

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

Anti-CD47 protilátka v nádorové terapii

Bakalářská práce

Radka Lencová

Školitel: RNDr. Jan Ženka, CSc.

České Budějovice 2018

Lencová, R., 2018: Anti-CD47 protilátka v nádorové terapii. [The anti-CD47 antibody in cancer therapy. Bc. Thesis, in Czech] – 48 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

The aim of this thesis was to answer question whether it is possible to improve the effect of cancer immunotherapy. This therapy is based on the combination of TLR agonists and the ligands stimulating phagocytosis. We used anti-CD47 antibody to block CD47 on tumor cells. The second question was whether it is practicable to reduce the number of vaccine applications.

Prohlášení:

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

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

V Českých Budějovicích dne 18. dubna 2018

.....
Radka Lencová

Poděkování:

Mé díky patří především mému školiteli RNDr. Janu Ženkovi, CSc. za odborné vedení, veškerou poskytnutou pomoc, rady a ochotu. Děkuji také za příležitost podílet se na zajímavém a záslužném projektu. Je to pro mě velice cenná zkušenost.

Dále chci poděkovat svým starším kolegům, především Bc. Ondřeji Uhrovi, za veškerou poskytnutou pomoc.

Obsah

1 Úvod	1
1.1 Nádorová onemocnění.....	2
1.1.1 Epidemiologie.....	2
1.1.2 Nádor	2
1.1.3 Obecné vlastnosti nádorů.....	2
1.1.4 Dělení nádorů	3
1.1.5 Nádory pankreatu	3
1.1.5.1 Léčba pankreatických nádorů	3
1.1.5.2 Diagnostika pankreatických nádorů.....	4
1.1.5.3 Incidence rakoviny pankreatu v České republice	4
1.1.6 Myší pankreatický adenokarcinom nádorové linie Panc02.....	6
1.2 Imunitní systém a nádorová imunoterapie.....	6
1.2.1 Hlavní funkce imunitního systému.....	6
1.2.2 Složky imunitního systému	7
1.2.2.1 Leukocyty	7
1.2.2.2 Cytokiny.....	8
1.2.3 Vrozená imunita	8
1.2.4 Složky vrozené imunity a nádorová onemocnění.....	9
1.2.4.1 Rozpoznávací mechanismy buněk vrozené imunity.....	9
1.2.4.2 Toll-like receptory	10
1.2.4.2.1 TLR agonisté používaní naším týmem v nádorové imunoterapii a mechanismus jejich fungování.....	10
1.2.4.3 MBL, MR, CR3	11
1.2.4.3.1 Manan-BAM používaný naším týmem v nádorové imunoterapii a mechanismus jeho fungování.....	12
1.2.4.4 Buněčná vrozená imunita a nádorová onemocnění	13
1.2.4.4.1 Anti-CD40 protilátka používaná naším týmem v nádorové imunoterapii a mechanismus jejího fungování	14
1.2.4.5 Humorální vrozená imunita a nádorová onemocnění	15
1.2.5 Získaná imunita	15
1.2.6 Složky získané imunity a nádorová onemocnění	15
1.2.7 Schopnost úniku pankreatického adenokarcinomu imunitnímu systému	16
1.3 CD47 a jeho role při úniku rakovinných buněk vrozenému imunitnímu systému.....	17

1.3.1	Anti-CD47 protilátka.....	18
1.3.2	Možný dopad přidání anti-CD47 protilátky ke stávající vakcíně.....	18
1.4	Vakcinace.....	19
1.4.1	Terapeutická nádorová vakcinace	20
2	Cíle práce.....	22
3	Materiály	23
3.1	Laboratorní myši	23
3.2	Nádorová buněčná linie	23
3.3	Chemikálie.....	23
4	Metody	25
4.1	Příprava buněk Panc02	25
4.2	Příprava myši a transplantace buněk Panc02.....	25
4.3	Příprava chemikálií.....	25
4.4	Schéma experimentů.....	26
4.4.1	Pokus č. 1 – Léčba pankreatického adenokarcinomu za pomoci anti-CD47 protilátky	26
4.4.2	Pokus č. 2 – Léčba pankreatického adenokarcinomu podle dvou různých vakcinačních schémat.....	27
4.5	Měření velikosti nádorů.....	28
4.8	Statistické vyhodnocení	29
5	Výsledky.....	30
5.1	Pokus č. 1	30
5.2	Pokus č. 2	33
6	Diskuse	36
7	Závěr	39
8	Citovaná literatura	40

1 Úvod

Nádorová onemocnění, známá též jako rakovina, jsou souborem chorob, jejichž společným rysem je nekontrolovatelná, autonomní proliferace buněk různých tkání. To znamená, že se buňky vlastního těla začnou samy od sebe nekontrolovatelně dělit a tím vzniká nádor. Nádorová onemocnění mohou být velmi zákeřná, v mnoha případech neléčitelná a až příliš často smrtelná. Podle údajů Českého statistického úřadu byla rakovina v roce 2016 příčinou takřka 26 % úmrtí v České republice. Současné léčebné metody k vyléčení mnoha typů nádorových onemocnění nestačí a jsou tělu dokonce škodlivé, jelikož kvůli své nespecifičnosti narušují kromě nádorových i zdravé buňky. Je tedy zásadním cílem lidstva nalézt na tento problém nové, efektivnější řešení. Ukazuje se, že by jím mohla být imunoterapie, díky níž by bylo možné cílit léčbu přímo do nádoru, a tím tělo zbavit nejen novotvaru, ale také metastáz.

Tato bakalářská práce se zabývá problematikou nádorové imunoterapie cílené na pankreatický adenokarcinom, jenž je známý svou vysokou mortalitou. Pět let od stanovení diagnózy se dožije jen 8 % nemocných (Siegel a kol., 2017), polovina se dožije maximálně jednoho a půl roku (Hlavsa a kol., 2008). Příznaky výskytu tohoto nádoru se většinou projeví, až když je tumor v pokročilém stádiu. Pankreatický adenokarcinom je pak u pacienta diagnostikován až ve chvíli, kdy je neoperovatelný, nebo se pacientovi po těle již rozšířily metastázy. Vakcína, jež byla vyvinuta týmem RNDr. Jana Ženky, CSc., funguje na principu vrozené i získané imunity a mohla by být řešením tohoto problému.

Smyslem této práce je vylepšení již existující terapie tak, aby byla co nejúčinnější a poradila si i s velkými nádory pankreatického adenokarcinomu. Vhodným vylepšením se zdá být přidání anti-CD47 ke stávající terapii. Dále v této práci zjišťujeme, zda by nebylo možné upravit stávající vakcinační schéma a snížit počet injekcí za pulz. Závěry vyvozené v rešeršní části byly ověřeny experimentálně.

1.1 Nádorová onemocnění

1.1.1 Epidemiologie

Nádorová onemocnění jsou v České republice druhou nejčastější příčinou úmrtí a jsou rovněž druhou nejzávažnější příčinou nemocnosti ekonomicky aktivní části obyvatelstva. Ročně je evidováno 33 tisíc případů pracovní neschopnosti způsobené onemocněním rakovinou. Celkově tvoří ztráty národního důchodu, vydané na léčbu, hospitalizaci, nemocenské dávky a invalidní důchody 8,3 miliardy Kč ročně. Příčiny vysoké úmrtnosti a ekonomických ztrát spočívají jednak v narůstající incidenci, jednak v pozdějším záchytu příznaků nádorových onemocnění. Česká republika zaujímá v celoevropských statistikách v incidenci rakoviny přední místo (Kastnerová, 2016).

1.1.2 Nádor

Nádor je místně neregulovaný růst tkáně o autonomní povaze, který se vymknul z regulačních mechanismů organismu. Příčinou jsou genové mutace v buňce, způsobené různými činiteli. Za normálních okolností jsou buňky schopny svou mutaci detekovat a opravit, anebo alespoň sami sebe zničit aktivací apoptózy. Nádorové bujení může být naprosto neškodné, jako například bradavice, anebo, jako třeba karcinom pankreatu, může v poměrně krátké době postiženého zahubit (Dvořáčková a Gamratová, 2017).

1.1.3 Obecné vlastnosti nádorů

Charakteristické rysy rakoviny zahrnují biologické schopnosti, které nádor získává během svého vývoje. Tyto znaky představují organizační způsob, jakým lze zjednodušit a shrnout jinak složitá neoplastická onemocnění. Zahrnují autonomní proliferační signalizaci, vyhýbání se růstovým supresorům a odolávání buněčné smrti, což jim umožňuje replikační nesmrtelnost. Dalšími znaky jsou pak indukce angiogeneze (tvorby nových kapilár v nádoru), invazivita a tvorba metastáz. Základem těchto charakteristických rysů je nestabilita genomu, která je příčinou genetické rozmanitosti, jež urychluje jejich nárůst, a zánět, který podporuje mnoho funkčních

znaků. Systematický pokrok v posledním desetiletí přinesl do tohoto seznamu další dva znaky – přeprogramování energetického metabolismu a zabránění poškození imunitního systému. Kromě nádorových buněk obsahují tumory také řadu začleněných nenádorových buněk, které přispívají k získání charakteristických rysů vytvářením "mikroprostředí nádorů". Poznávání rozsáhlejší aplikovatelnosti těchto pojmů bude stále více ovlivňovat rozvoj nových prostředků k léčbě rakoviny lidí (Hanahan a Weinberg, 2011).

