imunitní systém, není ve většině případů schopen sám o sobě bojovat proti nádorovému onemocnění. Naopak, paradoxně, nádor může tělo pomáhat. Cílená imunoterapie se snaží vyvolat imunitu těla k boji proti onemocnění, a to pomocí vrozené i získané imunity. (Holmes a kol. 1977).

Existují i další léčebné metody, které jsou více používány než které méně často, patří mezi ně například biologická terapie, terapie pomocí hormonů a hormonálních přípravků. Jako poslední východisko se volí dokonce i alternativní léčba (Klener a Klener 2009).

Určit by bylo podnětné ohlédnout se do minulosti k pokrokům léčebných technik. Právě kombinace poznatků z historie a dnešních znalostí by mohla být klíčem k úspěchu nalézt odpovídající léčbu nádorových onemocnění.

3.4. Imunoterapie nádorových onemocnění

V čem se vlastně liší imunoterapie od jiných léčebných metod? Imunoterapie je založena na léčebných postupech vyvolávajících obranné mechanismy imunitního systému k léčbě onemocnění, v tomto případě k léčbě rakoviny (Overwijk a Restifo 2000). V posledních letech je tento typ terapie intenzivně studován, a na určitých typech rakoviny je i klinicky aplikován (přehled poznatků Meyer a kol. 2002).

3.4.1. Mechanismy úniku nádorových buněk

Otázka, kterou si většina lidí klade je, proč imunita nezabrání růstu nádoru přirozeným způsobem, anebo by musela být nějak indukována, nebo proč vůbec dovolí vznik nádoru? Není pravda, že by imunita byla zcela bezmocná. Důkaz toho můžeme spatřovat v tom, že většina malignit se objevuje se zvyklým se v tkáních. Své tkáně se zvyklé po četných mutacích vyskytujících se v buňkách a zároveň klesá účinnost imunitního systému. (Ershler 1993).

Další příčinou je i neustálý selekční tlak, který vytváří imunita na nádorové buňky a ty se pak přirozeně stávají odolnějšími proti imunitnímu nátlaku (existuje zde obdoba přirozeného výběru), (Klein a kol. 1999).

Přesto určitý imunitní dohled pravděpodobně existuje, zajímavým vysvětlením těchto mechanismů je hypotéza postulovaná Dunn a kol. (2004) – „Cancer immune editing“, která uvádí, že míra imunogenicity nádoru je závislá na hostiteli, ve kterém nádor roste. Podle Dunn a kol. (2004) existují tři úrovně boje imunitního systému proti nádorovému bujení. Prvním z nich je eliminace transformovaných buněk, druhým je ustanovení rovnováhy mezi transformovanými buňkami a organismem, a třetím je únik transformovaných buněk před kontrolou imunitního systému. Rovnováha nemusí vždy vyústit v únik nádorových buněk před imunitním systémem. Například rovnováha může mít dlouhodobé trvání a k úniku vůbec nemusí dojít, nebo může dokonce dojít ke kompletní eliminaci nádorových buněk. Bohužel ve většině případů je výsledkem úniku a následný rozvoj klinického onemocnění (Dunn a kol. 2004).

Nádorové buňky si vytvořily vlastní únikové mechanismy, které jim dovolí zstat imunitou nepovímané a dávají jim možnost proliferace. Například nádory produkují TGF- β (transforming growth factor β), jehož vlivem dochází k tvorbě regulačních lymfocytů Treg, které nastolují imunitotoleranci nádoru (Krejsek a Kopecký 2004).

3.4.2. Imunoterapie za pomoci získané (adaptivní) imunity

Základní slofkou adaptivní imunity jsou T- a B-lymfocyty, které jsou zodpovědné za buněnou odpověď a tvorbu protilátek. Na rozdíl od imunity vrozené, adaptivní imunita dokáže velmi specificky rozpoznat antigeny. Je schopna si vytvářet tzv. paměťové buňky, které zajistí rychlejší reakci při sekundárním patogenním útoku (Janeway 2005).

Aby byly buňky adaptivní imunity schopné identifikovat nádorové bujení, musí mít buňky nádoru na povrchu specifické struktury. Tyto struktury jsou různé nádorové antigeny, například (1) nádorové testikulární antigeny (CT), zahrnující několik dalších rodin nádorových antigenů (například MAGE, BAGE, GAGE), (Krejsek a Kopecký 2004), (2) diferenciální antigeny a (3) nádorově specifické antigeny. Bohužel ani tyto specifické struktury na nádorových buňkách nezajistí dostatečnou imunitní reakci k eliminaci nádorových buněk (Krejsek a Kopecký 2004).

Existují však některé léčebné metody, které jsou založené na mechanismech způsobujících aktivaci a nastartování specifické imunitní odpovědi. V praxi jsou používány monoklonální protilátky proti nádorovým buňkám, které jsou úspěšné v aktivaci komplementu, fagocytózy i reakce ADCC (Antibody dependent cellular cytotoxicity). Všechny buňky v nádoru však nejsou stejné, a právě proto působí monoklonální protilátka pouze na některé z nich (Oldham 1983).

Monoklonální protilátky mohou být využity jako tzv. směrovací slofky. Na monoklonální protilátku se naváže radioaktivní izotop nebo toxická látka, a ty jsou cíleně dopravovány k buňkám nádoru, bez poškození okolní zdravé tkáně (Volkert a kol. 1991).

3.4.3. Imunoterapie za pomoci přirozené (vrozené) imunity

Vrozená imunita je méně specifickým typem imunitní reakce, je to reakce nejstaršího typu obrany těla. Její hlavní slofkou je komplement a buňky vykonávající fagocytózu. Fagocytární buňky po likvidaci patogenů dokážou prezentovat části patogenu na svém povrchu a poskytnout je tak i dalším buňkám imunitního systému. Nespecifická imunita na rozdíl od specifické postrádá tvorbu paměťových buněk (Medzhitov a Janeway 1997).

Ve většině imunoterapií byla považována za klíčovou slofku pouze adaptivní imunita. Na rozdíl od adaptivní imunity, kde je vyvinut rozsáhlý systém, kterým se nádor brání imunitnímu útoku (identický se systémem, sloužícím k ochraně trofoblastu), v případě vrozené imunity se tyto systémy nevyvinuly. Inspirací pro hlubší studium této oblasti a pro

vypracování této práce nám byly etné zmínky o pouflití patogenních organism v boji proti rakovin ústící v sou asné pouflití izolovaných i syntetických patogenních motiv (PAMPs). Zejména práce Hicks a kol. (2006), potvrzující, že za ur itých okolností (zejména na úrovni rozpoznání) je vrozená imunita schopna zlikvidovat i pokro ilé nádory s neoby ejn vysokou ú inností.

Záznamy o aktivaci vrozené imunity za ú elem potla ení nádor sahají daleko do historie. K prvním výrazným úsp ch m této terapie pat í objev W. Coleyho, který svou lé bou prokázal, že prudká infekce a teplota nastartovala vrozenou imunitu na takovou úrove , že za ala bojovat proti nádorovým bu kám a eliminovala je (Coley 1891, Coley 1910). Pokra ováním této terapie ov-em na podstatn sofistikovan j-í úrovni je pouflití PAMPs v imunoterapii nádorových onemocn ní.

Pathogen Associated Molecular Patterns (PAMPs), obecné struktury (vysoce konzervativní) sdílené mnoha patogeny, jsou slofkou v t-iny bun ných st n patogen (nap . LPS - lipopolysacharid, peptidoglykany, kyselina lipoteichoová, bakteriální manany, glukany, flagelin a bakteriální DNA), (Hobohm a kol. 2008). Tyto struktury se uplat ují ve vrozené ásti imunitního systému díky schopnosti vrozené imunity rozli-ovat mezi vlastními strukturami a strukturami mikroorganism . Receptory schopné identifikovat PAMPs mikroorganism se ozna ují jako Pattern Recognition Receptors (PRR), (Akira a kol. 2006).

PRR rozd lujeme do t ech skupin: (1) sekretované PRR, do kterých pat í nap . CRP, specificky se vázající na PAMPs. Spou-tí komplementovou kaskádu vedoucí k opsonizaci a k urychlení fagocytózy. mannose binding lectin (MBL), který se váže na manozové zbytky a vyskytuje se na povrchu hub a bakterií (Takahashi a kol. 2006). (2) skupina signálních PRR, do kterých adíme Toll-like receptors (TLR), adí se sem i d leflité NOD receptory, které rozpoznávají bakteriální peptidoglykan na základ muramyl dipeptid . (3) skupina fagocytárních receptor , nacházejících se na povrchu fagocytujících bun k. Do této skupiny pat í manozový receptor na povrchu makrofág a dendritických bun k. Jedná se o takzvaný multilektinový receptor, který má schopnost rozpoznávat manózu na povrchu infek ních agens a tím aktivuje fagocytózu patogen . Do této skupiny dále adíme formyl peptidové receptory (FPR1, FPRL1, FPRL2) rozpoznávající zejména peptidy za ínající f-M, nej ast ji pak f-MLF. Významným fagocytárním receptorem je Dectin 1, který rozpoznává beta glukan.

N které ligandy aktivují jak signální, tak i fagocytární receptory. Nap íklad beta glukan je rozpoznáván signálním receptorem TLR2 i fagocytárním receptorem Dectinem1. Práv v jejich vyufití spat ujeme velkou perspektivu, nebo pro správný imunologický atak nesta í

provést jen aktivaci systému vedoucí k mohutné buněčné infiltraci, ale je třeba správně zacílit i výkonnou fagocytární část (Janeway a Medzhitov 2002, Krejsek a Kopecký 2004).

PRR jsou exprimovány na adhektorových buňkách přirozené imunity (např. makrofágy, dendritické buňky). Identifikace vzorů PAMPs buňkami přirozené imunity zajistí téměř okamžitou odpověď imunitního systému na neškodlivé podněty. A toho lze využít v imunoterapii nádorových onemocnění (Janssens a Beyaert 2003).

3.5. Role infekčních onemocnění v nádorovém bujení

Velmi zajímavý je pohled na roli infekčních onemocnění v nádorovém bujení. Pokud budeme pozorně prohledat různé literární zdroje, zjistíme, že v nich je infekční onemocnění označováno jako příčina vzniku nádoru. Avšak existují i zdroje, kde je infekce využívána k léčbě nádorových onemocnění. Nejednotný je i pohled na vzniknutí části odborné veřejnosti se na něj dívá jako na prostředí jednoznačně podporující růst nádoru (Martins-Green a kol. 1994, Ohshima a Bartsch 1994, Kuper a kol. 2000, Mantovani a kol. 2008). Část vědců však využívá možnost namířit zánět proti nádoru a způsobit tak jeho destrukci (Nauts a kol. 1945, Oelschlaeger 2010, Rakoff-Nahoum a Medzhitov 2009).

3.5.1. Infekce jako příčina vzniku nádorových onemocnění

Infekční onemocnění je stav, kdy infekční agens (bakterie, houby, viry, červy, patogenní bílkoviny v podobě prionů) proniknou do organismu a naruší vnitřní prostředí hostitele (Thomson a Smith 1994).

V mnoha zdrojích se dočteme, že infekce (zejména chronická) může být zodpovědná za určitou část maligních nádorů u lidí (až 15% z celkového počtu nádorových bujení). V rozvinutých zemích je počet nádorových bujení nižší díky zdokonaleným diagnostickým metodám, které umožní rozpoznat infekci již v raném stádiu (Mantovani a kol. 2008).

Prvním člověkem, který prokázal, že infekce může způsobovat nádorová onemocnění, v tomto případě šlo o sarkom, byl Peyton Rous, a to roku 1911 svým pokusem, kterým dokázal, že sarkom u kuřete byl způsoben virem, nazývaným šRous sarcoma virus. (Rous 1911).

Velkým problémem je neléčená infekce, která později přechází do chronické infekce. Tato chronická infekce způsobuje zvýšenou tvorbu vysoce reaktivních látek, jako jsou např.

reaktivní produkty kyslíku a dusíku. Ty mohou vést k poškození buněk a následným změnám v DNA a také vzniku rakoviny (Ohshima a Bartsch 1994).

Dalším důvodem nádorových bujení iniciovaných infekcím může být imunosuprese, která je dobře známá u řady virových onemocnění. Příkladem tohoto jevu je virus HIV, který svým působením ovlivňuje imunitu. Virus HIV způsobuje utlumení imunitních reakcí v těle, a proto je lidský imunitní systém proti tomuto viru neúčinný. Zároveň však dochází k utlumení protinádorové imunity, a může zde velmi snadno začít nádorové bujení (Grulich a kol. 1999).

HIV virus není jediný známý patogen predisponující ke vzniku nádorů, dále sem také řadíme nyní velmi diskutovaný lidský papillomavirus, způsobující podle odhadů až 50% rakoviny děložního čípku u žen (Stanley a kol. 2007).

Významný je i virus Epstein-Barrové (EBV) a lidský T-buněný lymfotrofický virus. Ani bakteriální infekce nejsou výjimkou, často uváděným příkladem je bakterie *Helicobacter pylori*, která může způsobit rakovinu žaludku (Forman 1998).

Na základě důkazů můžeme skutečně pozorovat vztah mezi infekčním onemocněním a vznikem nádorových onemocnění. Největším problémem je zde chronická infekce, protože naopak při negativním působením mnohem déle, než akutní infekce. Za prevencí může být považováno včasné rozpoznání infekce a následná včasná léčba.

3.5.2. Infekce jako způsob léčby nádorových onemocnění

Zpočátku se snad může zdát nesmyslné přemýšlet na infekci jako na způsob léčby nádorových onemocnění, ale již z historických záznamů je toto tvrzení podporováno, jako jeden z možných přístupů k terapii nádorových onemocnění (Coley 1891, Coley 1910, McCarthy 2006, Oelschlaeger 2010).

Jak je vůbec možné, že v některých případech infekce vyvolá vznik nádoru a v jiných případech může být naopak nápomocná ve vyléčení novotvaru? A se to zdá paradoxní je tomu tak. Bohužel dodnes přesně neznáme důvod ani mechanismy působení infekčních agensů v těchto dvou odlišných funkcích ve vztahu k nádorovému onemocnění (Coussens a Werb 2002).

Pokud se však na celou věc podíváme blíže, zjistíme, že výskyt spontánních regresí spojených nejčastěji právě s infekcemi je opravdu velmi malý, z čehož vyplývá, že přirodá cíleně nevyužívá infekci jako obranu proti rakovině. Ve většině případů je tedy infekce právě tím rakovinným spouštěčem. V případech ojedinělých spontánních regresí se spíše jedná o

náhodný jev, ke kterému se přidává souhra dalších okolností a faktorů (Hoption Cann a kol. 2002).

3.6. Historie bakteriální terapie nádorových onemocnění

Abychom mohli vyhodnotit účinnost léčby nádorových onemocnění metodou bakteriální terapie, musíme se podívat do historie, na její úplné počátky a na klíčové okamžiky, které vedly k uviditelnosti, že spontánní regrese byly opravdu způsobeny infekčním onemocněním (Nauts a kol. 1945).

Na počátku byly ojedinělé případy spontánních regresí považovány za souhru náhod (přehled poznatků Everson a Cole 1956). Později, když lékaři v dci a lékaři upozorovali, že spontánní regrese se objevovala zároveň s nějakým druhem infekčního onemocnění. A právě tehdy přišla myšlenka léčby nádorová onemocnění vyvoláním infekce. Tato idea byla postupně zdokonalována, a ne vždy měla dobré výsledky. Zpočátku se používaly celé živé bakterie, proto často docházelo k úmrtím u tak oslabených pacientů následky infekce samotné (Kleef a kol. 2001). Proto se začala zkoušet varianta s usmrcenými bakteriemi, ale tam byl velmi malý výsledný terapeutický efekt, nebo dokonce žádný (Nauts a McLaren 1990). Nejznámějšími bakteriemi, které se v té době používaly, byly *Serratia marcescens* a *Streptococcus erysipelas*, hlavní složka slavných Coleyho toxinů (Coley 1910), viz kapitola 3.6.3. Coleyho toxiny. Od Coleyho metody se po objevení radiační léčby ustupovalo kvůli špatně prokazatelným výsledkům. Obrození tohoto principu bylo zaznamenáno až v pozdějších letech, kdy se zkoušely různé další varianty v podobě menších pokusů a projektů (

Následujícím významným okamžikem bylo pozorování pacientů s tuberkulózou (TBC), u kterých byl mnohem nižší výskyt nádorů, než u zbytku populace. To vedlo k závěru, že bakterie způsobující TBC zároveň snižuje výskyt nádorových onemocnění (Pearl 1929). Přikročilo se tedy k používání tzv. bacille Calmette-Guérin (BCG) vakcín k léčbě rakoviny. Léčba však nebyla úspěšná na většinu typů nádorů tak, jak se předpokládalo, přesto zůstala velkým přínosem pro léčbu karcinomu močového měchýře, kde se i nadále používá (Oelschlaeger 2010).

V 90. letech minulého století se začala používat terapie pomocí PAMPs (Rakoff-Nahoum a Medzhitov 2009, Underhill 2003, Takeda a Akira 2005), kdy se zkoušely různé kombinace PAMPs na které reagovaly Pattern recognition receptors (PRR). Tento druh léčby

je neustále p edm tem zkoumání a vývoje, je možné, že právě tato terapie se stane pr lomem v boji s rakovinou.

Je třeba pochopit podstatu procesu, jak vlastně infekční onemocnění může způsobit vymizení či zmenšení nádoru. Důležitě je, podívat se na případy, kdy začaly být používány bakterie k cílenému způsobení infekce u onkologických pacientů, zda mají lepší terapeutické výsledky gram pozitivní (G^+) nebo gram negativní (G^-) bakterie, nebo zda na tomto vůbec nezáleží. Následuje otázka, zda by bylo lepší používání živých nebo usmrcených bakterií. V případě živých bakterií v těle dochází k mnohem silnější imunitní odpovědi, ale na úkor nebezpečí a možného poškození lidského zdraví (Krejsek a Kopecký 2004).

Co dalšího můžeme porovnávat? Například to, jestli je lepší používat jen části bakterií nebo zda by bylo efektivnější používat bakterie celé. Otázek je opravdu mnoho, a jejich zodpovězení je důležité pro navržení postupů v plánovaných pokusech.

3.6.1. Spontánní regrese nádorových onemocnění

Spontánní regrese nádorů je fascinující jev, který byl zaznamenán již před několika sty lety (Everson a Cole 1956). Je však těžké získat přesnější údaje o existenci tohoto úkazu a navíc výskyt spontánních regresí je velmi nízký, na které zdroje uvádí, že jedna spontánní regrese nastane na každých 100 000 případů nádorového onemocnění, jiné zdroje uvádí jednu regresy na 80 000 případů nádorových onemocnění (přehled poznatků Hopton Cann a kol. 2002).

Abychom viděli, jak vůbec termín spontánní regrese nádorových onemocnění chápat, je potřeba definovat si ho. Známa je definice navržená Stewartem: "Spontánní regrese je jev, kdy část nebo celý maligní nádor zmizí bez jakékoliv léčby, nebo za přítomnosti léčby, která je považována za neschopnou uplatnit se jednoznačně v terapii nádorových onemocnění" (Stewart 1952).

Jak už bylo řečeno v úvodu, je těžké dokázat spontánní regresy, protože u nich kterých případů není dostatečná dokumentace k podpoře tohoto fenoménu. Přestože jsou známy

stovky případů spontánních regresí, případy podložené žádnou dokumentací se popisují jen na desítky (přehled poznatků Everson a Cole 1956). Z literárních záznamů z let 1907-1955, viz **Tab. 1**, můžeme vyčíst i určitý počet spontánních regresí v závislosti na druhu nádorového onemocnění. Z těchto dokumentací vyplývá, že nejvícečetnost regresí nastala u neuroblastomu (10 případů), a nejméněčetnost regresí nastala u rakoviny plic, sarkomu kostí, pankreatu a žaludku. Záznamů je však tak málo, že čísla mohou být jen náhodná a nemusí v nich být žádný prokazatelný systém.

Tab. 1: četnost spontánních regresí v závislosti na druhu nádoru, upraveno podle Everson a Cole 1956.

Typ nebo lokalizace nádoru	Počet případů
Neuroblastoma	10
Mozgový mořchý	8
Maligní melanom	5
Prso	4
Sarkom mkkých tkání	4
Střeva a konečník	2
Ledviny	2
Metastatický karcinom	2
Ústní dutina	2
Vaječníky	2
Děloha	2
Plíce	1
Sarkom kosti	1
Slinivka	1
Žaludek	1

Studium dostupné literatury (Everson a Cole 1956, Hopton Cann a kol. 2002) nevedlo k nalezení žádných zákonitostí závislosti spontánních regresí na věku pacientů, případy na jiných faktorech. Tento fakt může být dán i tím, že každý druh rakoviny je specifický pro určitý věk (např. neuroblastom se vyskytuje u dětí nízkého věku a naopak, melanoblastom je znám u osob staršího věku), (Krejsek a Kopecký 2004). Také pokud porovnáme pohlaví pacientů, nenalezneme žádné spojitosti s četností výskytu regresí (Everson a Cole 1956, Hopton Cann a kol. 2002). Zdá se tedy, že spontánní regrese jsou

náhodným jevem, který může být ovlivován celouadou jak vnějšími, tak i vnitřními faktory. Každý jedinec je originálním a složitým organismem, a může reagovat jiným způsobem. Proto je tak těžké ustanovit společné rysy a příznaky spontánních regresí.

Již z konce 18. století jsou známy spontánní regrese, které přispěly k poznání vzniku imunoterapie nádorových onemocnění (Nauts a kol. 1945, Hopton a kol. 2003). Nejprve společnost tento fenomén pokládala spíše za zázrak přírody, ale postupem času s přibývajícím znalostmi si tuto událost začaly spojovat s infekčním onemocněním. Prvním jménem, které se objevuje ve spojitosti spontánních regresí s infekčním onemocněním je například W. Busch, který jako první cíleně nakazil pacienta infekcí erysipelas, aby docílil regrese nádoru (zmiňováno v Nauts a kol. 1945). V souvislosti s pokusy W. Busche se začíná objevovat další významné jméno New Yorkského lékaře a vdce Williama B. Coleyho (Coley 1891).

3.6.2. William B. Coley

William Coley (1862-1936) byl jeden z prvních vědců, který se začal zabývat imunoterapií nádoru na základě pozorování, kdy regrese nádoru způsobilo infekční onemocnění. Vyvinul bakteriální vakcínu k léčbě rakoviny (Hopton a kol. 2003).

Věnoval se pro Williama Coleyho začal po přijetí 17-tileté Elisabeth Dashiell do nemocnice v New Yorku roku 1890, kde Coley pracoval. Biopsie odhalila u mladého děvčete sarkom na pažích. Bohužel rakovina se šířila přes všechny snahy rozšířit omezení do okolních tkání a orgánů a 23. ledna 1891 Dashiell zemřela.

Od toho dne se Coley začal intenzivně věnovat výzkumu léčby rakoviny a zasvětil tomu zbytek svého života. Coley shromáždil údaje o případech, kdy pacienti stejně jako Dashiell trpěli sarkomem. Nejvíce ho však zaujal případ nešťastného meckého příteleho Freda Steina, kterému byl v roce 1884 diagnostikován sarkom tváře a který byl po několika neúspěšných operacích považován za beznadějný případ. Když se u Steina objevila vysoká horečka způsobená erysipelas. Došlo k záněvu nádoru a Stein žil několik let bez nálezu (McCarthy 2006). Coley pochopil, že regrese nádoru byla způsobena právě bakterií *Sterptococcus erysipelas*, původcem onemocnění kůže erysipelas. V 19. století bylo toto kožní onemocnění běžnou příčinou pooperačních komplikací. Onemocnění se vyznačuje vysokou horečkou a rudými skvrnami na rukou i v oblasti (Eriksson a kol. 1996).

Vědecky tyto případy vedly k uvědomění, že klíčovou rolí v regresi nádoru hraje reakce našeho těla, tzn. imunitní systém (přehled poznatků Wiemann a Starnes 1994).

3.6.3. Coleyho toxiny

Pro zvýšení představy o tehdejší výzkumu a jeho dokumentování uvádíme informace v nezredukované formě. Po dlouhém bádání Coley našel pacienta, chudého pěsthovalce jménem Zola, který měl stejný jako Stein sarkom krku, ale i mandlí. Coley se snažil sám nemocní infikovat Zolu infekcí způsobenou erysipelas, vyzkoušel kultury ze čtyř různých laboratoří (Wiemann a Starnes 1994), ale žádná z kultur nezpůsobila infekci. Vysvětlení hledal i jinde, zkoušel různé lokalizace aplikací bakteriálních kultur, nicméně ať kultura *Streptococcus erysipelas* z Kochovy laboratoře v Německu vyvolala příznaky infekce. Prvním příznakem byla zimnice, která se objevila již po jedné hodině od aplikace, teplota pacientovi stoupla ať na 40,83 °C (105,5 °F). Stejně jako v Steinově případě, i u Zoly se jeho zhoubný nádor vyléčil, tumor v krku zmizel po dvou týdnech od vyvolání erysipelas. Nádor na mandlích se podstatně zmenšil. Zola byl v remisi (Coley 1891).

Po takovýchto výsledcích Coley samozřejmě pokračoval v pokusech. Studie začal na deseti jedincích, z nichž šest trpělo sarkomem a čtyři karcinomem. Ve všech deseti případech byly nádory neoperovatelné a značně rozvinuté (Coley 1910). Coley používal u těchto jedinců bujónové kultury *Streptococcus erysipelas*. I tady se Coley setkal s problémem samotného vyvolání infekce erysipelas. U sedmi jedinců nebylo vyvolání infekce úspěšné, ale i přesto se u nich objevilo dočasné zmenšení velikosti nádoru a dokonce došlo k redukci vaskularizace. Ale zlepšení bohužel nebylo trvalé (Coley 1910).

Ve zbylých třech případech se erysipelas podařilo vyvolat. Jeden z případů byl muž ve stáří 46 let, s poměrně velkým neoperovatelným sarkomem na zádech spojených s metastázami. Ani u tohoto případu sarkomu nebyla infekce úspěšně vyvolaná hned po první aplikaci bakteriální kultury. Ať po těchto týdnech neúspěšných pokusů injikoval Coley první kulturu získanou z Johns Hopkins Hospital Laboratory, a pacient začal vykazovat příznaky infekce, teplota stoupla na 40,83 °C (105,5 °F). A překvapivě bylo možno zaznamenat viditelné zmenšení nádoru již po 24 hodinách od vyvolání infekce. Za tři týdny nádor zcela vymizel, ale zlepšení netrvalo dlouho, po dvou měsících se objevila recidiva (Coley 1910). Po následné recidivě Coley nepěstal s léčebnými snahami a pokoušel se u pacienta opět vyvolat erysipelas s výsledným léčebným efektem. Později u tohoto pacienta začal Coley zkoušet mix bakteriálních kultur *Streptococcus erysipelas* a *Serratia marcescens*, tato aplikace byla úspěšná. Podařilo se mu vyvolat erysipelas s léčebným efektem a nádor vymizel a pacient zůstal téměř i roky prostý rakoviny (Coley 1910).

Coley na základ svých pokus konstatoval složitost vyvolání infekce erysipelas. Toto zjištění bylo jedním z důvodů, proč i přes velmi dobré výsledky metody na něj jakýs tato terapie upadla do zapomnění. Dalším problémem bylo velké riziko nelehkého průběhu erysipelas, který mohl pacientovi ještě více ublížit nebo ho dokonce usmrtit. Coley řešil tento problém, experimentoval s usmrcením bakterií *Streptococcus erysipelas*, pomocí vyšší teploty. Aby zjistil, zda takto usmrcené bakterie mají stejný efekt jako živé, ale představují menší riziko pro pacienta, provedl Coley experimenty na čtyřech pacientech. Výsledkem byly stejné symptomy jako u živých bakterií (například horečka kolem 39,7 °C (103,5 °F)), ale efekt infekce byl krátkodobý. Z výsledků pozorování Coley správně vydedukoval, že síla virulence bakterií není dostačující k vyvolání terapeutické odpovědi. Proto pokračoval ve výzkumu, jehož cílem bylo tuto virulenci zvýšit. Po nějaké době Coley zjistil, že společnou kultivací bakterií *Streptococcus erysipelas* a *Serratia marcescens* se virulence zvýšila, a tudíž se zvýšila i imunitní odpověď a došlo k redukci nádoru. První kombinace, kterou Coley zkoušel, aby došel k optimální virulenci, byl deseti denní růst *Streptococcus erysipelas* v bujónu, poté k nim přidal *Serratia* a nechal je spolu kultivovat dalších deset dní. Nakonec se směs bakterií nechala projít teplotou 58 °C. V posledním kroku celou směs ještě stabilizoval thymolem. Později Coley zkoušel i jinou variantu, separoval samotnou *Serratia marcescens*, u které bylo zjištěno, že i samotná bez *Streptococcus erysipelas* má úinky na zmenšení nádoru. Nicméně srovnání obou experimentů jasně ukázalo lepší efekt společné kultivace *Streptococcus erysipelas* a *Serratia marcescens* (Wiemann a Starnes 1994).