1.1.4 Dělení nádorů

Tumory lze dělit do skupin z více hledisek. Do několika skupin členíme nádory podle toho, z jaké tkáně novotvar vzešel. Podle jejich biologického chování rozlišujeme nádory nepravé a pravé. Nepravé nádory neboli pseudotumory připomínají nádorové léze, mimo jiné zvětšováním svého objemu, ale mezi pravé nádory nepatří. Pravé nádory pak dále dělíme na nádory nezhooubné (benigní) a zhoubné (maligní). Benigní nádory rostou expanzivně, jsou neinvazivní a nemetastazují. Naproti tomu maligní nádory tvoří metastázy, jsou invazivní, vnikají do okolní tkáně a ničí ji.

1.1.5 Nádory pankreatu

Z praktického hlediska lze nádory pankreatu rozdělit na maligní duktální adenokarcinom, tvořící přes 95 % nádorů této žlázy a ty ostatní, méně časté (nádory cystické, neuroendokrinní, lymfomy a metastázy nádorů jiných lokalizací), přičemž nejhorší prognózu ze všech pankreatických nádorů má právě duktální adenokarcinom (Hlavsa a kol., 2008). Je jedním z biologicky nejagresivnějších nádorů, který se již při malé velikosti šíří nejen lymfatickou cestou, ale také perineurálně – podél nervu (Allema a kol., 1995).

1.1.5.1 Léčba pankreatických nádorů

Obecnou terapeutickou snahou téměř u všech typů pankreatických neoplazií je radikální resekce, tzn. odstranění tumoru do makroskopicky i mikroskopicky tumor negativní tkáně, tzv. R0

resekce, která je považována za jedinou léčebnou metodu, která potenciálně může vést k plnému vyléčení (Hlavsa a kol., 2008). Medián přežití duktálního adenokarcinomu se i po R0 resekcí pohybuje kolem 16 měsíců a celkové pětileté přežití nepřesahuje 10 % (Cameron a kol., 1991; Sohn a kol., 2000; Richter a kol., 2003). Prognóza ostatních pankreatických neoplazií je výrazně lepší s možností plného vyléčení (Hlavsa a kol., 2008).

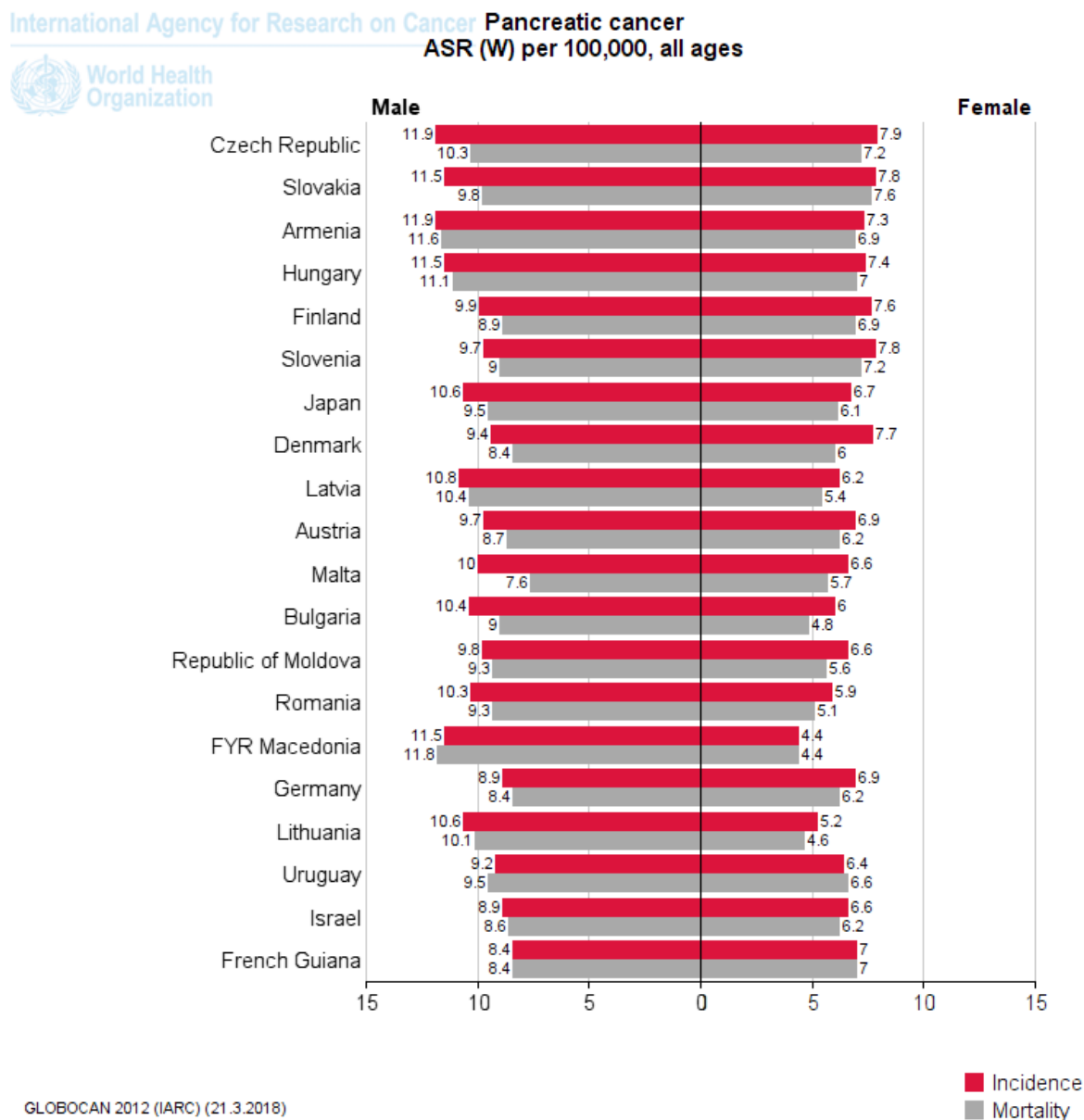
1.1.5.2 Diagnostika pankreatických nádorů

Primární diagnostika pankreatických neoplazií je obtížná. Včasné rozpoznání nádoru je však jedním z hlavních faktorů ovlivňujících prognózu pacientů. Většina pankreatických neoplazií postihuje hlavu pankreatu. Nejčastějším příznakem je žloutenka a zvracení vyvolané útlakem dvanáctníku. Pacienti s těmito příznaky jsou praktikem odesláni na klinické pracoviště, kde jsou kompletně došetřeni a léčeni. V těchto případech je však nádor často již v pokročilém stádiu, bez možnosti kurativní chirurgické léčby (Hlavsa a kol., 2008). Takových nemocných je 70–80 % (Ryska, 2010), třetina z toho má postiženy regionální uzliny, třetina má metastatické postižení jater, u poloviny nemocných je diagnostikována angioinvaze – nádorové buňky jsou prokázány v krevních nebo lymfatických cévách, což indukuje vyšší riziko vzniku metastáz. Každý desátý nemocný má rozšířená ložiska nádoru po pobřišnici (Allema a kol., 1995). Při postižení těla či kaudy (ocas) pankreatu je nádor často diagnostikován v lokálně pokročilém stadiu, kdy prorůstá do žaludku, tračníku, levé nadledviny, ledviny a/nebo magistrálních cév. V případě neoperovatelného nálezu se většina pacientů nedožívá více než 12 měsíců (Hlavsa a kol., 2008). Z toho je patrné, že dosud známé prostředky léčby rakoviny nejsou proti tomuto typu nádoru příliš účinné a je tedy potřeba vyvinout nový způsob léčby, který by si poradil i s neoperovatelnými novotvarami a s metastázemi.

1.1.5.3 Incidence rakoviny pankreatu v České republice

Problém léčby pankreatického adenokarcinomu se přímo dotýká České republiky. Jak je patrné z následujícího grafu (Obr. 1), zaujímala Česká republika v roce 2012 přední místo ve světovém žebříčku incidence rakoviny slinivky břišní. Z grafu je také zjevná její vysoká mortalita. Karcinom pankreatu je dle údajů ÚZIS (Ústav zdravotnických informací a statistiky) z roku 2015

devátou nejčastější malignitou České republiky u mužů a sedmou nejčastější u žen, s incidencí 21,5 u mužů a 19,7 u žen. Jde o nádor staršího věku, většina případů je diagnostikována v 6.–8. decéniu. V literatuře nejčastěji uváděnými rizikovými faktory jsou chronická pankreatitida (zvyšující riziko 5 až 15×) a nikotinismus (Talamini, 1999).



Obr. 1: Graf incidence a mortality rakoviny pankreatu ve 20 zemích světa v roce 2012 (převzato z Globocan, 2012).

Graf ASR (W) – *age-standardized rate (world)*, tzn. věkově standardizovaná hodnota přepočtená na světový standard.