Samozřejmě byla snaha, aby léčba fungovala co nejeftivněji, tak se experimentování neomezovalo jen na zkoušení různých variant směsí bakteriálních kultur, ale v úvahu byl brán i způsob aplikace samotných kultur. Coley si kladl otázku, zda aplikace bakterií na jiná místa než ta, která vyvolají jinak silnou terapeutickou odpověď. Nejdříve se snažil vše aplikovat přímo do nádoru, pokud to tedy bylo možné, aby zajistil, že látka bude pracovat tak jak má, ale po několika pokusech, kdy aplikoval bakterie i na jiná místa než přímo do tumoru se potvrdila hypotéza, že podstatou léčebného efektu je systematická a ne pouze lokální reakce, protože všechny aplikace měly stejný výsledek (Coley 1910). Tato metoda měla však i stinné stránky, docházelo velmi často k úmrtím pacientů, a zejména kvůli tomu se ne vždy setkávala s kladnou odezvou společnosti. Nicméně je třeba mít na paměti, že vysoké procento úmrtnosti bylo způsobeno závažností samotného onemocnění. Coley měl s bakteriální léčbou velmi dobré zkušenosti, podařilo se mu vyléčit řadu pacientů s nádorovým onemocněním, z nichž stali i desítky let prostí rakoviny.

Objevuje se tedy otázka, proč se s touto metodou léčby nadále nepracovalo a proč zůstala opomenuta. Jednou z možných odpovědí na kladenou otázku je nástup radiační terapie nádorových onemocnění na počátku 20. století, která měla na rozdíl od Coleyho terapie jasně prokazatelné výsledky léčby (Nauts a kol. 1990). Na radiační terapii v zásadě většina pacientů reagovala zlepšením stavu, což ve srovnání ohromilo mnohem více, než Coleyho výsledky, ve kterých každý pacient reagoval na léčbu jiným způsobem a někteří dokonce vůbec. Ale i přes všechno tato úskalí máme dnes říct, že Coley a jeho terapie byla klíčovou pro imunoterapii nádorových onemocnění pomocí bakterií a samotný William Coley je nazýván „father of immunotherapy“ (Decker a Safdar 2009). Další významnou postavou je dcera W. Coleyho Helen Coley Nauts, která pokračovala v otcově práci. Po smrti otce se snažila zkompletovat všechny jeho případy spolu s dalším vdcem Charlesem Starnesem (Levine 2008). Oni také poprvé navrhli domněnku, kdy léčebná odezva je závislá na délce léčby a na horečky vyvolané léčbou toxiny (Hobohm 2009).

3.6.4. BCG vakcíny

BCG vakcíny jsou dalším typem terapie, která se v minulosti využívala v boji proti nádorovým onemocněním. Jejich protinádorový charakter byl zaznamenán téměř ve stejnou dobu jako léčebný efekt proti TBC.

BCG vakcína jinak nazývaná bacille Calmette-Guérin obsahuje živé bakterie *Mycobacterium bovis*, které jsou vaku speciální metodou zbavené virulence. Poprvé bylo BCG izolováno z hovězího dobytka roku 1904 v Novardem, dále prošla bakteriologickou zpracovacími technikami v laboratořích. Bakteriální kultura vaku vykazovala vysokou virulenci, a proto bylo třeba vymyslet způsob, který by ji snížil. To se podařilo Calmettovi a Guérinovi, kteří přidali do kultury kravskou fluvu, a tím dosáhli snížení virulence bakterie. Po mnoha pasážích byla kultura roku 1920 považována za nevirulentní. Hned následující rok byla BCG vakcína poprvé použita u lidí k vakcinaci proti tuberkulóze (přehled poznatků Oettinger a kol. 1999).

P vodní kmen byl dodán do několika světových laboratořích, kvůli možnosti připravit celosvětově BCG vakcínu. Dnes používané vakcíny mají převážně čtyři hlavní kmeny: francouzský Pasteurův kmen, dánský kmen, kmen Glaxo a kmen Tokyo (Lagranderie a kol. 1996).

Na počátku 20. století se začaly objevovat první zmínky o zajímavém vlivu tuberkulózy na nádorová onemocnění. V roce 1929 byla potvrzena hypotéza, že u lidí trpících

tuberkulózou se vyskytuje nádorové onemocnění v mnohem menší míře (Pearl 1929). A tehdy se zrodila myšlenka využívat TBC jako zbraň proti rakovině. V roce 1930 byla BCG vakcína poprvé použita k léčbě nádorů, ale nebyla zde valná odezva společnosti, největší boom v tomto typu terapie nastal až mezi lety 1950 a 1960 (přehled poznatků Meyer a kol. 2002). Zpočátku byly BCG vakcíny používány na všechny typy nádorových onemocnění, jednou z prvních studií se slibnými výsledky byla studie na lymfoblastoidní leukemii (Heyn a kol. 1975). Praktické využívání BCG vakcín pokračovalo u několika málo typů rakoviny (např.: rakovina močového měchýře) až do dnešní doby (Kyselová 2009).

Rakovina močového měchýře je známým problémem a to jak po léčbě tak i ekonomické stránce z důvodu častých recidiv tohoto onemocnění. Používání BCG vakcín se v oblasti povrchových nádorů močového měchýře velmi často vyskytuje (Johansson a Cohen 1997). První zprávy o použití BCG vakcíny u člověka pro účely této terapie jsou z roku 1976 (Schellhammer a kol. 1986). Samozřejmě, i tato terapie má stinné stránky. Aplikací BCG vakcíny představuje zvýšené riziko výskytu lokálních komplikací (např. dysurie, cystitida, hematurie, frekventurie), ale i například zimnice, malátnosti nebo horečky. Proto je třeba dle kladné zvažování kdy tuto vakcínu použít a kdy by naopak mohla pacientovi uškodit (Havránek a kol. 2010). A jak vlastně BCG vakcína funguje? Přesný mechanismus terapeutického efektu je neznámý, ale pravděpodobně spočívá na stejném principu jako u Coleyho toxinu, tzn., že BCG vakcína působí na stimulaci imunitního systému (Meyer a kol. 2002). BCG vakcína způsobí v močovém měchýři a regionálních mízních uzlinách granulomatózní zánětlivou reakci a má vliv na sekreci tumor necrosis factor (TNF α), (Zganiacz a kol. 2004). BCG vakcína se aplikuje přímo do prázdného močového měchýře pomocí katetru, tak aby pokryla celý vnitřní povrch močového měchýře. Tento postup se opakuje v různých dlouhých intervalech a provádí se ambulantně (Kyselová 2009).

I přesto, že tato terapie sítáadu nečekaných účinků je velmi často používána a dává se jí, že je i v rámci možností považována za bezpečnou imunologickou terapii nádorových onemocnění močového měchýře (Kawaciuk 2000).

3.6.5. Terapie bakteriemi specificky rostoucími v nádorovém mikroprostředí

Již několik desítek let je známo, že anaerobní bakterie (fakultativně anaerobní i obligátně anaerobní) mají schopnost selektivně proliferovat v nádorové tkáni (Sznol a kol. 2000). Nádorová tkáň se liší od běžné okolní zdravé tkáně. Zdravá tkáň je silně okysličená a díky tomu zde anaerobní bakterie nemají vhodné podmínky pro růst a rozmnožování, zatímco

nádorová tkáň je znatelně méně oxysličená a poskytuje vhodné prostředí pro takovýto druh bakterií (Hayashi a kol. 2009). Avšak celkový mechanismus, jakým tyto bakterie působí na nádorové buňky a jakým se v nich i usazují je doposud ne zcela objasněn (Rosenberg a kol. 2002). Mezi nejvýznamnější zástupce bakterií, které se pro tuto terapii používají, patří *Salmonella typhimurium*, *Clostridium novyi* i *Bifidobacterium longum* (Jean a kol. 2008).

- **Terapie pomocí *Salmonella typhimurium***

Bakterie *Salmonella* je původcem salmonely, bakteriálního tyfu a paratyfu. Díky schopnosti selektivního růstu v nádorové tkáni, *Salmonella typhimurium* může pomoci v boji proti nádorovým onemocněním (Zhao a kol. 2006).

Salmonella typhimurium se řadí mezi gramnegativní bakterie a je fakultativně anaerobní, což znamená, že má schopnost růst i v anaerobním prostředí, nebo částečně anaerobním prostředí jako je v nádorové tkáni. Díky této schopnosti se *Salmonella typhimurium* začala používat v terapii nádorových onemocnění, která je oproti cílená pouze na nádorové buňky a nepoškozuje tak ostatní zdravé buňky na rozdíl od chemoterapie a radioterapie. Zprvu byl kmen *Salmonella* modifikován, tedy přesněji byl modifikován lipid A působením msbB genu za účelem redukce septického šoku. Ale takto pozmeněná *Salmonella* nezpůsobila v testech úplnou likvidaci nebo zmenšení nádoru, ale jen útlum v růstu (Avogadri a kol. 2008). Přesný mechanismus, jak *Salmonella* působí na zpomalení růstu nádorových buněk není stále znám, ale uvádí se o možnostech: (1) že bakterie je schopna injikovat toxické látky z bakteriální cytoplazmy přímo do cytoplazmy nádorové buňky, nebo (2) že dokáže zničit živiny a růstové faktory nádoru a tím i zamezit jejich růstu, nebo (3) sekretovat toxické látky do extracelulárního prostoru (Avogadri a kol. 2008).

- **Terapie pomocí *Clostridium novyi***

Clostridium novyi je grampozitivní bakterie, která způsobuje závažná onemocnění lidí i zvířat. Je obligátně anaerobní bakterií, což znamená, že může žít jen v prostředí bez kyslíku, a proto se řadí mezi bakterie používané v léčbě nádorových onemocnění (Minton 2003). Experimentálně bylo skutečně zjištěno, že *Clostridium* preferuje růst v nádorové tkáni místo ve zdravé okolní tkáni, stejně jako je tomu u *Salmonella* (Jean a kol. 2008). Dále bylo prokázáno, že efekt léčby nádorové tkáně se hlavně projevuje ve velkých nádorech (Jean a kol. 2008).

3.6.6. Léčba pomocí PAMPs

V posledních několika letech se vývoj imunoterapie nádorových onemocnění upíná k terapii založené na interakci bakteriálních pathogen associated molecular patterns (PAMPs) a pattern recognition receptors (PRRs), (Tsan 2006). Tato interakce spustí kaskádu reakcí, které následně vedou k aktivaci imunitní odpovědi vedoucí ke zmenšení nádoru, nebo jeho úplnému vyléčení. Mnoho mechanismů této kaskády reakcí bylo již odhaleno, ale část jich zůstává stále záhadou, proto jsou tyto mechanismy předmětem intenzivního výzkumu (Lin a Karin 2007). Mnoho vědců věří, že pochopením jednotlivých mechanismů získáme účinnou zbraň proti nádorovým onemocněním.

- **Charakteristika PAMPs a PRRs**

Nezbytnou vlastností pro přežití organismu je schopnost rozpoznání nebezpečí, které představuje atak bakterií, virů, hub a plísní. Zásadní je i běžné rozpoznání zdravých, nemocných a mrtvých buněk. To vše je zajištěno u každého z nás imunitním systémem, který podnikne potřebné kroky nutné k eliminaci nebezpečí nebo odstranění mrtvých buněk (Seya a kol. 2000).

Jedním z těchto kroků je interakce PAMPs a PRRs, kterou navrhl v roce 1989 Charles Janeway. Ten se domníval, že imunita používá pattern recognition receptors (PRRs) k rozpoznání zakonzervovaných vzorů PAMPs, nacházejících se u bakterií, virů a hub (Janeway 1989).

V roce 1997 všechny Janewayho domněnky byly potvrzeny nálezem a identifikací Toll-like receptorů (TLRs), které se nacházejí na povrchu cytoplazmatických membrán buněk (některé i uvnitř buněk) a jsou schopné rozpoznat i tu cizí PAMPs (Underhill 2003). U člověka je více Toll-like receptorů, a každý z nich je aktivován navázáním specifického druhu PAMPs.

Toll-like receptory jsou členové interleukin-1 receptor (IL-1R superrodiny), které sdílejí homologní úseky v cytoplasmatické membráně. TLR mají ve své struktuře charakteristické domény: (1) TIR domény v intracelulárních oblastech a (2) LRR domény v extracelulárních oblastech (Takeda a Akira 2005). Na **Obr. 1** můžeme vidět lidské transmembránové proteiny TLR (proteinové struktury v cytoplasmatické membráně). Na obrázku jsou vyznačeny extracelulární (modrá barva) a intra-celulární (fialová barva) domény, jejich lokalizace na chromosomu a také jejich molekulová hmotnost.



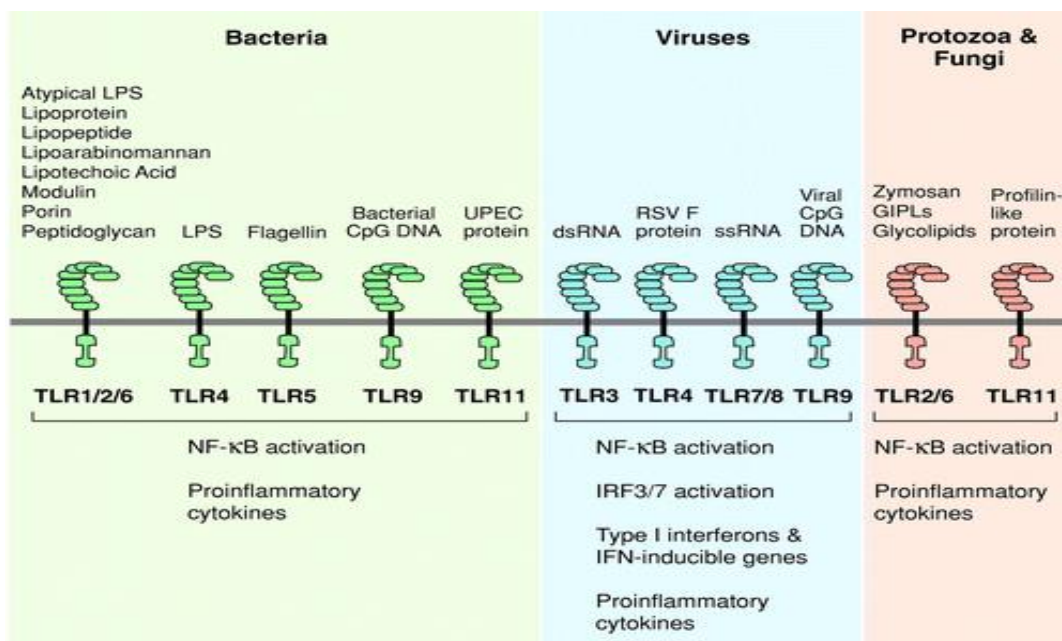
Obr. 1: Lidské proteinové TLR struktury, jejich molekulová hmotnost a lokalizace na chromosomu, převzato z R&D systems 2004.

- **Ligandy TLR**

Na každý z TLR se váže specifický ligand a následně tato vazba spustí kaskádu reakcí vedoucí k aktivaci imunitního systému. Tato myšlenka byla potvrzena poprvé v roce 1998, kdy bylo zjištěno, že TLR4 je aktivovaný LPS (lipopolysacharid) a začala být označována jako ligand pro TLR4 (uvedeno v Tsan 2006). Tím bylo potvrzeno, že jednotlivé TLR jsou aktivovány specifickými ligandy. A následné výzkumy ukázaly i další ligandy pro zbylé TLR (Kanzler a kol. 2007).