Na obrázku 1 je graf znázorňující věkově standardizovanou míru incidence a mortality rakoviny slinivky břišní na 100 000 osob. Hodnoty jsou zobrazeny zvláště pro muže (*male*) a pro ženy (*female*). Je zde ilustrováno 20 zemí světa, kde je výskyt rakoviny pankreatu nejčastější, shora od nejvyšší incidence po nejnižší.

1.1.6 Myší pankreatický adenokarcinom nádorové linie Panc02

Při *in vivo* pokusech, kdy cílem pokusu je snaha o vyléčení novotvaru, je nejdříve potřeba vyvolat v testovaném organismu nádorový růst. To je možno učinit dvěma způsoby – buď vpravením vysoce kancerogenní látky do požadované tkáně organismu, nebo do organismu injikovat přímo požadovaný typ rakovinných buněk. Pokud jsou jakožto pokusné subjekty používány myši, je nutné, aby tato buněčná linie pocházela též z myši, a to stejného kmene.

Myších buněčných linií pro nádor slinivky není mnoho. Vpíchnutím 3-metyl-chlorantrénu do pankreatu myši C57BL/6 vznikla buněčná linie Panc02. Bohužel postrádá mutační změny, které se vyskytují v případě lidského adenokarcinomu, a tím je jeho klinický význam omezen. Má však široké využití při vyhodnocování různých strategických terapií (Torres a kol., 2013).

1.2 Imunitní systém a nádorová imunoterapie

1.2.1 Hlavní funkce imunitního systému

Imunitní systém se význačně podílí nejen na obraně proti infekci, ale také na udržení stálosti vnitřního prostředí. V jeho činnosti jsou důležité tři základní funkce: rozpoznání cizorodého od vlastního, reaktivita na cizorodé látky (imunologická odpověď) a jejich odstraňování a imunologická paměť (Hamplová a kol., 2015).

Rozpoznávání škodlivin zevního i vnitřního původu se projevuje jako obranyschopnost, což znamená, že imunitní systém rozpoznává vnější škodliviny a brání organismus proti patogenním mikroorganismům a jejich toxickým produktům. Dále se projevuje jako autotolerance, kdy imunitní systém rozpoznává vlastní tkáň organismu a udržuje toleranci vůči nim. Posledním

mechanismem je imunitní dohled – imunitní systém rozpoznává vnitřní škodliviny, tj. průběžně odstraňuje staré, poškozené a některé změněné (mutované) buňky (Hořejší a kol., 2017).

Imunitní mechanismy lze rozdělit do dvou základních kategorií: **vrozené** (neadaptivní) a **získané** (adaptivní, antigenně specifické). U obratlovců jsou oba tyto mechanismy nepostradatelné, životně důležité a vzájemně kooperují (Hořejší a kol., 2017).

1.2.2 Složky imunitního systému

Složkami imunitního systému jsou lymfatické orgány, cirkulující buňky neboli leukocyty a mediátory imunitního systému, cytokiny.

1.2.2.1 Leukocyty

Leukocyty tvoří podstatnou část imunitního systému. Z morfologického hlediska se dělí podle charakteru jejich cytoplazmy na granulocyty a agranulocyty.

Granulocyty mají v cytoplazmě barvitelná granula a segmentované jádro. Mají schopnost takzvané degranulace, což znamená, že se obsah granul uvolní mimo buňku. Tvoří první, rychlou obrannou linii organismu a najdeme zde neutrofilů, eozinofilů a bazofilů.

Mezi **agranulocyty** patří lymfocyty a monocyty. Mají na rozdíl od granulocytů cytoplazmu bez granul a velké, oválné, nečleněné jádro.

Podle funkce se leukocyty dělí na fagocytující buňky, cytotoxické buňky, buňky produkující protilátky a antigen prezentující buňky.

Fagocytující buňky jsou specializované k pohlcování částic. Do této skupiny patří neutrofilů, žírné buňky, dendritické buňky a makrofágy (a jejich prekurzory monocyty).

Cytotoxické buňky cíleně zabíjejí jiné buňky. Patří sem eozinofilů, cytotoxické T-lymfocyty a NK buňky (*natural killers*).

Buňky produkující protilátky jsou B-lymfocyty a tvoří základ humorální imunity.

Antigen prezentující buňky rozštěpí fagocytovanou částici na proteinové fragmenty a ty potom vystavují na svém povrchu. Do této skupiny náleží makrofágy, monocyty, dendritické buňky a B-lymfocyty.

1.2.2.2 Cytokiny

Cytokiny jsou základní regulátory imunitního systému, **tkáňové hormony** – proteiny sekretované leukocyty a jinými buňkami, které působí prostřednictvím **specifických receptorů** na různé buňky imunitního systému i mimo něj. Existují také **membránové formy** některých cytokinů, které jsou na rozdíl od sekretovaných forem zakotveny v cytoplazmatické membráně transmembránovými proteiny (Hořejší a kol., 2017).

Většina cytokinů je ve svých účincích **pleiotropní** (působí na několik druhů buněk), často působí **v kaskádě** (jeden cytokin indukuje tvorbu druhého) a celý cytokinový systém je do určité míry **redundantní** (jednotlivé cytokiny mohou být často nahrazeny jinými). Cytokiny působí **autokrinně** (cytokin působí na buňku, která jej produkuje), **parakrinně** (působí na buňky v těsné blízkosti) nebo **endokrinně** (po transportu krevním řečištěm působí na vzdálené tkáň). Pro některé účely je zřejmě nutné **koordinované působení** několika různých cytokinů – složité a dosud málo prozkoumané **synergistické** a **antagonistické interakce** v cytokinovém systému (Hořejší a kol., 2017).

V současné době byla určena primární struktura více než 120 různých cytokinů a je možné předpokládat, že tento počet není konečný. Tyto molekuly hrají v organismu nejrůznější další role, které nejsou omezeny jen na imunitní systém (Hořejší a kol., 2017).

Cytokiny se dělí do několika skupin, jejichž názvy odrážejí spíše historický vývoj tohoto oboru než strukturní a funkční vztahy: **interleukiny** (IL-1 až IL-38), **chemokiny** (MIP-1 α , MIP-1 β), **interferony** (IFN- α , IFN- β , IFN- γ), **transformující růstové faktory** (TGF- α , TGF- β), faktory stimulující kolonie (CSF), faktory nekrotizující nádory (TNF- α , TNF- β) a jiné růstové faktory (např. CSF, EPO aj.) (Hořejší a kol., 2017).

1.2.3 Vrozená imunita

Vrozená imunita je nespecifická. Patří sem přirozené obranné mechanismy, které jsou součástí normálních fyziologických funkcí. Nepředchází jí žádný kontakt s infekčním agens (Hamplová a kol., 2015). Je založena na molekulách a buňkách, které jsou v organismu připraveny předem a jsou obvykle účinné proti mnoha různým patogenům tím, že reagují na strukturní nebo funkční rysy, které jsou jim společné (Hořejší a kol., 2017).

Je tvořena řadou **fyzikálních bariér** (mechanické, chemické, mikrobiální). Je-li tato obrana prolomena, uplatňují se další složky vrozeného imunitního systému (Hamplová a kol., 2015). Těmi jsou **buněčné** vrozené systémy, které jsou reprezentovány především fagocytujícími buňkami (NK buňky) a **humorální** složky vrozené imunity, jež tvoří komplementový systém, interferony, lektiny a jiné sérové proteiny (Hořejší a kol., 2017).

1.2.4 Složky vrozené imunity a nádorová onemocnění

1.2.4.1 Rozpoznávací mechanismy buněk vrozené imunity

Při rozpoznávání mikrobiální infekce *pathogen-associated molecular patterns* (**PAMPs**) poskytují exogenní signály, které varují imunitní systém před přítomností patogenů, čímž aktivují imunitu. Nacházejí se na povrchu různých organismů, ale nikoli na nepoškozených buňkách organismu vlastních. Tyto struktury jsou evolučně velmi konzervované, sdílené různými mikroorganismy a jsou nezbytné pro jejich život (Akira a Hemmi, 2003; Janeway, Jr., 1989; Janeway, 1989).

Kromě toho jsou buňky přirozené imunity schopné rozeznávat i některé molekuly, které se uvolňují z poškozených buněk a tkání a které bývají souhrnně označovány jako *damage-associated molecular patterns* (**DAMPs**). Tyto endogenní molekuly tedy slouží jako signály nebezpečí, které varují vrozený imunitní systém před neplánovanou buněčnou smrtí, mikrobiální invazí a reakcí na stres (Bianchi, 2007; Rubartelli a Lotze, 2007; Matzinger, 1994).

Pro rozpoznání těchto charakteristických mikrobiálních nebo endogenních komponent využívá vrozený imunitní systém různé druhy receptorů označované jako *pattern recognition receptors* (**PRRs**), které mohou být exprimovány na buněčném povrchu, v intracelulárních prostorách nebo sekretovány do krevního řečiště a tkáňových tekutin. (Medzhitov a Janeway, Jr., 1997). Jejich hlavními funkcemi jsou opsonizace, aktivace komplementu a koagulačních kaskád, fagocytóza, aktivace prozánětlivých signalizačních cest a indukce apoptózy (Janeway, Jr. a Medzhitov, 2002; Janeway, Jr., 1989).