Na **Obr. 2** jsou uvedené lidské a myšičí TLR (TLR11 se nevyskytuje u člověka) a jejich specifické ligandy. Pro TLR1, TLR2 a TLR6 jsou specifickými ligandy triacyl lipopeptid, ale i lipoproteiny, peptidoglykany, lipoarabinomannan, lipopolysacharidy, GPI, Zymosan. U TLR3, který jsou součástí dendritických buněk, je specifickým ligandem dvouetrická RNA produkovaná virem. Pro TLR5 je specifický ligand flagelin, který je součástí bičíků bakterií. Pro TLR7 a TLR8 je typickým ligandem jednoetrická RNA. A pro TLR9 je specifickým ligandem nemetylovaná CpG DNA (Akira a Hemmi 2003, West a kol. 2006).

Pro TLR10 nebyly zatím nalezeny žádné specifické ligandy (Akira a Hemmi 2003, Takeda a Akira 2005). Na které z TLRs dokážou rozpoznat i synteticky vyrobené látky, které jsou strukturálně podobné přirozeným ligandům, což může být výhodou i v terapii nádorů (Romagne 2007).



Obr. 2: Typy lidských a myšičích TLR s příslušnými specifickými ligandy (West a kol. 2006).

V posledních deseti letech došlo k zajímavému zjištění, že proteiny teplotního šoku (heat shock proteins - HSPs) se mohou chovat také jako specifické ligandy pro některé TLR. HSPs se řadí mezi proteiny, které zajistí stresovou odpověď organismu při vystavení buněk nepříznivým podmínkám (například při vysokých teplotách, nepříznivém pH, přítomnosti těžkých kovů, infekce a hladovění). Tyto proteiny mají i chaperonovou funkci, tzn. pomáhají ostatním proteinům získat správnou konformaci (Krejsek a Kopecký 2004). Proteiny teplotního šoku se běžně rozdělují na Hsp60, Hsp70, Hsp90 a gp 96 (přehled poznatků Vabulas a kol. 2002). Bylo prokázáno, že cytokinový efekt byl vyvolán navázáním Hsp60 na TLR4, což naznačuje, že Hsp60 je specifickým ligandem TLR4 (Ohashi a kol. 2000). Proteiny teplotního šoku můžeme zařadit do tzv. endogenních ligandů, označované jako Damage-associated molecular patterns (DAMPs), zatímco předtím zmiňované specifické ligandy (PAMPs), patří do ligandů exogenních.

Jak endogenní tak exogenní ligandy zapíchní navázáním na TLR kaskádu reakcí a mechanismů vedoucích k aktivaci imunitního systému (Bianchi 2007).

- **TLR signální dráhy**

Navázáním specifického ligandu na TLR dojde k aktivaci signálních drah a k následným změnám v imunitním systému. I přesto, že téměř každý TLR má specifickou vazbu na určitý ligand, signální dráhy jednotlivých TLR nejsou tak rozmanité (Okamoto a Sato 2003).

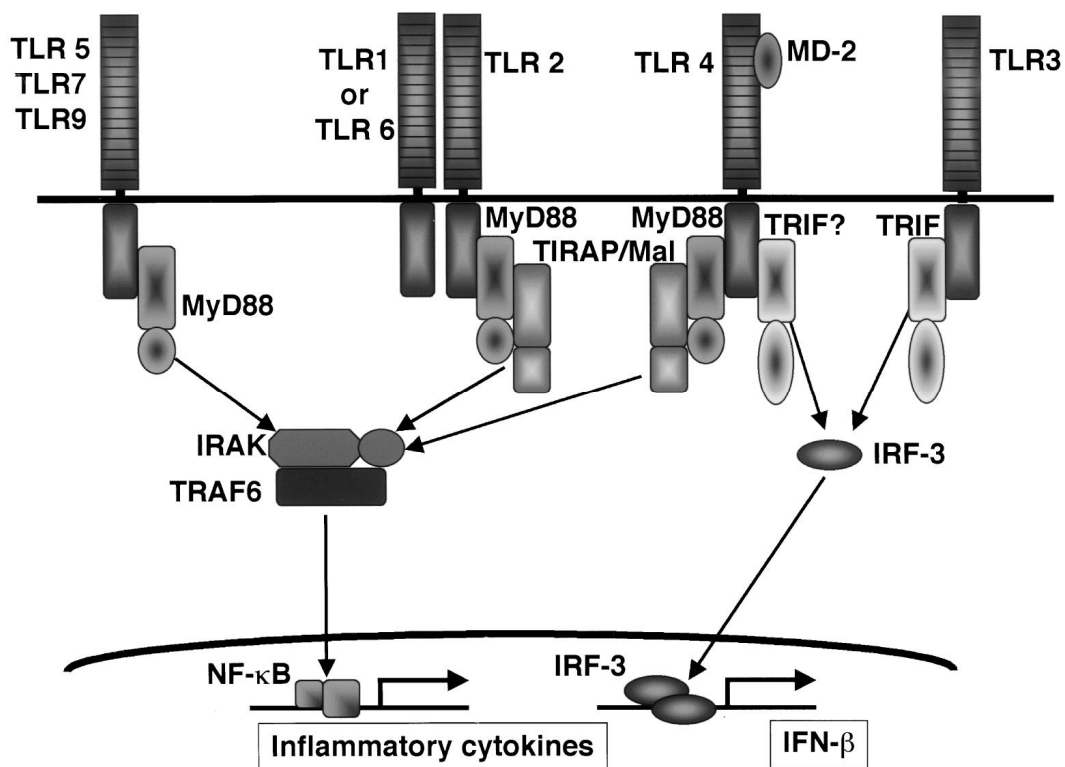
Existují zde dva hlavní typy drah, které mohou být aktivovány interakcí TLR a specifických ligandů: (1) **MyD88 závislé dráhy** a (2) **MyD88 nezávislé dráhy**, schematicky znázorněno v **Obr. 3**.

MyD88 závislé dráhy -, jsou vyvolávány u TLR 1, 2, 4, 5, 6, 7 a 9 (Gohda a kol. 2004). Molekula MyD88 je charakteristická C- a N- koncem. Na C- konci je obsažena doména TIR, která má schopnost navázat se na TIR doménu v TLR.

Jiný typ domény se vyskytuje na N- konci MyD88. Tato doména se váže na kinázu interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK), (Takeda a Akira 2004). IRAK kináza je složená ze dvou domén (death doména a centrální kinázová doména). Zatímco death doména (DD) zprostředkovává připojení k MyD88, centrální kinázová doména napojuje TRAF6 (TNF receptor-associated factor 6) a dohromady vytváří ubiquitin protein kinázu, která nakonec aktivuje NF- κ B. Tento typ MyD88 dependentní dráhy je běžně k vidění u TLR 5, 7 a 9 (Takeda a Akira 2004).

Dalším typem MyD88 dependentní dráhy je napojení centrální kinázové domény na tzv. adaptorový protein TIRAP/MAL a teprve poté následuje navázání na kinázu IRAK. Následná exprese NF- κ B je založena na stejném mechanismu jako v předcházejícím případě. Tato dráha je běžná u asociovaných TLR1/TLR2 a/nebo TLR2/TLR6 (Hornig a kol. 2001).

MyD88 nezávislé dráhy-, zde uvádíme dva hlavní typy těchto drah: (1) dráha, která je aktivována navázáním ligandu (v podobě virové infekce nebo dvou segmentové RNA) na TLR3. Charakteristickou doménou je zde doména TRIF (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- γ), její fosforilace vede buď k navázání na TRAF6 a následné aktivaci NF- κ B, nebo dojde přímo k aktivaci transkripčního faktoru IRF-3 (Yamamoto a kol. 2003a). (2) Další možností této MyD88 independentní dráhy je schopná fungovat jen u TLR4. Zde dojde k napojení TRIF na protein TRAM a k následné aktivaci transkripčního faktoru IRF-3 vedoucího k expresi INF- β genu (Yamamoto a kol. 2003b).



Obr. 3. Hlavní typy signálních drah, aktivované interakcí TLR a specifických ligandů, schematicky zjednodušeno dle Akira a kol. 2003).

- **Výsledek aktivace signálních drah**

Aktivování signálních drah podporuje dozrávání (maturaci) dendritických buněk (Dendritic cells - DC). Dendritické buňky v nezralém stavu nejsou schopné aktivovat T-lymfocyty, naopak ve většině případů vedou k jejich utlumení (Michelsen a kol. 2001). Toto utlumení nijak nepomáhá v protinádorové imunitě, ale má v této své opodstatnění. Způsob útlumu lymfocytů umožní ochranu těla před autoimunitními onemocněními (Banchereau a Steinman 1998).

Zralé dendritické buňky putují do lymfatických orgánů, kde prezentují části zpracovaných bakterií, virů a jiných antigenů na svém povrchu. Tato prezentace umožní, aby zpracované antigenní části byly rozpoznány T-lymfocyty, a následně došlo k vytvoření paměťových buněk a tvorbě specifických protilátek a zahájení buněčné odezvy (Banchereau a Steinman 1998).

Dále dochází i k aktivaci CTL (cytotoxické T lymfocyty) a NK (natural killer) buněk, které jsou stejně jako T-lymfocyty indukovány maturovanými dendritickými buňkami. Z testů je patrné, že jednotlivé sub-populace vykazují jistou specificitu pro indukci jednotlivých efektorů, ale velká část z těchto mechanismů zůstává stále nejasná (Huang a kol. 2005).

Samotná aktivace signálních drah podporuje také fagocytózu neutrofilů a makrofágů. Neutrofilové jsou díky fagocytóze schopny pohlcovat cizorodé části v těle. Tuto schopnost vyvolání stimulace nemají všechny ligandy interagující s TLR. Zkoumáním bylo zjištěno, že tato schopnost je např. u LPS, lipopeptidu, flagelinu a Zymosanu (Hayashi a kol. 2003). Makrofágy rozdíl od neutrofilů mají schopnost prezentovat antigeny a zapojit získanou (adaptivní) imunitu (Nau a kol. 2002).

3.6.6.1. Využití PAMPs v protinádorové imunoterapii

Interakce PAMPs se specifickými TLR využívána v léčbě nádorových onemocnění je v současnosti velmi diskutovaným tématem. Byl totiž prokázán léčebný efekt u velkého množství nádorů, ale zároveň se objevují i případy, ve kterých interakce TLRs a PAMPs naopak růst nádoru indukovala (Chen a kol. 2008).

- **TLR stimulující růst nádorů**

TLRs se vyskytují na bučkách imunitního systému a na epitelárních bučkách (např. zařívacího traktu, na kořních bučkách, epitelárních bučkách samých reprodukčních orgán), ale také se bří objevují i na nádorových bučkách. Na nádorových bučkách mřou p řisp ř k r řtu a angiogenezi nádoru. V **Tab. 2** jsou znázorn řny zřstupci TLR vyskytující se na specifických nádorových bučkách.

Tab. 2:TLR vyskytující se na specifických nádorových bučkách, p řevzato ze Sato a kol. 2009.

Druh rakoviny	TLR
Rakovina řaludku	TLR2,TLR4,TLR5,TLR9
Rakovina řev a kone řníku	TLR2,TLR3,TLR4,TLR5,TLR9
Rakovina vaje řník	TLR2,TLR3,TLR4,TLR5
Rakovina d řlořního řípku	TLR3, TLR4, TLR5,TLR9
Rakovina plic	TLR2,TLR3,TLR4,TLR9
Rakovina prostaty	TLR4,TLR9
Melanom	TLR2,TLR3,TLR4
Rakovina mozku	TLR2,TLR4
Rakovina prsu	TLR2,TLR3,TLR4,TLR9
Rakovina jater	TLR2,TLR3,TLR4,TLR6,TLR9
Rakovina hrtanu	TLR2,TLR3,TLR4

Aktivace nádorových TLR m ře spustit slořitý mechanismus, jehoř výsledkem jsou proti-apoptóзовé proteiny p řisp řvající ke karcinogenezi a proliferaci nádorových bun ř. Dal řím ř inkem aktivace nádorových TLR m ře b řt zesřlení rezistence proti hostitelov ř imunitní odpov řdi a dochází k utlumen ři imunitních bun ř infiltrovaných do nádorové tkán ř. Souhra řto ud řlost ř zp řsob ř řst nádoru bez pov řimnutí imunitního systému.

Jak řiř bylo řeno, TLR na nádorových bučkách ovliv řují angiogenezi nádoru. Nádor ke svému p řeffit ř a r řtu pot řebuje pot řebně mnořství kyslíku a řivín, které získává pomocí c řv. Nádor samotný produkuje v řznamný vaskulárn ř endotelárn ř řstov ř faktor, který mu umo řuje rychlou tvorbu nových c řv (tyto nov ř narychlo vytvo řené c řvy mají nedokonalou

stavbu, a na svém povrchu vykazují díry, eho se vyuffívá u n kterých zp sob experimentální terapie), (Huang a kol. 2008).

Správným pochopením proces probíhajících v aktivaci TLR se Toll-like receptory za aly pouffívá i k lé b nádorových onemocn ní a to v n kterých p ípadech s velmi slibnými výsledky (Sfondrini a kol. 2006, Mariani a kol. 2007, Rhee a kol. 2008, Carty a Bowie 2011).

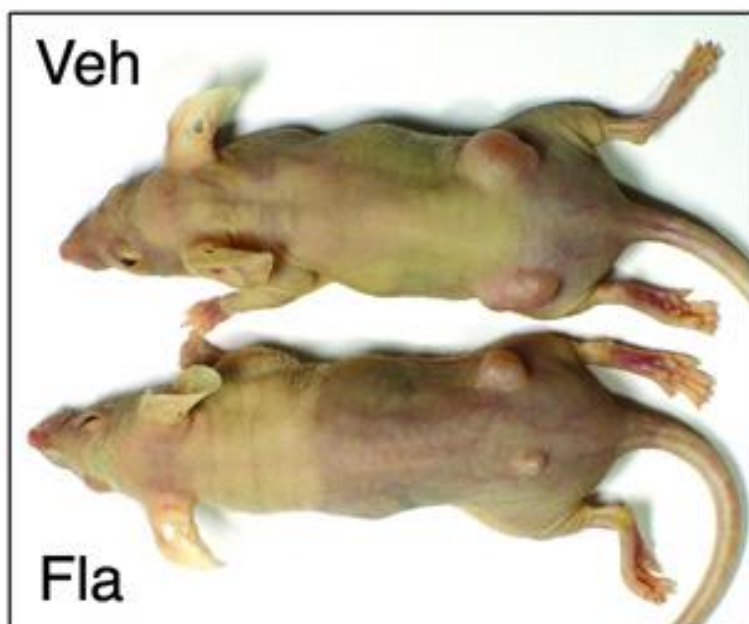
- **TLR v léčbě nádorových onemocnění**

TLR m fme pouffít k lé b nádorových onemocn ní. TLR aktivace pomocí PAMPs vede k ad reakcí v imunitním systému, které mohou mít za následek zmen-ění nádoru, nebo úplnou regresi (Seya a kol. 2009).