1.2.4.2 Toll-like receptory

Mimořádnou důležitost při rozpoznávání cizorodých struktur mají **receptory skupiny TLR** (*toll-like receptors*), které rozeznávají celou řadu molekul charakteristických pro různé patogeny. Byly prvními PRRs, které byly popsány, a jsou také nejlépe prostudované. Doposud bylo popsáno třináct TLRs u lidí a myši. Odlišují se od sebe v ligandové specificitě, expresními patterny a pravděpodobně v cílových genech, které mohou indukovat. TLR1 – TLR9 se nacházejí u lidí i myši, TLR10 je funkční u člověka, nikoli pak u myši a TLR11 – TLR13 u člověka exprimovány nejsou a u myši ano. (Kawai a Akira, 2011; Janeway, Jr. a Medzhitov, 2002).

1.2.4.2.1 TLR agonisté používaní naším týmem v nádorové imunoterapii a mechanismus jejich fungování

Naše terapie je založená na indukci prozánětlivých cytokinů pomocí TLR agonistů vedoucí k zánětlivé infiltraci nádoru. Naše terapeutická směs obsahuje tři TLR agonisty (R-848 + poly (I:C) + LTA) působící v synergii, což zlepšuje její účinek. Dalšími složkami terapeutika je manan-BAM, podporující fagocytózu nádorových buněk a protilátka anti-CD40, stimulující jak vrozenou, tak získanou imunitu.

LTA (*lipoteichoic acid*) je lipopolysacharid, tvoří hlavní stimulační složku grampozitivních bakterií a zprostředkovává buněčnou aktivaci TLR2. Váže se na membránový protein **CD14** a tím indukuje aktivaci transkripčního faktoru NF- κ B v hostitelských buňkách, jako jsou makrofágy, monocyty a granulocyty (Schwandner a kol., 1999).

Dále LTA podporuje expresi CD86 na dendritických buňkách (DCs), tvorbu IL-12, expresi CD40 na DCs a makrofázích a opsonizuje fragmenty nádorových buněk pro fagocytózu DCs (Michelsen a kol., 2001).

R-848 (*resiquimod*) aktivuje myši buňky prostřednictvím TLR7 (Hemmi a kol., 2002), zatímco v lidských buňkách R-848 také aktivuje pomocí TLR8 (Jurk a kol., 2002). R-848 zvyšuje uvolňování cytokinů typu Th1 (IL-2, IL-3), TNF- α (Jones, 2003), IFN- α , IFN- β , IL-12 a MIP-1 α (Larangé a kol., 2009).

TNF- α je tumor nekrotizující faktor (*tumour necrosis factor*). Působí cytotoxicky, regulačně a prozánětlivě. **IL-2** je růstovým faktorem hemopoetických buněk – T-lymfocytů, B-lymfocytů a NK-buněk. Dále se uplatňuje v buněčně zprostředkované imunitě. **IL-3** je růstový faktor, který stimuluje hemopoetické prekurzory. **IFN- α** má antivirový účinek, je důležitým regulátorem imunitního systému a růstu a diferenciaci buněk, a působí také jako tumor-supresorový protein (Gutterman, 1994). **IL-12** působí prozánětlivě a uplatňuje se v buněčně zprostředkované imunitě. Funkcí chemokinu **MIP-1 α** je chemotaxe a aktivace monocytů, granulocytů a T-lymfocytů.

Poly (I:C) (*polyinosinic-polycytidylic acid*) je velmi silný adjuvant. Je silným induktorem IFN- α , který je dominantním hnacím motorem dvou vrozených buněčných odpovědí: zrání dendritických buněk a aktivace NK buněk za vzniku IFN- γ (Longhi, 2009; Trumfheller, 2008). Maturované dendritické buňky prezentují antigeny naivním CD4⁺ a CD8⁺ T-lymfocytům. T buňky současně produkují cytokiny IFN- γ , TNF- α a IL-2 ve velkých množstvích a po delší dobu (Trumfheller, 2008). Dále poly (I:C) podporuje expresi CD40 a CD86 na dendritických buňkách CD40 na makrofázích a velmi efektivně indukuje expresi IFN- α a IFN- β (Longhi, 2009).

IFN- γ se uplatňuje v buněčně zprostředkované imunitě a má také regulační a antivirový účinek a také potlačuje proliferaci nádorových buněk (Gollob a kol., 2005) a zvyšuje jejich imunogenitu. Nádorové buňky jsou pak snáze rozpoznány a eliminovány (Svane a kol., 1997). Navíc v mikroprostředí, jež se tvoří v nádorech, potlačuje IFN- γ angiogenezi (Ribatti a kol., 2006). **TNF- α a IFN- γ** spolu synergicky indukují **IL-8** (Yasumoto, 1992), který též podporuje zánětlivou reakci a je hlavní chemotaktickou látkou pro neutrofile (Kunkel a kol., 1990).

R-848 a poly (I:C) spolu v silné synergii produkují IL-12. Tato produkce je zesílena další složkou naší terapeutické směsi, kterou je **anti-CD40** (Napolitani a kol., 2005).

1.2.4.3 MBL, MR, CR3

MBL (*mannan-binding lectin*) je lektin typu C s doménou podobnou kolagenu. Nejsilnější aviditu prokazuje pro opakující se strukturální patterny založené na manóze a typické pro mikrobiální povrchy. Tímto způsobem se MBL může vázat na širokou škálu bakterií a jiných mikroorganismů, neutralizovat je a / nebo je opsonizovat aktivací komplementu pomocí lektinové

dráhy aktivace komplementu (Klipatrick, 2002), nebo je opsonizován komplementovou jednotkou iC3b a následně dojde k fagocytóze (Jack a kol., 2001).

MR (*mannose receptor*) je PRR, který je schopen, stejně jako MBL, rozpoznávat manan, což může způsobit fagocytózu nádorových buněk.

CR3 (*complement receptor 3*) je membránový fagocytární PRR, který je exprimovaný makrofágy, neutrofily a NK buňkami. Zjednodušeně se jedná o heterodimer se dvěma podjednotkami – jedna váže iC3b a druhá rozpoznává β -glukany přičemž vazba β -glukanu na CR3 vede k fagocytóze cílové buňky opsonizované iC3b (Ross a Větvička, 1993; Větvička a kol., 1996).

1.2.4.3.1 Manan-BAM používaný naším týmem v nádorové imunoterapii a mechanismus jeho fungování

Manan je polysacharid, složený hlavně z manózy. Existuje více druhů. Tyto PAMPs se vyskytují v rostlinách a houbách.

Manan spojujeme kovalentně s molekulovou BAM (*biocompatible anchor for cell membranes*) za vzniku **manan-BAM**. BAM je molekula vyvinutá Kato a jeho týmem. Sestává z hydrofobní řetězce kyseliny olejové na jednom konci a hydrofilním polyethylenglykolem (PEG) s navázanou reaktivní skupinou na druhém. Alifatický řetězec kyseliny olejové slouží jako kotva, která prostupuje buněčnou membránou, aniž by ji porušila. Na reaktivní skupinu pak lze navázat další látky, v našem případě manan (Kato a kol., 2004).

Manan-BAM působí tak, že se ukotví do membrány nádorových buněk, je rozpoznán MBL čímž dojde k aktivaci komplementu lektinovou cestou. Následkem toho dojde k opsonizaci těchto buněk molekulami iC3b, jež jsou rozpoznány receptory CR3 na povrchu buněk vrozené imunity (viz výše). Ty následně nádorové buňky napadnou a odstraní (Janotová a kol., 2014; Waldmannová a kol., 2016).

1.2.4.4 Buněčná vrozená imunita a nádorová onemocnění

Jako obrana proti nádorovému bujení slouží v rámci vrozeného imunitního systému zejména NK buňky. V rámci naší terapie se však zapojují i další imunocyty. Pro svoji schopnost fagocytózy jsou to neutrofilů a makrofágů a díky svým prozánětlivým účinkům i dendritické buňky.

Neutrofilů se vyskytují v krvi i přímo ve tkáních. Podílí se na opsonizaci a fagocytóze antigenů. Infiltrují postižené místo v akutní fázi zánětu (Selders a kol., 2017). Ačkoli se podílejí převážně na likvidaci bakteriálních infekcí, jsou aktivované i v případě některých rakovin (Ocana a kol., 2017; Treffers a kol., 2016). Pomocí exkrece některých cytokinů mobilizují další složky imunitního systému.

TANs (*tumour associated neutrophils*) jsou neutrofilů nacházející se v nádorech. Jsou dvojího typu, označované jako fenotypy N1 a N2. N1 neutrofilů jsou protinádorové a prozánětlivé, zatímco fenotyp N2 má pronádorové a protizánětlivé účinky. Typy cytokinů, které jsou exprimované v nádoru, rozhodují o tom, který z fenotypů zde bude převládat. (Fridlender a kol., 2009; Fridlender a Albelda, 2012). N1 neutrofilů nádorové buňky atakují přímo nebo se na jejich eliminaci podílejí nepřímo – stimulací dendritických buněk (van Gisbergen a kol., 2005) nebo CD8+ paměťových buněk, zatímco N2 neutrofilů jejich aktivitu zřejmě inhibují (Fridlender a kol., 2009).