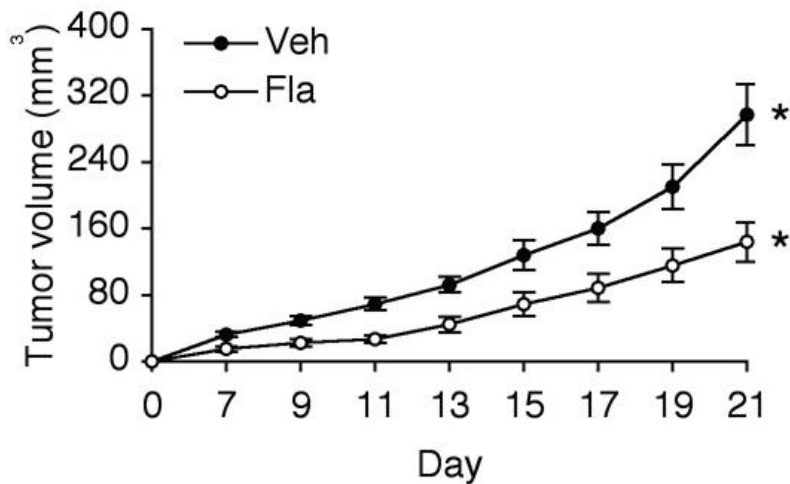
Aktivace TRL je stále ve fázi zkoumání, u n kterých TLR jsme se dostali jifl k záv re né fázi klinického výzkumu (fáze II a fáze III), u jiných jsme na úplném po átku. Je zde je-t mnoho nejasností a v dci postupn zji- ují, fle kombinace n kterých ligand stimuluující TLR m fle být výhodn j-í, nefli pouffívání jednoho ligandu samotného. Stále zkoumanými TRL jsou nap . intracelulární TLR7 a TLR8, lokalizované v endosomální membrán . Tyto receptory jsou aktivované jedno- et zcovou RNA, tedy ne bakteriální, ale virovou komponentou. Poté následuje aktivace transkrip ních faktor , nukleárních faktor B a indukce zán tových cytokin (Schön a Schön 2008).

Dal-ím intracelulárním TLR pouffívaným v terapii nádor je TLR9, který je aktivovaný pomocí CpG DNA, která se nachází v bakteriálních bu kách i virech a není sou ástí genomu obratlovc (Krieg 2008). I v tomto p ípad se vyuffívá synteticky vytvo ená látka oligodeoxinukleotid, který obsahuje imunitní simulátory CpG motiv a dokáfle tak aktivovat TLR9 (Krieg 2008). V pokusech s TLR9 bylo zji-t no, fle pomáhá významn stimulovat produkci melanocytového proteinu MART-1 (Melanom-associated antigen rozpoznávaný T bu kami), (Krieg 2007). MART-1 jsou exprimovány na povrchu v t-iny melanom a n kdy se nacházejí i na jiných typech nádor . Proti t mto MART-1 vytvá í imunitní systém specifické bu ky, tzv. MART1-specifické CD8⁺ T bu ky. Cílem je zvý-ít produkci t chto specifických T-bun k, aby se zvý-ila -ance imunitního rozpoznání nádoru. Toho se vyuffívá v n kterých melanomových vakuínách (Krieg 2007).

P edm tem zkoumání je i aktivace TLR4 pomocí lipopolysacharidu. Lipopolysacharid je sou ástí bun né bakteriální st ny gramnegativních bakterií a obsahuje lipid A, který aktivuje TLR4 pomocí interakce s povrchovým receptorem CD14 (Triantafilou a Triantafilou 2002). Výzkum byl zam en i na TLR5, který je stimulován flagelinem. Zdrojem flagelinu bývá *Salmonella typhimurium* (Applequist a kol. 2005). Do samic nahých my-í CD-1 (stá í osm týdn), byly injikovány kolonie nádorových bun k tlustého st eva bun ná linie DLD-1. My-ím byl aplikován purifikovaný flagelin ze *Salmonella typhimurium*. U nádor docházelo ke zpomalování r stu (viz **Obr. 4**), flagelin stimuloval protinádorovou imunitu, a díky tomu byla zvý-ena nekróza uvnit nádoru. **Obr. 5** znázor uje pr b fn m ené velikosti nádor , ukazuje snížení rychlosti r stu nádor p i podávání flagelinu.



Obr. 4: Viditelné zmen-ení nádor (linie DLD-1) po aplikaci flagelinu z bakterie *Salmonella typhimurium* na samicích CD1 nahých my-í (Fla) oproti kontrole (Veh), Rhee a kol. 2008.



Obr. 5. Supresivní účinek flagelinu na růst nádoru (linie DLD-1), Rhee a kol. 2008.

Naproti tomu v jiné studii, flagelin vyvolal u myši s nádorem mléčné žlázy zcela opačný efekt (Rhee a kol. 2008). V tomto případě docházelo ke zvětšování nádoru, ne k efektu zmenšení. Tento efekt je vysvětlován rozdílným použitím druhu nádorových buněk (buňky tlustého střeva vs. buňky mléčné žlázy). Bylo zjištěno, že tento negativní efekt flagelinu u některých typů nádorů může být zvrácen kombinováním flagelinu spolu s CpG DNA (Sfondrini a kol. 2006).

Součástí výzkumu proti nádorové léčby jsou i TLR4 a TLR2/6. Následující odstavce je zaměřen na výzkum protinádorové léčby nejčastěji mozkových nádorů – glioblastom (Carty a Bowie 2011).

Do myši byla injikována R6-2 krysí gliomová buňková linie. Nádory byly léčeny intratumorální aplikací Zymosanu a LPS. U myši po opakované intratumorální aplikaci LPS došlo u 70,6 % nádorů (12 jedinců ze 17) k úplné regresi. Myši po opakované aplikaci Zymosanu vykazovaly úplnou regresi 50% nádorů (6 jedinců z 12), (Mariani a kol. 2007).

- **Problém imunoterapie-Treg buňky**

Treg buňky neboli regulátory T buněk jsou sub-populace T buněk, které hrají významnou roli v prevenci autoimunitních chorob. Tlumí protinádorovou imunitu prostřednictvím sekrecí

velkého množství interleukinů (IL), konkrétně IL-9, IL-10 a transforming growth factor (TGF- β), které mají imunosupresivní účinky (Wang a kol. 2006).

Rozeznáváme celou řadu Treg buněk, nejznámější jsou CD4⁺, nacházejí se v různých typech nádorů. Méně popsanou skupinou jsou CD8⁺ Treg, které mají také supresorové funkce (Wang a kol. 2008). Existuje trvalá snaha zmírnit nebo zvrátit funkci CD4⁺ Treg buněk. Testováním bylo zjištěno, že k zvrácení supresorové funkce mohou dopomoci některé specifické ligandy TLR (např. CpG-A, poly G10 oligonukleotidy a ligandy TLR8), (Wang 2008).

3.6.6.2. Budoucnost léčby pomocí PAMPs

Ze zaznamenaných případů je zjevné, že TLR nevykazuje pouze léčebný efekt. TLR vyskytující se na nádorových buňkách může naopak vyvolat růst nádorové tkáně (Sato a kol. 2009).

Terapie pomocí PAMPs je ve většině výzkumů v pokusné fázi, ale přibývající výsledky poukazují na zřejmý terapeutický efekt (Rhee a kol. 2008). Je třeba ještě objasnit celou řadu procesů jak v interakcích TLR se specifickými ligandy, tak i v následných reakcích imunitního systému. Až pochopíme celý proces, budeme jistě moci zlepšit a zefektivnit terapeutický efekt a používat tuto léčebnou metodu u člověka a rozšířit její účinnost na více druhů nádorových buněk. Je důležité snažit se zkoušet nové kombinace ligandů, které by mohli být účinnější než původní. Měla by být brána v úvahu i možnost kombinace s dalšími druhy terapií nádorových onemocnění jakými je například radioterapie.

Terapie pomocí PAMPs skrývá velký léčebný potenciál a je jen otázkou času, kdy ho budeme moci naplno a cíleně používat v léčbě nádorových onemocnění.

4. Odpovědi na otázky postulované v kapitole – Cíle práce

V této práci jsme se zaměřili na otázku, zda je infekce p vodcem rakovinného onemocnění, nebo zda se dá využít v léčbě nádorových onemocnění. Odpovězí pro obě možnosti ano, infekce může přispívat k léčbě nádorových onemocnění, ale podle mnoha zdrojů pomáhá, jen pokud je cílená a řízená. Tomu odpovídá i malá četnost spontánních regresí spojených s infekcemi. Coifman vypovídá o tom, že neřízená infekce je opravdu ve většině případů p vodcem rakoviny, a je spíše náhodnou, když se úinek zvrátí a dojde ke spontánní regresí.

V průběhu práce jsme zaznamenali vývoj imunoterapie nádorových onemocnění pomocí bakteriálních částí od úplného poátku spontánních regresí, až po cílenou terapii pomocí bakteriálních motivů PAMPs.

Přestože máme pozorovat značný pokrok ve výzkumech nádorových onemocnění, zatím se nepodařilo nalézt spolehlivou léčbu nádorových onemocnění. Je důležité v novat se historii této terapie, abychom se mohli vyvarovat opakování chyb minulých a naopak použít se z tehdejších úspěchů této léčby.

Je podstatné hledat souvislosti a určitý systém v událostech. Právě proto jsme si v úvodu kladli řadu otázek, na které se v této části práce budeme snažit odpovědět.

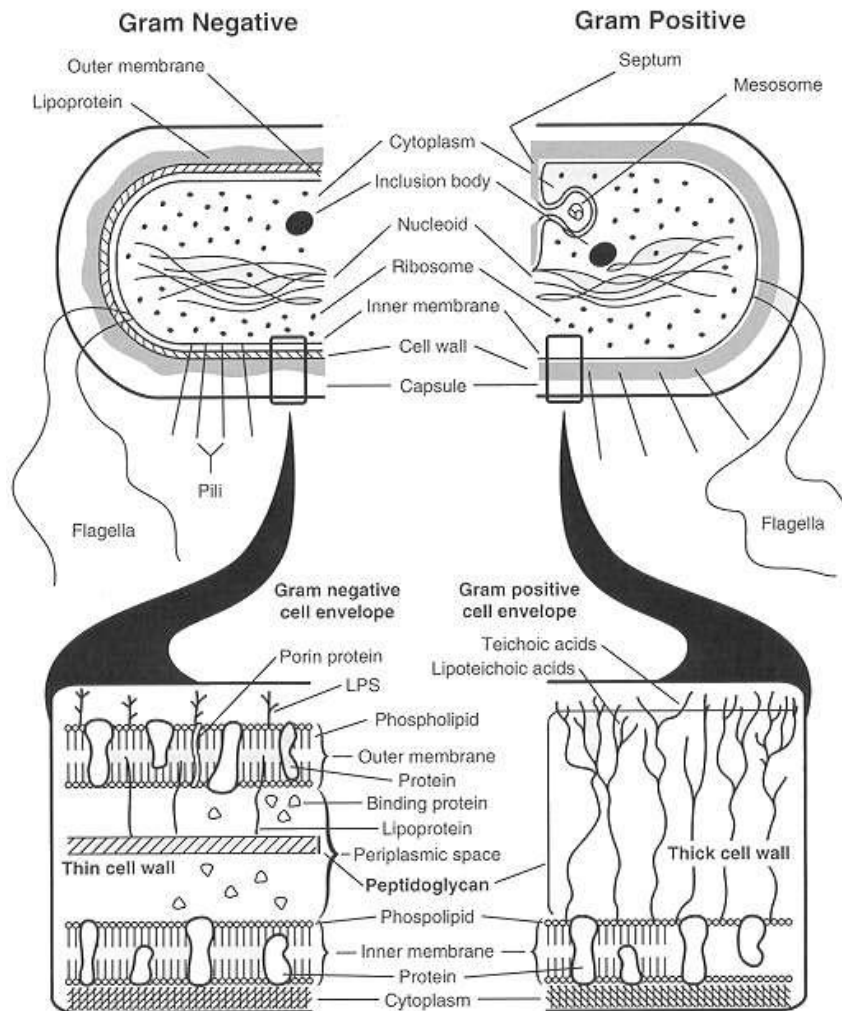
Otázka 1.: Je nějaký rozdíl v používání grampozitivních nebo gramnegativních bakterií v léčbě nádorových onemocnění a je jejich síla stimulace imunitního systému stejná intenzivní?

Otázka zní, zda jiné složení bakteriální stěny grampozitivních (G^+ bakterie) a gramnegativních (G^- bakterie) bakterií má vliv na intenzitu a způsob aktivace imunitního systému pro boj s nádorovými buňkami.

Buněná stěna těchto dvou skupin bakterií se významně liší. Rozdíl byl poprvé pozorován při jejich barvení, G^+ bakterie se barví do modrofialova a G^- bakterie do červená (Krejsek a Kopecký 2004). Grampozitivní bakterie mají ve své buněčné stěně silnou vrstvu peptidoglykanu, která je mezi vnější a plazmatickou membránou. Tyto bakterie postrádají lipopolysacharidovou (LPS) vrstvu i vnější membránu. Stěny G^+ bakterie obsahují nejvíce 10 aminokyselin v nichžých případech i méně. Mají schopné tvořit spóry, které jsou velmi odolné ve vnějších podmínkách.

Buněná stěna gramnegativních bakterií je zpeválné ásti tvoena lipopolysacharidy (LPS) spoluvtvá ejícími vn jí membránu, pod ní je tenká peptidoglykanová vrstva. V buné stěně je p ítomno 17 aminokyselin i z ad aromatických aminokyselin. Na rozdíl od grampozitivních bakterií, gramnegativní bakterie netvo í spory. Nejvíce patogenních bakteriálních zástupc najdeme u gramnegativní skupiny bakterií a to je práv kv li p ítomnosti lipopolysacharidové vrstvy. Jako p íklad G^- bakterií m fme uvést *Salmonella*, *Escherichia* (Krejsek a Kopecký 2004).

Na **Obr. 6** je vyobrazen pr ez gramnegativní bakterií (levá strana), kde je znázorn na lipopolysacharidová (LPS) vrstva. Na pravé stran je pr ez grampozitivní bakterií, kde m fme pozorovat silnou vrstvu peptidoglykanu.



Obr. 6: Vyobrazení pr ezu st ny grampozitivních a gramnegativních bakterií. V levé ásti obrázku je vid t st na G^- bakterie s typickou LPS vrstvou. V pravé ásti je st na G^+ bakterie s mohutnou peptidoglykanovou vrstvou (p evzato z Salton a Kim 2000).

V dlouhotrvajících výzkumech byla vyzkoušena celá řada bakterií. V současné době se používají především jen části bakteriálních buněk. Zjistíme, zda jsou účinnější G^+ nebo G^- bakterie bychom mohli zefektivnit léčebný výsledek imunoterapie nádorů. Souhrn G^+ a G^- bakterií je zaznamenán v **Tab. 3**.