Makrofágů hrají významnou roli při regulaci patogeneze nádorů (Jaiswal a kol., 2010). Jejich funkcemi jsou fagocytóza, prezentace antigenu a produkce cytokinů, které působí v homeostatickém odklizení buněk, obraně proti patogenům a při zánětlivých reakcích.

Bylo zjištěno, že růst nádorů může být podpořen takzvanými **TAMs** (*tumor associated macrophages*) (Mantovani a kol., 1992). Ty dělíme do dvou odlišných subpopulací makrofágů, které podporují buď pro- nebo anti-tumorogenní prostředí v závislosti na jejich schopnosti prezentovat antigeny, produkovat zánětlivé cytokiny, stimulovat angiogenezi a umožňovat cytotoxickou aktivitu (Allavena a kol., 2008).

Makrofágová fagocytóza je rozhodující při programovaném odstraňování poškozených a cizích buněk. Zda je buňka pohlcena či nikoli, závisí na relativní expresi pro- a anti-fagocytárních signálů na jejím povrchu – exprese pro-fagocytárních a ztráta anti-fagocytárních signálů vede

k jejímu pohlcení. Jak některé studie prokázaly, nádory se brání proti fagocytóze makrofágy prostřednictvím exprese anti-fagocytárních signálů, mezi něž patří například CD200, CD47 (Chao a kol., 2011) a CD31 (Grimsley a Ravichandran, 2003).

NK buňky (*natural killer*) jsou schopné rozpoznat a odstranit nádorové buňky či buňky napadené virem. Nesou na povrchu dva typy receptorů. Prvními jsou lektinové receptory, které aktivují cytotoxicitu. Druhý typ receptorů rozpoznává MHC I a cytotoxicitu blokuje. Když se NK buňka setká s buňkou, která má na svém povrchu abnormálně málo MHC I (molekuly prezentující antigeny), je tato buňka napadena. Takové buňky jsou buď nádorové nebo napadené virem.

Jak bylo řečeno výše, NK buňky produkují IFN γ . Také hrají roli při aktivování makrofágů a T-lymfocytů v nádoru (Kowanko a Ferrante, 1987; Vivier a kol., 2008).

Dendritické buňky jsou buňky vrozené imunity s největší schopností iniciovat zánětlivou reakci. Jsou nejefektivnější buněčnou populací schopnou prezentovat antigeny T-lymfocytům a stimulovat aktivaci a klonální expanzi i naivních T-lymfocytů.

1.2.4.4.1 Anti-CD40 protilátka používaná naším týmem v nádorové imunoterapii a mechanismus jejího fungování

Dendritické buňky (a jiné antigen prezentující buňky) exprimují molekulu **CD40**, která má regulační funkci. Váže se na ligand CD154 na povrchu T_H lymfocytů a tím indukuje maturaci dendritických buněk a také stimuluje jejich aktivitu. CD40 je i povrchový receptor B-lymfocytů (Bajor a kol., 2015; Defance a kol., 1992).

Anti-CD40 protilátka funguje jako agonista CD40 receptoru a zároveň stimuluje dendritické buňky. Podporuje nejen aktivaci složek získané imunity, ale i následnou reakci. (Bajor a kol., 2015). Dále podporuje působení vrozené imunity.

R-848 a poly (I:C) oba stimulací tvorby IFN- α a IFN- β podporují **anti-CD40** k tomu, aby při zkřížené prezentaci antigenů naivním CD8⁺ lymfocytům vznikaly nejen CTL, ale i značné množství **CD8⁺ paměťových buněk** (Ahonen a kol., 2004).

Anti-CD40 protilátka byla do naší vakcíny přidána, protože výsledky terapie, která byla použita nejprve na melanomu, nebyly tak významné při aplikaci na pankreatický adenokarcinom (Caisová a kol., 2018).

1.2.4.5 Humorální vrozená imunita a nádorová onemocnění

Komplement tvoří asi třicet sérových a membránových proteinů, které kooperují mezi sebou a s dalšími imunitními mechanismy. Složky komplementu se kaskádovitě aktivují a tím spouštějí imunitní reakci. Ústřední složkou je **C3** (fragment C3b se kovalentně váže na mikrobiální povrch). Meziprodukty této kaskádovité reakce mají výrazné biologické funkce, jako jsou opsonizace a chemotaxe. Terminálním produktem kaskády je komplex proteinů nazývaný **MAC** (*membrane attack complex*). Ten perforuje cytoplasmatické membrány některých buněk a působí jejich lýzu, zabíjí je. Hlavními funkcemi komplementu jsou **opsonizace**, chemotaxe, **prozánětlivé funkce** a **osmotická lýza**. Rozeznáváme tři způsoby aktivace komplementu: alternativní cesta, lektinová cesta, klasická cesta. Lektinová cesta je variantou klasické. Jak již bylo zmíněno, pomocí kotveného manan-BAM aktivujeme komplement lektinovou cestou a využíváme iC3b opsonizace nádorových buněk pro jejich napadení buňkami vrozené imunity, zejména pak fagocyty.

1.2.5 Získaná imunita

Při selhání vrozeného imunitního systému přistupuje k zastavení infekce další stupeň obrany napadeného hostitele, kterým je získaná imunita (Hamplová a kol., 2015). Je evolučně mladší než vrozená imunita, je adaptivní a antigenně specifická. Mechanismy získané imunity reagují na každou cizorodou strukturu prostřednictvím vysoce specifických molekul (protilátky, antigenně specifické receptory T-lymfocytů). Patří mezi ně mechanismy **humorální** (založené na **protilátkách**) a **buněčně zprostředkované** (založené hlavně na **T-lymfocytech**). Pro tyto mechanismy je charakteristické, že se spouštějí až po setkání s daným antigenem a pro jejich iniciaci je nezbytná aktivita složek vrozené imunitní odpovědi. K úplnému rozvoji adaptivní imunitní reakce je zapotřebí několika dní až týdnů. Typickým rysem těchto reakcí je **imunologická paměť** (Hořejší a kol., 2017).

1.2.6 Složky získané imunity a nádorová onemocnění

T-lymfocyty jsou nezbytné pro antigenně specifické buněčně zprostředkované i protilátkové imunitní reakce. Rozpoznávají antigen v komplexu a antigeny MHC (*major*

histocompatibility complex). Rozpoznání pak vede k jejich proliferaci a diferenciaci na **paměťové** a **efektorové** T buňky.

Rozlišujeme dvě základní subpopulace T-lymfocytů – cytotoxické (T_{Cyt}) CD8+ a pomocné (Th) CD4+.

CD8+ dokáží buňku přimět k apoptóze, popřípadě ji přímo zničit za pomoci cytotoxických mechanismů. Rozpoznávají antigen v kontextu s MHC molekulami. Pod vlivem lymfokínů produkovaných T_H buňkami diferencují na cytotoxické T-lymfocyty (CTL). CTL kontrolují stav buněk v organismu. Odstraňují vlastní pozměněné buňky – infikované virem nebo nádorové, a transplantované buňky.

CD4+ produkují velkou škálu cytokinů. Podle toho, které cytokiny vytvářejí, je rozlišujeme na Th1, jejichž funkcí je podpora cytotoxicity, makrofágů a CTL, a Th2: podporují B-lymfocyty a tvorbu protilátek. Dalšími subpopulacemi jsou Th9, Th17 a Th22.

B-lymfocyty nesou protilátkovou molekulu jako receptor, jenž rozeznává samotný antigen. Po navázání na antigen B buňky proliferují. Vzniklé dceřiné buňky se diferencují na **paměťové** a **plazmatické buňky**, které produkují protilátky a už nemají imunoglobulinové receptory.

Hlavní histokompatibilní komplex **MHC** je soubor molekul buněčné membrány zodpovědných za rozpoznávání imunitním systémem. Rozeznáváme MHC molekuly I třídy, který se vyskytuje na všech buňkách, a MHC molekuly II třídy, nacházející se pouze na antigen prezentujících buňkách.

1.2.7 Schopnost úniku pankreatického adenokarcinomu imunitnímu systému

Nádory se brání ataku fagocytujícími buňkami mimo jiné molekulami CD31, CD47, CD200, které exprimují na svém povrchu (Elward a Gasque, 2003). Také karcinom slinivky vykazuje zvýšenou hladinu především imunoglobulinu CD47 (Cioffi a kol., 2015). Aby se ubránily před napadením T-lymfocyty, exprimují na svém povrchu abnormálně málo MHC I. V běžném případě by tento krok vedl k jejich rozpoznání NK buňkami. Proti nim si však nádorové buňky vyvinuly odolnost pomocí exprese pozměněných MHC Ib, čímž se pro NK buňky prezentují jako zdravé.

Pankreatický duktální adenokarcinom je též silně podporován tumor-asociovanými makrofágy (TAMs), jež se zdají být protumorogenní a jejich přítomnost je spojována se špatnou klinickou prognózou (Cioffi a kol., 2015).

Nižší účinnost naší experimentální imunoterapie pankreatického adenokarcinomu může být částečně vysvětlena nízkou infiltrací efektorovými T buňkami a současnou masivní infiltrací imunosupresivními leukocyty. Hustá desmoplastická stroma podporuje angiogenezi, nicméně však zabraňuje vstupu buněk imunitního systému. Stroma není jen pasivní bariérou pro imunitní systém; interaguje také s nádorovými buňkami stimulujícími jejich progresi a invazivitu. (Kunk a kol., 2016).

1.3 CD47 a jeho role při úniku rakovinných buněk vrozenému imunitnímu systému

CD47 je molekula buněčného povrchu, patřící mezi imunoglobuliny a takzvané SAMP (*self-associated molecular pattern*) (Elward a Gasque, 2003), která váže několik proteinů, včetně integrinů (Brown a Frazier, 2001), a podílí se na různých fyziologických procesech, včetně buněčné migrace (Liu a kol., 2001; Jaiswal a kol., 2009; Lindberg a kol., 1996), a aktivace T buněk a dendritických buněk (Sarfati a kol., 2008). Navíc CD47 funguje jako inhibitor fagocytózy přes ligand SIRP α (*signal-regulatory protein alpha*) exprimovaný na fagocytech, což vede k aktivaci tyrosinfosfatázy a inhibici hromadění myozinu na fagocytárních synapsích (Tsai a Discher, 2008). Tímto způsobem slouží CD47 jako „*don't eat me* signál“, jelikož ztráta CD47 vede k homeostatické fagocytóze starých nebo poškozených buněk (Blazar a kol., 2001; Gardai a kol., 2005). CD47 je běžně exprimován na většině normálních tkání (Reinhold a kol., 1995), což naznačuje, že hraje zásadní roli v regulaci fagocytózy.

Poprvé byl CD47 identifikován jako nádorový antigen na lidském karcinomu vaječníků v 80. letech 20. století (Poels a kol., 1986). Od té doby bylo zjištěno, že CD47 je exprimován na mnoha typech lidských nádorů, včetně akutní i chronické myeloidní leukémie (Jaiswal a kol., 2009; Majeti a kol., 2009), mnohočetného myelomu (Rendtlew Danielsen a kol., 2007), rakoviny močového měchýře (Chan a kol., 2009), ale také rakoviny pankreatu (Cioffi a kol., 2015) a mnoha dalších. Tyto dříve jmenované studie a mnoho dalších prokazují, že zatímco CD47 se v normálních buňkách vyskytuje v nízké hladině, nádorové buňky oproti nim vykazují zvýšenou hladinu této

molekuly. Můžeme se tedy domnívat, že nadměrná exprese CD47 umožňuje tumorům s touto schopností uniknout vrozenému imunitnímu systému díky zastavení fagocytózy. Tento proces nastává vazbou CD47 na nádorových buňkách na SIRP α na fagocytech, čímž je podpořena inhibice fagocytózy a přežití nádoru.

1.3.1 Anti-CD47 protilátka

Zvýšená exprese CD47 na mnoha různých typech nádorů a jeho vlastnosti jakožto „*don't eat me*“ signálu nás vedou k závěru, že by tento jev, potažmo jeho potlačení, mohl být využit v nádorové imunoterapii.

Již byla vyvinuta snaha inhibovat dráhu CD47-SIRP α , zejména pomocí monoklonálních protilátek, které blokují CD47. Monoklonální protilátky jsou produktem jednoho klonu plazmatických buněk, mají unikátní specifitu a jsou jednoho izotypu.

Anti-CD47 protilátky již prokázaly preklinickou aktivitu proti mnoha různým typům lidské rakoviny (viz výše), a to jak *in vitro*, tak i *in vivo* pomocí xenotransplantace na myších.

1.3.2 Možný dopad přidání anti-CD47 protilátky ke stávající vakcíně

Jak už bylo zmíněno výše pankreatický duktální adenokarcinom vykazuje zvýšenou hladinu imunoglobulinu CD47. Blokace této „*don't eat me*“ molekuly by mohla mít pro naši terapii zásadní význam. Jelikož je naším cílem vyvolání zánětu a fagocytování nádorových buněk buňkami vrozené imunity, mohlo by odstranění molekuly, jež fagocytózu inhibuje, silně podpořit účinek ostatních složek naší vakcíny. Zvýšení ataku fagocytujících buněk by mohlo vést k účinnější redukci nádorové hmoty. Tuto teorii podporuje i výzkum z roku 2015, kdy byla též na myším modelu zkoumána inhibice CD47 na rakovině pankreatu a kdy pomocí anti-CD47 dosáhli výrazné redukce nádorové hmoty (Cioffi a kol., 2015). Touto cestou bychom pak mohli léčit i hodně narostlé nádory.

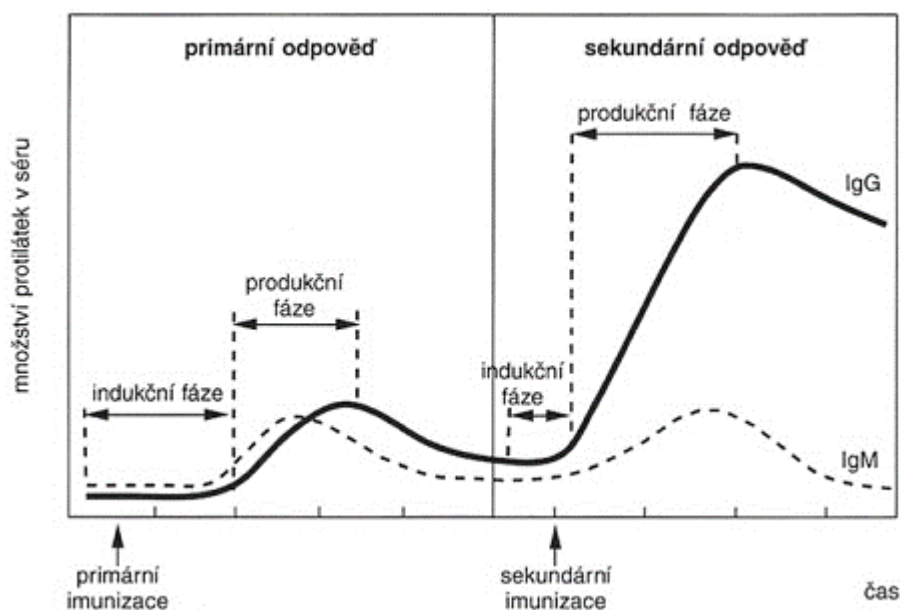
Naše terapie však zároveň cílí i na složky získané imunity a vyvolání vakcinačního účinku. K tomu, aby měla získaná imunita čas se zapojit a aby byl vyvolán dostatečný vakcinační účinek, je potřeba, aby nádor nebyl zredukován příliš rychle a aby se nevstřebal dříve než po třech

vakcinačních pulzech. Potom jsou myši odolné dokonce i vůči retransplantacím (Caisová a kol., 2018).

1.4 Vakcinace

Aktivní imunizace neboli vakcinace je postup, kterým je zajišťována ochrana osob proti infekčnímu onemocnění podáním vhodně připraveného antigenu. Faktory, které ovlivňují úspěšnost imunitní odpovědi jsou především charakter antigenu, dávka antigenu, přídatné složky očkovací látky (zejména adjuvancia), použité očkovací schéma, způsob aplikace, stav a věk imunizovaného jedince (Jílková, 2012).

Ve většině případů je cílem a smyslem vakcinace vytvoření ochranných hladin neutralizačních protilátek a dlouhotrvající imunologické paměti, která je schopná odpovědět velmi rychle a robustně při dalším setkání s infekčním agens a spustit takzvanou sekundární odpověď (Obr. 2). K té dochází v případě podání dodatečné dávky vakcíny (**přeočkování**), které se provádí u většiny vakcín **při poklesu specifických protilátek pod ochrannou hladinu**. Stejný mechanismus probíhá i v případě setkání s přirozeným infekčním agens. Taková odpověď je zajištěna kooperací všech složek imunitního systému, zejména ale získanou imunitou (Jílková, 2012).



Obr. 2: Primární a sekundární odpověď na podání antigenu (převzato z Ferenčík a kol., 2004).

Po antigenním podnětu dochází k aktivaci a diferenciaci imunokompetentních buněk a výsledkem je klonální expanze specifických T a B-lymfocytů. **K rozvoji specifické imunitní reakce je třeba několika dnů, eventuálně 2–3 týdnů.** Celý průběh lze charakterizovat jako následně i současně probíhající děje nejprve nespecifických imunitních dějů (chemotaxe, fagocytóza, prezentace antigenu), které jsou zakončeny vysoce specifickou odpovědí složek imunitního systému – tvorba specifických protilátek, vytvoření buněčné paměti. Dlouhodobá imunita je zajištěna vytvořením antigen specifické imunitní efektorové odpovědi – tvorbou specifických protilátek a T-lymfocytů a vytvořením imunitních paměťových buněk. Tím je zajištěna dostatečně efektivní a rychle reaktivovatelná imunitní odpověď v případě sekundárního setkání s antigenem (Castellino a kol, 2009; Jílková, 2012).

1.4.1 Terapeutická nádorová vakcinace

Preventivní očkování proti infekčním chorobám je považováno za jedno z nejúspěšnějších zdravotních opatření všech dob. Terapeutické očkování proti onemocněním, jako jsou přetrvávající infekce a rakovina, se ukázalo být mnohem náročnější, protože zásah vakcíny musí bojovat proti imunitnímu systému, který byl indukován tolerančními nebo polarizačními mechanismy. Ty nutí imunitní systém, aby nemoc tolerovala. Lepší výsledky lze s největší pravděpodobností získat lepším výběrem antigenů, zlepšením složení vakcíny a vhodnými léčebnými postupy. Ty mohou zmírnit imunopresivní mechanismy v mikroprostředí rakoviny a zvýšit výkon vakcíny vhodnou stimulací nebo modulací imunitního systému (Melief a kol., 2017).