Tab. 3: Bakterie používané v imunoterapii nádorových onemocnění pomocí bakterií a bakteriálních částí se zařazením do skupin dle Gramova barvení, připraveno dle Coley 1910, Lamm a kol. 1981, Jean a kol. 2008, Krieg 2008, Rhee a kol. 2008).

Typ terapie	Název bakterie	Gramovo barvení
Coley toxins	<i>Serratia marcescens</i>	G^-
	<i>Streptococcus pyogenes</i>	G^+
BCG vakcína	<i>Mycobacterium bovis</i>	G^+
Terapie bakteriemi specificky rostoucími v nádorovém mikroprostředí	<i>Salmonella typhimurium</i>	G^-
	<i>Clostridium Novyi</i>	G^+
Terapie pomocí PAMPs	<i>Escherichia coli</i>	G^-
	<i>Salmonella typhimurium</i>	G^-
	<i>Staphylococcus aureus</i>	G^+
	<i>Klebsiella</i>	G^-

Bohužel ze současných záznamů nelze jednoznačně prokázat, zda jsou G^+ bakterie v této léčbě nádorových onemocnění účinnější než G^- bakterie. Nejsou k dispozici vhodné materiály, které bychom mohli porovnat. Aby porovnání mezi studii bylo objektivní, je třeba vyhledat G^+ a G^- bakterie použité samostatně k léčbě stejného druhu nádorového onemocnění. Shodná by musela být také jejich koncentrace aplikovaná do léčebného objektu stejného typu onemocnění. V neposlední řadě by soubor sledovaných případů musel být dostatečně velký a obsahovat více zástupců ze skupiny gram pozitivních a gram negativních bakterií.

Takovéto porovnatelné soubory se nám nepodařilo nalézt, proto jsme museli přistoupit alespoň k zjednodušenému porovnání G^+ a G^- bakterií použitých na jeden typ nádorových buněk (**Tab. 4**). Přestože výsledky tohoto pozorování nejsou ověřené, mohou nám alespoň nastínit odpověď na výše položenou otázku.

Tab. 4: Porovnání účinnosti teplem upravené *Serratia marcescens*-G⁻ bakterie a teplem upravené *Streptococcus pyogenes*-G⁺ bakterie na Meth A sarkomu u Balb/c myši, Wiemann a Starnes 1994.

Název bakterie	Gramovo barvení	Objem	Vylé ené/ lé ené	Mortalita	Relapse
<i>Serratia marcescens</i>	G ⁻	2.0 µL	0/5	5/5	–
		1.0 µL	3/5	1/5	1/5
		0.5 µL	4/5	0/5	1/5
		0.3 µL	1/5	0/5	4/5
		0.13 µL	0/5	0/5	5/5
<i>Streptococcus pyogenes</i>	G ⁺	10 mg ^l	0/5	0/5	5/5
		1 mg ^l	0/5	0/5	5/5
		136,8 µL	0/5	0/5	5/5
		17,1 µL	0/5	0/5	5/5

Z **Tab. 4** je zřejmé, že účinnější v léčbě byla bakterie *Serratia marcescens*, která je gramnegativní. Použití této bakterie vykazovalo v době počet vyléčených jedinců z celkového počtu léčených. Ale zároveň *Serratia marcescens* vykazovala vyšší mortalitu jedinců ve srovnání s bakterií *Streptococcus pyogenes* (Wiemann a Starnes 1994). Z **Tab. 4** by se mohlo zdát, že účinnější terapeutický efekt měla *Serratia marcescens*, tedy gramnegativní bakterie obsahující ve své bakteriální stěně LPS. Ale výsledky jsou z důvodů uvedených dříve nepravdivé.

V současné době v terapii pomocí PAMPs si navíc můžeme vybírat cíleně jednotlivé části bakteriálních stěn obou skupin bakterií (gram pozitivních i gram negativních), nebo je dokonce spolu kombinovat, abychom dosáhli aktivace co nejdříve po tu TLR.

Otázka 2.: Je efektivnější používat živé, atenuované nebo inaktivované bakterie?

Tuto otázku si kladli v době již od prvních experimentálních pokusů. Je zde zřejmé, že silnější imunitní odpověď vyvolávají živé bakterie, ale na úkor zdravotního stavu pacienta.

Pokud živé bakterie vpravíme ufl do nádorovým onemocněním oslabeného pacienta, je zde velké riziko úmrtí kvůli velmi silné infekci. To si uvědomovali i v době před stolety. I samotný Coley v podstatě zakladatel této imunoterapeutické metody řešil toto dilema (Coley 1910). Proto byla snaha využívat mrtvé (inaktivované) bakterie. Inaktivované bakterie jsou

usmrcené bakterie, tudíž nejsou schopné se replikovat v hostitelském organismu. Inaktivované bakterie bohužel nevyvolaly dostatečně silnou imunitní odpověď.

Později se začaly používat tzv. atenuované bakterie. To jsou živé bakterie, zbavené patogenity. Takto upravené bakterie mají značnou výhodu v tom, že dokáží v těle pacienta vyvolat infekci, ale bez klinických příznaků oslabující pacienta.

Atenuované vakcíny se staly hojně používané, je to dáno tímto kompromisem, jak vytvořit pro pacienta bezpečnější léčbu, ale zároveň účinnou.

V **Tab. 5** jsou shrnuty poznatky o používaných typech bakterií (atenuované a inaktivované) v jednotlivých typech nádorové imunoterapie. Vše jsme zaznamenali do následující tabulky **Tab. 5.**, Coley 1910, Lamm a kol. 1981, Jean a kol. 2008, Krieg 2008, Rhee a kol. 2008).

Tab. 5: Léčba nádorů pomocí bakterií a jejich aktivita.

Typ terapie	Název bakterie	Forma bakterie
Coley toxins	<i>Serratia marcescens</i> <i>Streptococcus pyogenes</i>	atenuované
BCG vakcína	<i>Mycobacterium bovis</i>	atenuované
Terapie bakteriemi specificky rostoucími v nádorovém mikroprostředí	<i>Salmonella typhimurium</i> <i>Clostridium novyi</i>	atenuované
Terapie pomocí PAMPs	celá sada bakterií (př. <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella</i>)	inaktivované

Pouze Coley v začátcích svého výzkumu používal živé neatenuované bakterie. Léčba živými bakteriemi sice vykazovala imunitní odpověď, ale u pacientů nastala silná infekce, která v některých případech vedla k jejich smrti. Proto Coley vykouřel bakterie inaktivované. Ovšem tyto usmrcené bakterie nevyvolávaly žádnou imunitní odpověď. Proto se uchýlil k používání atenuovaných bakterií, u kterých byla oslabena jejich patogenita, a tudíž tolik nepoškozovaly zdraví pacienta (Wiemann a Starnes 1994).

V současné době jsou používány části bakteriálních stěn, tedy plně inaktivovaných bakterií v léčbě pomocí PAMPs. Nelze jednoznačně říct, zda jsou účinnější živé, atenuované či zcela inaktivované bakterie. Neexistuje dostatečné množství srovnatelných pokusů k

vyvozování závěrů. V první řadě je však důležité bezpečnost pro pacienta a tak se upouští od používání živých bakterií.

Otázka 3.: Je lepší používat celá těla bakterií nebo jen části bakterií?

Z historických záznamů víme, že byly používány především celá těla bakterií. Bylo tomu tak u Coleyho, BCG vakcíny i u anaerobních bakterií rostoucích striktně v mikroprostředí nádoru. V současné době se používají jen ty, které cílově vybrané bakteriální motivy, a to hlavně v terapii nádorových onemocnění pomocí PAMPs. Koncem minulého století se začalo objevovat tvrzení, že bakterie jsou imunitním systémem rozpoznávány jen podle několika motivů na jejich povrchu pomocí TLR receptorů. A tak se začalo uvažovat nad tím, že ke stimulaci imunitního systému by měly stačit jen ty jednotlivé bakteriální motivy interagující s TLR. Domněnka se potvrdila a později byl ke každému TLR přidán specifický ligand, který ho stimuloval. Proto v současné době přelomem byla na systém používání těchto bakteriálních částí.

Ale i v současné době se stále používají u povrchových nádorů mořského mořského BCG vakcíny, které neobsahují nic jiného, než celá těla bakterií.

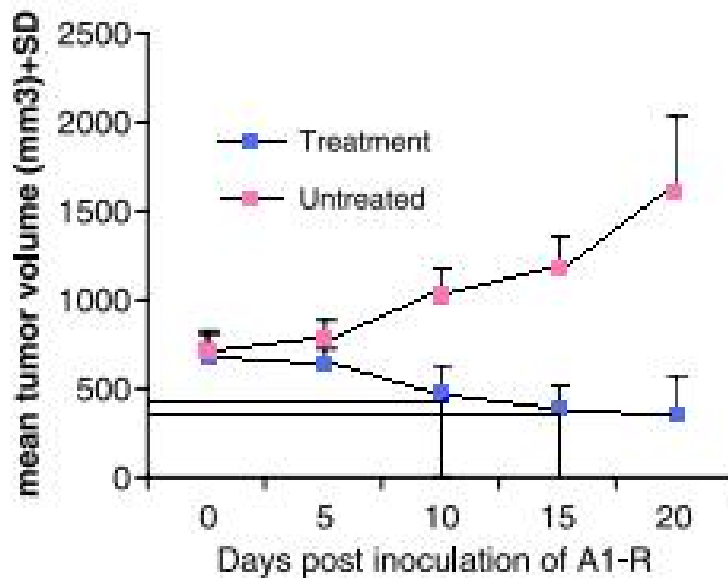
Nelze proto jednoznačně říci, co je lepší a efektivnější, avšak dnešní zkoumané terapie se uchylují především k používání částí buněk než k používání celých těl bakterií.

V následující tabulce (**Tab. 6**) je zaznamenána forma bakterií v jednotlivých typech imunoterapie nádorových onemocnění (Coley 1910, Lamm a kol. 1981, Jean a kol. 2008, Krieg 2008, Rhee a kol. 2008).

Tab. 6: Použití bakterií v léčbě nádorů, řešení otázky celé bakterie versus jejich části.

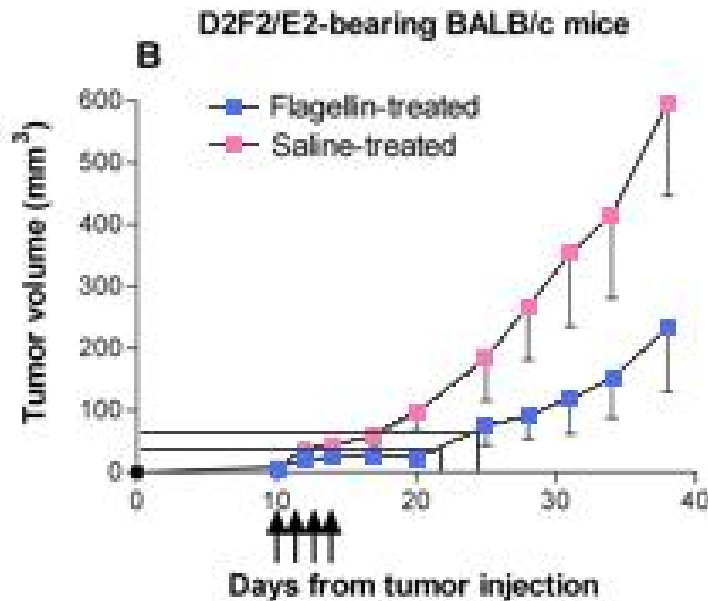
Typ terapie	Název bakterie	Forma bakterie
Coley toxins	<i>Serratia marcescens</i> <i>Streptococcus pyogenes</i>	celá těla bakterií
BCG vakcína	<i>Mycobacterium bovis</i>	celá těla bakterií
Terapie bakteriemi specificky rostoucími v nádorovém mikroprostředí	<i>Salmonella typhimurium</i> <i>Clostridium novyi</i>	celá těla bakterií
Terapie pomocí PAMPs	celá těla bakterií (př.: <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella</i> ...)	části bakteriálních struktur

Máme se blíže podívat na srovnání využití celých bakterií *Salmonella typhimurium* a flagelinu získaného ze *Salmonella typhimurium* v léčbě nádorové flázy. V jednom případě byly k pokusu použity lidské buňky nádoru prsu A1R MARY-X aplikované subkutánně do nu/nu myši. Nádory byly léčeny celými bakteriemi *Salmonella typhimurium* (viz. Obr. 7). Z grafu je patrné, že při léčbě celou bakterií *Salmonella typhimurium* velikost nádoru klesala mezi 10. a 15 dnem po aplikaci bakterie se nádor podle grafu zmenšil přibližně o 100 mm³ (Zhao a kol. 2006).



Obr. 7: Terapie nádoru prsu (lidské buňky nádoru prsu aplikované nu/nu myším) pomocí celých bakterií *Salmonella typhimurium*, graficky upraveno dle Zhao a kol. 2006.

V dalším pokusu byla pouflita myš line bun k nádoru mlé né flázy D2F2/E2 aplikované s.c. do BALB/c myš v množství 5×10^5 nádorových bun k. K lé b byl pouflíváný flagelin purifikovaný z bakterie *Salmonella typhimurium* (Sfondrini a kol. 2006). Z Obr. 8 je patrné, že pomocí flagelinu ze *Salmonella typhimurium*, velikost nádoru vzrostla mezi 10 a 15 dnem po aplikaci flagelinu přibližně o 20 mm^3 .



Obr. 8: Léba nádoru mlé né flázy (myš line bun k nádoru mlé né flázy D2F2/E2 aplikované s.c. do BALB/c myš) pomocí flagelinu z *Salmonella typhimurium*, graficky upraveno dle Sfondrini a kol. 2006.

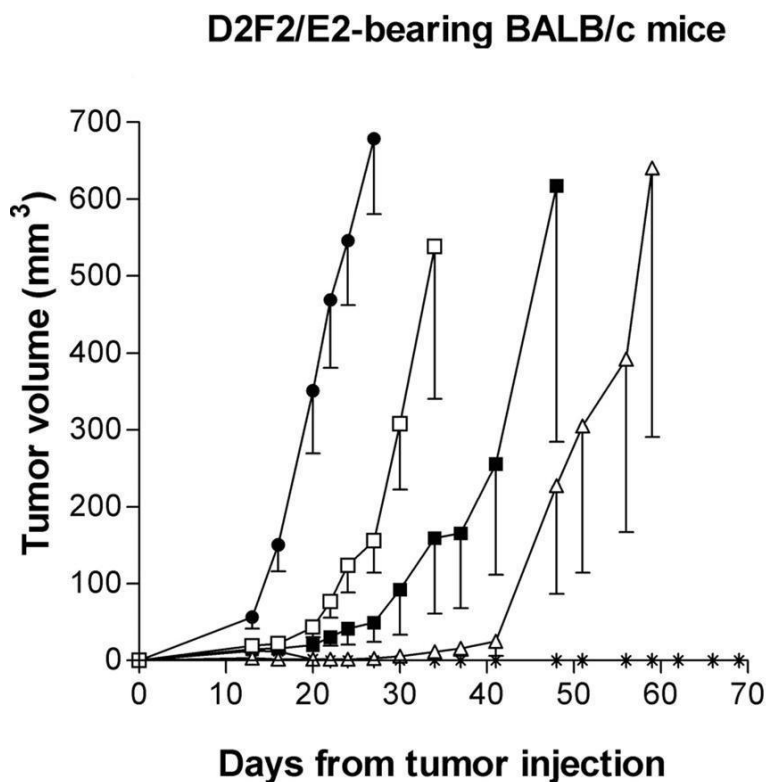
Podle těchto výsledků by se mohlo zdát, že v lébě nádorových onemocnění je užitečná celá bakterie nejen její část. Ale z tohoto srovnání nemůžeme vyvozovat konečné závěry. Opět nebyly splněny všechny podmínky objektivního srovnání. U každého pokusu byly pouflity jiné buněčné linie, jiný druh myš (imunodeficientních nu/nu myš versus BALB/c myš) i jiná velikost implantovaného nádoru. Stejně tak i léba byla v obou případech zahájena přibližně stejnou velikostí nádoru.