Terapeutické vakcíny proti rakovině musí dosáhnout dostatečné koncentrace antigenu v DC a aktivace DC, což dále řídí odpovědi CD4 + a CD8 + T buněk. CD4 + T buňky jsou potřebné pro optimální a trvalé odpovědi efektorových CD8 + T buněk (Bennet a kol., 1998; Ridge a kol., 1998; Schoenberger a kol, 2003), stejně jako indukce a udržování CD8 + paměti (Janssen a kol., 2005). Kromě toho, že CD4 + podporují CD8 + T buňky, mají i vlastní efektorovou funkci (Quezada a kol., 2010).

Protinádorové vakcíny musí využívat účinný způsob podání. Upřednostňované způsoby podávání těchto vakcín musí vést k účinnému pohlcení antigenu DC a k jeho prezentaci. Toho lze nejlépe dosáhnout intratumorálním podáváním nebo podání do lymfatických uzlin bohatých na DC (Silva a kol., 2013; Melief a kol., 2017).

Vzhledem k mnoha aktivitám potlačujícím T buňky v mikroprostředí nádoru nelze očekávat, že protinádorové vakcíny vykáží samy o sobě optimální účinnost, ale je třeba je používat v kombinačních léčbách, které jsou navrženy tak, aby inaktivovaly nejdůležitější imunosupresivní mechanismy prostředí. Terapeutické vakcíny nabízejí možnost vysoce specifických protinádorových terapií, které jsou poměrně nenákladné a neinvazivní (Melief a kol., 2017).

Pro naši terapii využíváme vakcinační schéma, kdy je myš léčena ve čtyřech pulzech, třemi injekcemi v každém pulzu. Vakcína je aplikována tři dny po sobě v jednom pulzu, následuje pět dní pauza: 0, 1, 2; 8, 9, 10; 16, 17, 18 a 24, 25, 26. Toto aplikační schéma je výsledkem řady experimentů a hledání neoptimálnějšího uspořádání (J. Ženka, ústní sdělení). Bylo by praktické, kdybychom mohli počet aplikací zredukovat na pouze dvě za pulz. Léčba by pak byla méně nákladná a určitě i pro pacienta méně bolestivá a stresující.

2 Cíle práce

Cílem této práce je vylepšení již existující léčebné metody, kterou vyvinul tým Dr. Jana Ženky, tak, aby byla co neúčinnější. Konkrétními cíli je zjistit:

- jak si vakcína poradí i s velkými nádory pankreatického adenokarcinomu,
- jaký vliv na růst nádoru má přidání anti-CD47 protilátky ke stávající vakcíně,
- jaký dopad na léčbu má změna ve stávajícím vakcinačním schématu (redukce počtu aplikací).

3 Materiály

3.1 Laboratorní myši

Pro *in vivo* pokusy byly použity samice inbredního kmene myši C57BL/6 (*wilde-type*), které byly dovezeny od dodavatele Charles River Laboratories. Na začátku pokusu byly myši staré osm týdnů a vážily mezi 18 a 20 gramy. Chovány byly ve sterilním prostředí IVC (*individually ventilated cages*) boxů s podestýlkou z dřevěné neprášivé drtě a ubrouskem pro stavbu hnízda, při fotoperiodě 12/12 hodin, za stálé teploty (22 °C) a vlhkosti vzduchu (65 %), krmení a voda byly podávány *ad libitum*. K tomuto účelu byly využity prostory zvěřince Katedry medicínské biologie.

3.2 Nádorová buněčná linie

Pro vyvolání nádorového růstu v myších byly při pokusu použity nádorové buňky myšího pankreatického adenokarcinomu Panc02 (dar profesora Partecke, University of Greifswald) kultivované v D-MEM mediu s 10% FCS obsahujícím penicilin (100 j/ml), streptomycin (100 µg/ml), amfotericin B (0,25 µg/ml), L-glutamin (2,2 mM) a merkaptoethanol (50 µM), v atmosféře nasycené vodními parami a obsahujícími 5% CO².

3.3 Chemikálie

- **Anti-CD40 protilátka** (clone FGK 4.5/FGK45; BioXCell)
- **Anti-CD47 protilátka** (clone MIAP301; BioXCell)
- **BAM₄₀₀₀** (*biocompatible anchor for cell membranes*; Mw 4000; NOF Europe)
- **DMSO** (*dimethyl-sulfoxid*; Sigma-Aldrich)
- **EDTA** (*kyselina ethylendiamintetraoctová*; Sigma-Aldrich)
- **HBSS** (*Hanks balanced salt solution*; VWR)
- **LTA** (*lipoteichoic acid, Bacillus subtilis*; Sigma-Aldrich)
- **Manan** (Sigma-Aldrich)

- **PBS** (*phosphate-buffered saline*; VWR)
- **Poly (I:C)** (*polyinosinic-polycytidylic acid, sodium salt*; Sigma-Aldrich)
- **R-848** (*resiquimod*; Tocris Bioscience)
- **TRIS** (*TRIS-hydroxymethylaminometan*)
- **Trypanová modř** (0,5% vodný roztok; Sigma-Aldrich)
- **Trypsin** (Sigma-Aldrich)

4 Metody

4.1 Příprava buněk Panc02

Buňky se nechaly narůst, tak aby vytvořily jednovrstvou kulturu. Poté bylo odstraněno médium a buňky byly třikrát promyty PBS. Následně byla provedena trypsinizace – k buňkám byla přidána trypsinizační směs (0,02% EDTA v HBSS, 0,25% trypsin) a byly dány na pět minut do termostatu při 37 °C. Proces byl ukončen přidáním 50 ml média a buněčná suspenze byla převedena do centrifugačních zkumavek. Následně byly buňky centrifugovány (10 min, 160 g, 4 °C). Po rozsuspendování peletu v médiu byly buňky spočítány v Bürkerově komůrce s přidavkem trypanové modři (pro rozlišení živých a mrtvých buněk) a jejich množství bylo upraveno na požadovanou koncentraci.

4.2 Příprava myši a transplantace buněk Panc02

Myši byly oholeny v pravé dolní části zad, kam bylo následně každé myši podkožně injikováno 400 000 nádorových buněk buněčné linie Panc02 ve 100 µl média bez séra. Po 16 dnech byly myši, u kterých došlo k přijetí nádorových buněk, randomizovány do skupin po šesti.

4.3 Příprava chemikálií

Manan-BAM:

Nejprve byla provedena redukční aminace mananu. Roztok mananu byl redukován kyanoborohydridem sodným v octanu amonném při pH 7,5 a při teplotě 50 °C po dobu pěti dnů. Takto vzniklý roztok byl přes noc dialyzován proti PBS při 4 °C s použitím dialyzační membrány MWCO 3500 (Serva, Heidelberg).

Hodnota pH roztoku mananu-NH₂ musela být udržována v rozmezí mezi 7,2 a 8,5. Byl připraven roztok BAM₄₀₀₀ v DMSO (7,3 mM) a byl přidán k roztoku mananu-NH₂ v ekvimolárním poměru. Tato směs byla při pokojové teplotě ponechána reakčnímu procesu po dobu dvou hodin,

než byla zastaven přidáním TRIS/HCl (pH 8,0). Následně byl roztok opět dialyzován (stejný postup jako předtím). Jako výsledný roztok vznikl 0,2 mM manan-BAM v PBS, který byl uchováván zamražen při teplotě -20 °C do doby použití.

Všechny použité roztoky byly sterilizovány filtrací (průměr pórů 0,22 μm).

Příprava imunoterapeutik:

1) Základní terapeutická směs R-848 + poly (I:C) + LTA + manan-BAM:

Byl vytvořen roztok 0,5 mg R-848 (nejprve vytvořen pomocí ekvivalentu HCl hydrochlorid) + 0,5 mg poly (I:C) + 0,5 mg LTA v 0,2 mM manan-BAM v PBS. Následovala sterilizace filtrací (0,22 μm), vytvoření alikvotů a zamrazení.

2) Použití protilátek:

Protilátky anti-CD40 a anti-CD47 byly přidávány k výše uvedené terapeutické směsi (případně PBS v případě kontrol) tak, aby výsledná koncentrace činila 0,4 mg protilátky / ml.

4.4 Schéma experimentů

4.4.1 Pokus č. 1 – Léčba pankreatického adenokarcinomu za pomoci anti-CD47 protilátky

16 dnů po transplantaci nádorových buněk Panc02 byla provedena randomizace myší s nádory do čtyř skupin po šesti (den 0) Myši byly umístěny každá do vlastního IVC boxu. Skupiny byly označeny **A**, **B**, **C** a kontrolní skupina **K**.

Nultý den byl zároveň i dnem, kdy byla zahájena terapie myší. Všechny skupiny byly léčeny ve čtyřech pulzech, třemi injekcemi v každém pulzu. Vakcína byla injikována tři dny po sobě v jednom pulzu, následovala pět dní pauza: 0, 1, 2; 8, 9, 10; 16, 17, 18 a 24, 25, 26. Terapeutické látky byly podávány intratumorálně (vždy 50 μl/myš). Kompletní přehled terapie je zanesený do tabulky (Tab. I).