Otázka 4.: Je lepší použít jeden TLR ligand nebo směs TLR ligandů ?

Odpověď na tuto otázku není ještě zcela objasněna, ale byly zaznamenány případy, kdy kombinace několika TLR ligandů v lébné dávce vykazovala lepší lébné výsledky, než

TLR ligandy aplikované samostatně. Takže lze předpokládat, že vhodnou kombinací ligandů bychom mohli dosahovat lepších výsledků.

Pro ilustraci bychom mohli uvést příklad lepšího léčebného výsledku při kombinaci ligandů: Aby mohl být dokázán synergistický vztah flagelinu a CpG ODN, byl proveden test, ve kterém byly BALB/c myši injikovány subkutánně nádorové buňky D2F2/E2. Z výsledného grafu (**Obr. 9**) je zřejmé, že spojení účinku flagelinu s CpG ODN má za následek úplnou inhibici růstu nádoru. V porovnání s tím pozdní aplikace samotného flagelinu a samotného CpG ODN sice zpomaluje růst nádoru oproti kontrole, ale jejich kombinace je výrazně účinnější (Sfondrini a kol. 2006).



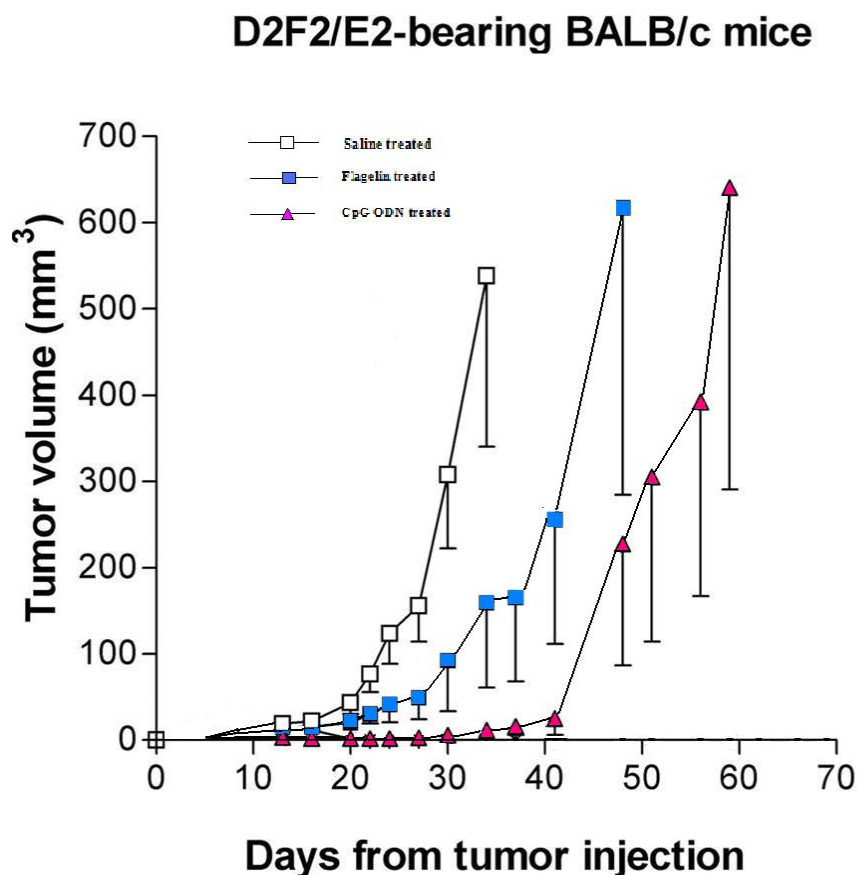
Obr. 9: Studium synergie působení flagelinu a CpG ODN na myši s transplantovanými nádorovými buňkami D2F2/E2. Myši byly rozděleny do pěti skupin. První skupina byla léčena samostatným podáváním samotného flagelinu (●), druhá skupina pozdním podáváním samotného flagelinu (□), třetí skupina podáváním samotného CpG ODN (△), čtvrtá skupina podáváním flagelinu společně s CpG ODN (■) a pátá skupina byla podávána pouze fyziologickým roztokem (*).

Otázka 5.: Má lepší léčebný efekt aktivace vnitřních i vnějších TLR?

Mezi vnitřní (intracelulární) TLR řadíme TLR7, TLR8, TLR3 a TLR9. Ostatní TLR jsou azeny mezi vnější (extracelulární).

Máme vyjít z experimentu prováděným Sfondrini a kol. 2006 citovaného v předchozím odstavci (odpověď na otázku 4). Máme porovnat účinnost ligandu pro intracelulární TLR9 a pro extracelulární TLR5. Aktivátorem TLR5 je v tomto případě flagelin a aktivátorem TLR9 CpG ODN.

Z grafu (**Obr. 10**) je viditelné, že u rakoviny mléčné žlázy myši má lepší terapeutický účinek aktivace intracelulárního TLR 9 pomocí CpG ODN, než aktivace extracelulárního TLR5 pomocí flagelinu. Avšak ne ve všech známých případech byla aktivace TLR9 pomocí CpG úspěšná v takové míře (Sfondrini a kol. 2006). Ani zde nelze tedy vyvozovat jednoznačné závěry, záleží na typu léčené rakoviny, ale i na dalších faktorech, které mají vliv na terapeutický úspěch.



Obr. 10: Srovnání působení flagelinu a CpG ODN na růst nádoru u myši s transplantovanými nádorovými buňkami D2F2/E2.

5. Závěr

- Bylo konstatováno, že na rozdíl od velmi vzácných spontánních nádorových regresí spojených s výskytem infekčních nemocí lze cílenou aplikací bakterií nebo jejich částí docílit výrazných terapeutických výsledků
- Terapie nádorových onemocnění založená na použití patogenních organismů nebo jejich částí poskytuje dosud značně nespolehlivé kolísající výsledky
- Jednou z příčin stavu uvedeného v předchozím bodě je nepochybně to, že není přesně známo, jakým způsobem dochází k případnému tumor inhibujícímu působení imunity. Je uvažována role horečky, HSP, TNF- α , IFN- γ , apod., přesný mechanismus však chybí
- Výrazným úspěchem je sice pochopení rozpoznávání PAMPs pomocí PRR, ale otázka působení imunitního systému na nádorové buňky to z důvodu absence PAMPs na nádorových buňkách neřeší
- Neexistuje jednoznačná odpověď na otázku, zda je lepší lokální aplikace bakterií nebo jejich částí i vyvolání systémové reakce
- Nelze najít odpověď na otázku, zda je výhodnější používat grampozitivní i gramnegativní bakterie
- Přes obtížnost srovnávání lze konstatovat, že použití atenuovaných bakterií je velmi výhodné a užitečné
- Nelze jednoznačně odpovědět na otázku, zda je lepší používat celé bakterie nebo jejich části. Současný trend směřující k používání částí (PAMPs) dosud nepřinesl uchopitelné výsledky
- Až není zatím možné zobecnovat, zdá se, že použití vhodných kombinací PAMPs může být výhodné
- Není dosud dostatek podkladů pro srovnání, které PAMPs jsou nejúčinnější
- Imunoterapie založená na použití patogenních organismů a jejich částí nabízí tím, že stimuluje vlastní obranné mechanismy organismu užitečnou možnost likvidace nádoru prakticky bez vedlejších účinků. Je však třeba pochopit všechny podstatné okolnosti, aby ji bylo možné spolehlivě zamířit proti nádorům, což se dosud nepodařilo.

Použitá literatura

- Akira, S. & Hemmi, H. 2003. Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. *Immunology Letters*. 85: 85-95.
- Akira, S., Uematsu, S. & Takeuchi, O. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 124: 783-801.
- Akira, S., Yamamoto, M. & Takeda, K. 2003. Role of adapters in Toll-like receptor signaling. *Biochemical Society Transaction*. 31: 637-642.
- Ames, B. N., Gold, L. S. & Willett, W. C. 1995. The causes and prevention of cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 92: 5258-5265.
- Appelquist, S. E., Rollman, E., Wareing, M. D., Lidén, M., Rozell, B., Hinkula, J. & Ljunggren, H.-G. 2005. Activation of innate immunity, inflammation, and potentiation of DNA vaccination through mammalian expression of the TLR5 agonist flagellin. *The Journal of Immunology*. 175: 3882-3891.
- Avogadri, F., Mittal, D., Saccheri, F., Sarrafiore, M., Ciocca, M., Larghi, P., Orecchia, R. & Rescigno, M. 2008. Intra-tumoral *Salmonella typhimurium* induces a systemic anti-tumor immune response that is directed by low-dose radiation to treat distal disease. *European Journal of Immunology*. 38: 1937-1947.
- Banchereau, J. & Steinman, R. M. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 392: 245-252.
- Bianchi, M. E. 2007. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *Journal of Leukocyte Biology*. 81: 1-5.
- Carty, M. & Bowie, A. G. 2011. Evaluating the role of Toll-like receptors in diseases of the central nervous system. *Biochemical Pharmacology*. 81: 825-837.
- Coley, W. B. 1891. Contribution to the knowledge of sarcoma. *Annals of Surgery*. 14: 199-220.
- Coley, W. B. 1910. The treatment of inoperable sarcoma by bacterial toxins: (the mixed toxins of the *Streptococcus erysipelas* and the *Bacillus prodigiosus*). *Proceedings of the Royal Society of Medicine*. 3: 1-48.
- Comings, D. E. 1973. A general theory of carcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 70: 3324-3328.
- Coussens, L. M. & Werb, Z. 2002. Inflammation and cancer. *Nature*. 420: 860-867.
- Creech, O., Kremenz, E. T., Ryan, R. F. & Winblad, J. N. 1958. Chemotherapy of cancer: regional perfusion utilizing an extracorporeal circuit. *Annals of Surgery*. 148: 616-632.

- Decker, W. K. & Safdar, A. 2009. Bioimmunoadjuvants for the treatment of neoplastic and infectious disease: Coley's legacy revisited. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 20: 271-281.
- Delaney, G., Jacob, S., Featherstone, C. & Barton, M. 2005. The role of radiotherapy in cancer treatment: Estimating optimal utilization from a review of evidence-based clinical guidelines. *Cancer*. 104: 1129-1137.
- Dunn, G. P., Old, L. J. & Schreiber, R. D. 2004. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*. 21: 137-148.
- Eriksson, B., Jorup-Rönström, C., Karkkonen, K., Sjöblom, A. C. & Holm, S. E. 1996. Erysipelas: clinical and bacteriologic spectrum and serological aspects. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 23: 1091-1098.
- Ershler, W. B. 1993. The influence of an aging immune system on cancer incidence and progression. *The Journals of Gerontology*. 48: B3-B7.
- Everson, T. C. & Cole, W. H. 1956. Spontaneous regression of cancer: preliminary report. *Annals of Surgery*. 144: 366-380.
- Forman, D. 1998. *Helicobacter pylori* infection and cancer. *British Medical Bulletin*. 54: 71-78.
- Gohda, J., Matsumura, T. & Inoue, J. 2004. Cutting edge: TNFR-associated factor (TRAF) 6 is essential for MyD88-dependent pathway but not toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor-inducing IFN- γ (TRIF)-dependent pathway in TLR signaling. *The Journal of Immunology*. 173: 2913-2917.
- Grulich, A. E., Wan, X., Law, M. G., Coates, M. & Kaldor, J. M. 1999. Risk of cancer in people with AIDS. *AIDS*. 13: 839-843.
- Havránek, O., Krhut, J., Nmec, D., Král, R. & Häring, Z. 2010. Komplikace intravezikální terapie svalovinu neinfiltujícího uroteliálního karcinomu močového měchýře vakuací bacillus Calmette-Guerine (BCG). *Czech Urology*. 14: 92-98.
- Hayashi, F., Means, T. K. & Luster, A. D. 2003. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood*. 102: 2660-2669.
- Hayashi, K., Zhao, M., Yamauchi, K., Yamamoto, N., Tsuchiya, H., Tomita, K. & Hoffman, R. M. 2009. Cancer metastasis directly eradicated by targeted therapy with a modified *Salmonella typhimurium*. *Journal of Cellular Biochemistry*. 106: 992-998.
- Heyn, R. M., Joo, P., Karon, M., Nesbit, M., Shore, N., Breslow, N., Weiner, J., Reed, A. & Hammond, D. 1975. BCG in the treatment of acute lymphocytic leukemia. *Blood*. 46: 431-442.

- Hicks, A. M., Riedlinger, G., Willingham, M. C., Alexander-Miller, M. A., Kap-Herr, C. V., Pettenati, M. J., Sanders, A. M., Weir, H. M., Du, W., Kim, J., Simpson, A. J. G., Old, L. J. & Cui, Z. 2006. Transferable anticancer innate immunity in spontaneous regression/complete resistance mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103: 7753-7758
- Hirama, T. & Koeffler, H. P. 1995. Role of the cyclin-dependent kinase inhibitors in the development of cancer. *Blood*. 86: 841-854.
- Hobohm, U. 2009. Healing heat: harnessing infection to fight cancer [online]. [citováno 22. 4. 2011]. Dostupné z WWW: <<http://www.americanscientist.org/issues/id.5439,y.2009,no.1,content.true,page.2,css.print/issue.aspx>>.
- Hobohm, U., Stanford, J. L. & Grange, J. M. 2008. Pathogen-associated molecular pattern in cancer immunotherapy. *Critical Reviews in Immunology*. 28: 95-107.
- Holmes, E. C., Morton, D. L. & Eilber, F. R. 1977. Immunotherapy of cancer. *Medical Progress*. 126: 102-109.
- Hoption, C., van Netten, J. P. & van Netten, C. 2003. Dr William Coley and tumour regression: a place in history or in the future. *Postgraduate Medical Journal*. 79: 672-680.
- Hoption Cann, S. A., van Netten, J. P., van Netten, C. & Glove, D. W. 2002. Spontaneous regression: a hidden treasure buried in time. *Medical Hypotheses*. 58: 115-119.
- Horng, T., Barton, G. M. & Medzhitov, R. 2001. TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nature Immunology*. 2: 835-841.
- Huang, B., Zhao, J., Li, H., He, K.-L., Chen, Y., Mayer, L., Unkeless, J. C. & Xiong, H. 2005. Toll-like receptors on tumor cells facilitate evasion of immune surveillance. *Cancer Research*. 65: 5009-5014.
- Huang, B., Zhao, J., Unkeless, J. C., Feng, Z. H. & Yiong, H. 2008. TLR signaling by tumor and immune cells: a double-edged sword. *Oncogene*. 27: 218-224.
- Chen, R., Alvero, A. B., Silasi, D.-A., Steffensen, K. D. & Mor, G. 2008. Cancers take their Toll^o the function and regulation of Toll-like receptors in cancer cells. *Oncogene*. 27: 225-233.
- Chen, X., Lowe, M., Herliczek, T., Hall, M. J., Danes, C., Lawrence, D. A. & Keyomarsi, K. 2000. Protection of normal proliferating cells against chemotherapy by staurosporine-mediated, selective, and reversible G1 arrest. *Journal of the National Cancer Institute*. 92: 1999-2008.
- Janeway, C. A. 2005. *Immunobiology: the immune system in health and disease*. Garland Science, Taylor & Francis Group, New York, 823 pp.
- Janeway, C. A., Jr. 1989. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. 54: 1-13.

- Janeway, C. A. & Medzhitov, R. 2002. Innate immune recognition. *Annual Review of Immunology*. 20: 197-216.
- Janssens, S. & Beyaert, R. 2003. Role of Toll-like receptors in pathogen recognition. *Clinical Microbiology Reviews*. 16: 637-646.
- Jean, A. T., Zhang, M. & Forbes, N. S. 2008. Bacterial therapies: completing the cancer treatment toolbox. *Current opinion in Biotechnology*. 19: 511-517.
- Johansson, S. L. & Cohen, S. M. 1997. Epidemiology and etiology of bladder cancer. *Seminars in Surgical oncology*. 13: 291-298.
- Kanzler, H., Barrat, F. J., Hessel, E. M. & Coffman, R. L. 2007. Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists. *Nature Medicine*. 13: 552-559.
- Kawaciuk, I. 2000. *Urologie*. H & H, Jino any, 308 pp.
- Kleef, R., Jonas, W. B., Knogler, W. & Stenzinger, W. 2001. Fever, cancer incidence and spontaneous remission. *NeuroImmunoModulation*. 9: 55-64.
- Klein, C. A., Schmidt-Kittler, O., Scgardt, J. A., Pantel, K., Speicher, M. R. & Riethmüller, G. 1999. Comparative genomic hybridization, loss of heterozygosity, and DNA sequence analysis of single cells. *Proprietary Rights Notice for the Proceedings of the National Academy of Sciences*. 96: 4494-4499.
- Klener, P. & Klener, P. j. 2009. *Nová protinádorová lé iva a lé ebné strategie v onkologii*. Grada, Praha, 232 pp.
- Krejsek, J. & Kopecký, O. 2004. *Klinická imunologie*. Nucleus HK, Hradec Králové, 941 pp.
- Krieg, A. M. 2007. Development of TLR9 agonists for cancer therapy. *The Journal of Clinical Investigation*. 117: 1184-1194.
- Krieg, A. M. 2008. Toll-like receptor 9 (TLR9) agonists in the treatment of cancer. *Oncogene*. 27: 161-167.
- Kuper, H., Adami, O.-H. & Trichopoulos, D. 2000. Infections as a major preventable cause of human cancer. *Journal of Internal Medicine*. 248: 171-183.
- Kyselová, M. 2009. BCG imunoterapie nádor mo ového m chý e. *Urologie pro praxi*. 10: 302-304.
- Lagranderie, M. R., Balazuc, A. M., Deriaud, E., Leclerc, C. D. & Gheorghiu, M. 1996. Comparison of immune responses of mice immunized with five different *Mycobacterium bovis* BCG vaccine strains. *Infection and Immunity*. 64: 1-9.

- Lamm, D. L., Thor, D. E., Winters, W. D., Stogdill, V. D. & Radwin, H. M. 1981. BCG immunotherapy of bladder cancer: Inhibition of tumor recurrence and associated immune responses. *Cancer*. 48: 82-88.
- Levine, D. B. 2008. The hospital for the ruptured and crippled: William Bradley Coley,. Third Surgeon-in-Chief 1925-1933. *The Musculoskeletal Journal of Hospital for Special Surgery*. 4: 1-9.
- Lin, W.-W. & Karin, M. 2007. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *The Journal of Clinical Investigation*. 117: 1175-1183.
- Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A. & Balkwill, F. 2008. Cancer- related inflammation. *Nature*. 454: 436-444.
- Mariani, C. L., Rajon, D., Bova, F. J. & Streit, W., J. 2007. Nonspecific immunotherapy with intratumoral lipopolysaccharide and zymosan A but not GM-CSF leads to an effective anti-tumor response in subcutaneous RG-2 gliomas. *Journal of Neuro- Oncology*. 85: 231-240.
- Martins-Green, M., Boudreau, N. & Bissell, N. J. 1994. Inflammation is responsible for the development of wound-induced tumors in chickens infected with Rous sarcoma virus1. *Cancer Research*. 54: 4334-4341.
- McCarthy, E. F. 2006. The toxins of William B. Coley and the treatment of bone and soft-tissue sarcomas. *The Iowa Orthopaedic Journal*. 26: 154-158.
- Medzhitov, R. & Janeway, C. A. 1997. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell*. 91: 295-298.
- Meyer, J.-P., Persad, R. & Gillatt, D. A. 2002. Use of bacille Calmette-Guérin in superficial bladder cancer. *Postgraduate Medical Journal*. 78: 449-454.
- Michelsen, K. S., Aicher, A., Mohaupt, M., Hartung, T., Dimmeler, S., Kirschning, C. J. & Schumann, R. R. 2001. The role of toll-like receptors (TLRs) in bacteria-induced maturation of murine dendritic cells (DCS). Peptidoglycan and lipoteichoic acid are inducers of DC maturation and require TLR2. *The Journal of biological chemistry*. 276: 25680-25686.
- Minton, N. P. 2003. *Clostridia* in cancer therapy. *Nature Reviews Microbiology*. 1: 237-242.
- Nau, G. J., Richmond, J. F. L., Schlesinger, A., Jennings, E. G., Lander, E. S. & Young, R. A. 2002. Human macrophage activation programs induced by bacterial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99: 1503-1508.
- Nauts, H. C. & McLaren, J. R. 1990. Coley toxins-the first century. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 267: 483-500.

- Nauts, H. C., Swift, W. E. & Coley, B. L. 1945. The treatment of malignant tumors by bacterial toxins as developed by the late William B. Coley, M.D., reviewed in the light of modern research. *Cancer Research*. 6: 205-216.
- Oelschlaeger, T. A. 2010. Bacterial as tumor therapeutics? *Bioengineered Bugs*. 1: 146-147.
- Oettinger, T., Jørgensen, M., Ladefoged, A., Hasløv, K. & Andersen, P. 1999. Development of the *Mycobacterium bovis* BCG vaccine: review of the historical and biochemical evidence for a genealogical tree. *Tubercle and Lung Disease*. 79: 243-250.
- Ohashi, K., Burkart, V., Flohé, S. & Kolb, H. 2000. Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the Toll-like receptor-4 complex. *The Journal of Immunology*. 164: 558-561.
- Ohshima, H. & Bartsch, H. 1994. Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors: possible role of nitric oxide in carcinogenesis. *Mutation Research*. 305: 253-264.
- Okamoto, M. & Sato, M. 2003. Toll-like receptor signaling in anti-cancer immunity. *The Journal of Medical Investigation*. 50: 9-24.
- Oldham, R. K. 1983. Monoclonal antibodies in cancer therapy. *Journal of Clinical Oncology*. 1: 582-590.
- Opdenakker, G. & Van Damme, J. 2004. The countercurrent principle in invasion and metastasis of cancer cells. Recent insights on the roles of chemokines. *The International Journal of Developmental Biology*. 48: 519-527.
- Overwijk, W. W. & Restifo, N. P. 2000. Autoimmunity and the immunotherapy of cancer: targeting the "self" to destroy the "other". *Critical Reviews in Immunology*. 20: 433-450.
- Pearl, R. 1929. Cancer and tuberculosis. *American Journal of Hygiene*. 9: 97-159.
- R&D systems. 2004. The Toll-like receptor family [online]. [citováno 22. 4. 2011]. Dostupné z WWW:< http://www.rndsystems.com/mini_review_detail_objectname_MR04_TollLikeReceptorFamily.aspx>.
- Rakoff-Nahoum, S. & Medzhitov, R. 2009. Toll-like receptors and cancer. *Nature Reviews Cancer*. 9: 57-63.
- Rhee, S. H., Im, E. & Pothoulakis, C. 2008. Toll-like receptor 5 engagement modulates tumor development and growth in a mouse xenograft model of human colon cancer. *Gastroenterology*. 135: 518-528.
- Romagne, F. 2007. Current and future drugs targeting one class of innate immunity receptors: the Toll-like receptors. *Drug Discovery Today*. 12: 80-87.
- Rosenberg, S. A., Spiess, P. J. & Kleiner, D. E. 2002. Antitumor effects in mice of the intravenous injection of attenuated *Salmonella typhimurium*. *Journal of Immunotherapy*. 25: 218-225.

- Rous, P. 1911. A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cells. *The Journal of Experimental Medicine*. 13: 397-411.
- Salton, M. R. S. & Kim, K.-S. 2000. Medical microbiology [online]. [citováno 22. 4. 2011]. Dostupné z WWW:< <http://eglobalmed.com/core/MedicalMicrobiology/gsbs.utmb.edu/microbook/ch002.html>>.
- Sato, Y., Goto, Y., Narita, N. & Hoon, D. S. B. 2009. Cancer cells expressing toll-like receptors and the tumor microenvironment. *Cancer Microenvironment*. 2: S205-S214.
- Seya, T., Begum, N. A., Nomura, M., Tsuji, S., Matsumoto, M., Hayashi, A., Azuma, I. & Toyoshima, K. 2000. Innate immune therapy for cancer. Screen for molecules capable of activating the innate immune system. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 465: 229-237.
- Seya, T., Shime, H., Ebihara, T., Oshiumi, H. & Matsumoto, M. 2009. Pattern recognition receptors of innate immunity and their application to tumor immunotherapy. *Cancer Science*. 101: 313-320.
- Sfondrini, L., Rossini, A., Besusso, D., Merlo, A., Tagliabue, E., Mènard, S. & Balsari, A. 2006. Antitumor activity of the TLR-5 ligand flagellin in mouse models of cancer. *The Journal of Immunology*. 176: 6624-6630.
- Schellhammer, P. F., Ladaga, L. E. & Fillion, M. B. 1986. Bacillus Calmette-Guérin for superficial transitional cell carcinoma of the bladder. *Journal of Urology*. 135: 261-264.
- Schön, M. P. & Schön, M. 2008. TLR7 and TLR8 as targets in cancer therapy. *Oncogene*. 27: 190-199.
- Stanley, M. A., Pett, M. R. & Coleman, N. 2007. HPV: from infection to cancer. *Biochemical Society Transactions*. 35: 1456-1460.
- Stewart, F. W. 1952. Experiences in spontaneous regression of neoplastic disease in man. *Texas Reports on Biology and Medicine*. 10: 239-253.
- Sznol, M., Lin, S. L., Bermudes, D., Zheng, L.-M. & King, I. 2000. Use of preferentially replicating bacteria for the treatment of cancer. *The Journal of Clinical Investigation*. 105: 1027-1030.
- Takahashi, K., Ip, W. K. E., Michelow, L. C. & Ezekowitz, R. A. B. 2006. The mannose-binding lectin: a prototypic pattern recognition molecule. *Current Opinion in Immunology*. 18: 16-23.
- Takeda, K. & Akira, S. 2005. Toll-like receptors in innate immunity. *International Immunology*. 17: 1-14.
- Takeda, K. & Akira, S. 2004. TLR signaling pathways. *Seminars in Immunology*. 16: 3-9.

- Thomson, P. D. & Smith, D. J. 1994. What is infection? *The American Journal of surgery*. 167: S7-S11.
- Triantafilou, M. & Triantafilou, K. 2002. Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster. *Trends in Immunology*. 23: 301-304.
- Tsan, M.-F. 2006. Toll-like receptors, inflammation and cancer. *Seminars in Cancer Biology*. 16: 32-37.
- Underhill, D. M. 2003. Toll-like receptors: networking for success. *European Journal of Immunology*. 33: 1767-1775.
- Vabulas, R. M., Wagner, H. & Schild, H. 2002. Heat shock proteins as ligands of toll-like receptors. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 270: 169-184.
- Volkert, W. A., Goeckele, W. F., Ehrhardt, G. J. & Ketring, A. R. 1991. Therapeutic radionuclides: production and decay property. *The Journal of Nuclear Medicine*. 32: 174-185.
- Wang, R.-F. 2008. CD8⁺ regulatory T cells, their suppressive mechanisms, and regulation in cancer. *Human Immunology*. 69: 811-814.
- Wang, R.-F., Miyahara, Y. & Wang, H. Y. 2008. Toll-like receptors and immune regulation: implications for cancer therapy. *Oncogene*. 27: 181-189.
- Wang, R.-F., Peng, G. & Wang, H. Y. 2006. Regulatory T cells and Toll-like receptors in tumor immunity. *Seminars in Immunology*. 18: 136-142.
- West, A. P., Koblansky, A. A. & Ghosh, S. 2006. Recognition and signaling by Toll-like receptors. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 22: 409-437.
- Wiemann, B. & Starnes, C. O. 1994. Coley's toxins, tumor necrosis factor and cancer research: a historical perspective. *Pharmacology & Therapeutics*. 64: 529-564.
- Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Sanjo, H., Takeuchi, O., Sugiyama, M., Okabe, M., Takeda, K. & Akira, S. 2003a. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent Toll-like receptor signaling pathway. *Science*. 301: 640-643.
- Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Uematsu, S., Hoshino, K., Kaisho, T., Takeuchi, O., Takeda, K. & Akira, S. 2003b. TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nature Immunology*. 4: 1144-1150.
- Zganiacz, A., Santosuosso, M., Wang, J., Yang, T., Chen, L., Anzulovic, M., Alexander, S., Gicquel, B., Wan, Y., Bramson, J., Inman, M. & Xing, Z. 2004. TNF- α is a critical negative regulator of type 1 immune activation during intracellular bacterial infection. *The Journal of Clinical Investigation*. 113: 401-414.
- Zhao, M., Yang, M., Ma, H., Li, X., Tan, X., Li, S., Yang, Z. & Hoffman, R. M. 2006. Targeted therapy with a *Salmonella typhimurium* leucine- arginine auxotroph cures orthotopic human breast tumors in nude mice. *Cancer Research*. 66: 7647-7652.