Tab. I: Přehled terapie, pokus č. 1.

Skupina	Terapie	Počet myší	Dny
A	R-848 + poly (I:C) + LTA + manan-BAM + anti-CD40 + anti-CD47	6	0, 1, 2; 8, 9, 10; 16, 17, 18; 24, 25, 26
B	anti-CD40 a anti-CD47	6	0, 1, 2; 8, 9, 10; 16, 17, 18; 24, 25, 26
C	R-848 + poly (I:C) + LTA + manan-BAM + anti-CD40	6	0, 1, 2; 8, 9, 10; 16, 17, 18; 24, 25, 26
K	PBS	6	0, 1, 2; 8, 9, 10; 16, 17, 18; 24, 25, 26

4.4.2 Pokus č. 2 – Léčba pankreatického adenokarcinomu podle dvou různých vakcinačních schémat

Stejně jako u pokusu číslo jedna byly provedena randomizace myší s nádory 16 dnů po transplantaci nádorových buněk a tento den byl označen jako den 0. Myši byly rozděleny do tří skupin po šesti a umístěny každá do vlastního IVC boxu. Skupiny byly označeny **A**, **B** a kontrolní skupina **K**.

Jako u předešlého pokusu znamenal nultý den zároveň i zahájení terapie, přičemž látky byly podávány intratumorálně (vždy 50 μ l/myš). Skupiny **A** a **K** byly léčeny ve čtyřech pulzech, třemi injekcemi v každém pulzu. Vakcína byla injikována tři dny po sobě v jednom pulzu, následovala pět dní pauza: 0, 1, 2; 8, 9, 10; 16, 17, 18 a 24, 25, 26. Skupina **C** byla léčena též ve čtyřech pulzech,

avšak pouze dvěma injekcemi. Ty byly podány vždy dva dny po sobě a následovala šestidenní pauza: 0, 1; 8, 9; 16, 17 a 24, 25. V tabulce (Tab. II) je zaznamenaný kompletní přehled terapie.

Tab. II: Přehled terapie, pokus číslo 2.

Skupina	Terapie	Počet myši	Dny
A	R-848 + poly (I:C) + LTA + manan-BAM + anti-CD40	6	0, 1, 2; 8, 9, 10; 16, 17, 18; 24, 25, 26
B	R-848 + poly (I:C) + LTA + manan-BAM + anti-CD40	6	0, 1; 8, 9; 16, 17; 24, 25
K	PBS	6	0, 1, 2; 8, 9, 10; 16, 17, 18; 24, 25, 26

4.5 Měření velikosti nádorů

Od nultého dne byly ob den měřeny velikosti nádorů. K tomuto účelu byl využíván kaliper. Z naměřených hodnot byl vypočten objem nádoru dle vzorce $V = \frac{\pi}{6} \cdot A \cdot B^2$, přičemž hodnota A představovala průmět nádoru v nejdelší části a hodnota B výšku nádoru v nejvyšší části. Z výsledných objemů pro jednotlivé myši byl pak vypočten průměrný objem nádorů pro celou skupinu.

4.6 Výpočet redukce nádorového růstu

Z naměřených hodnot byla vypočtena průměrná redukce nádorového růstu. K tomu posloužil tento vzorec:

$$x = \frac{\bar{V}_{kontrola} - \bar{V}_{léčené} \cdot 100}{\bar{V}_{kontrola}}$$

$\bar{V}_{kontrola}$ značí průměrný objem nádoru kontrolní skupiny a $\bar{V}_{léčené}$ znamená průměrný objem nádoru léčené skupiny. Výsledná hodnota byla vyjádřena v procentech.

4.7 Výpočet plochy pod křivkou

AUC (*area under the curve*) neboli plochu pod křivkou lze spočítat jako součet lichoběžníků. Pro výpočet byl použit následující vzorec:

$$x = \frac{V_{den_n} + V_{den_{n+2}}}{2} \cdot (den_{n+2} - den_n)$$

Tento vzorec lze dále matematickými úpravami zjednodušit:

$$x = V_{den_n} + V_{den_{n+2}}$$

Pro výsledné hodnoty byl vytvořen vlastní graf.

4.8 Statistické vyhodnocení

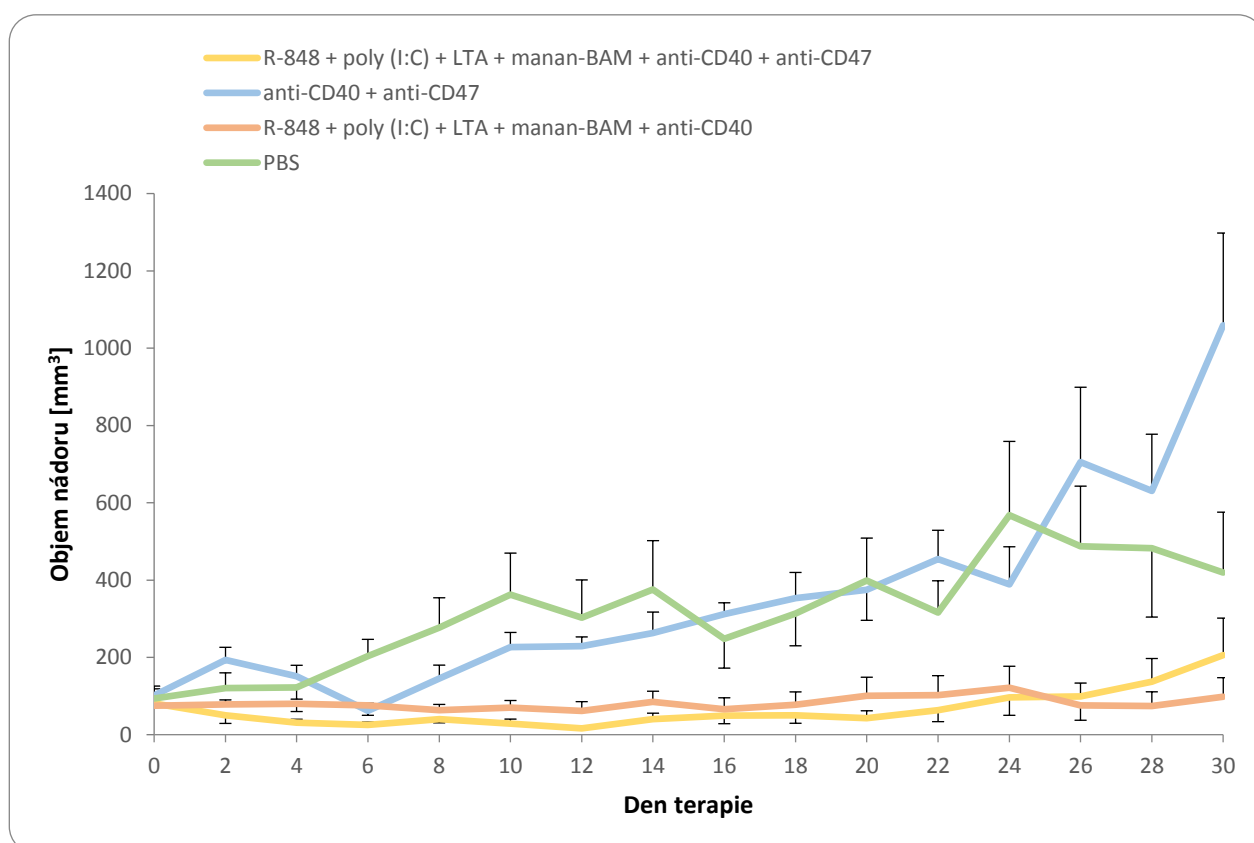
K vytvoření grafů a ke statistickému vyhodnocení hodnot naměřených v průběhu pokusu byly použity programy Excel 2016 a Statistica 13.2, StatSoft, Inc. Použitými testy v programu Statistica byly jednocestná ANOVA, doplněná o Tukeyho *post-hoc* test, a Kaplan-Mayerův test.

5 Výsledky

5.1 Pokus č. 1

Cílem tohoto pokus bylo zjistit vliv intratumorální aplikace stávající vakcíny s přidáním anti-CD47 protilátky na velikost pankreatického adenokarcinomu a dobu přežití.

Na obrázku (Obr. 3) je znázorněn vliv terapeutika na objem nádoru ode dne 0 po den 30. Z grafu je patrné, že terapeutikum s přidanou anti-CD47 protilátkou mělo zpočátku výrazně dobrý vliv na redukci nádorové hmoty, avšak 20. den začaly nádory opět pomalu růst, až nakonec 26. svojí velikostí překonaly velikost nádorů léčených terapeutikem bez přidání anti-CD47 protilátky.



Obr. 3: Vliv terapeutika na velikost nádoru.

Skupina A – R-848 + poly (I:C) + LTA + manan-BAM + anti-CD40 + anti-CD47, **skupina B** – anti-CD40 + anti-CD47, **skupina C** – R-848 + poly (I:C) + LTA + manan-BAM + anti-CD40, **skupina K** – PBS.

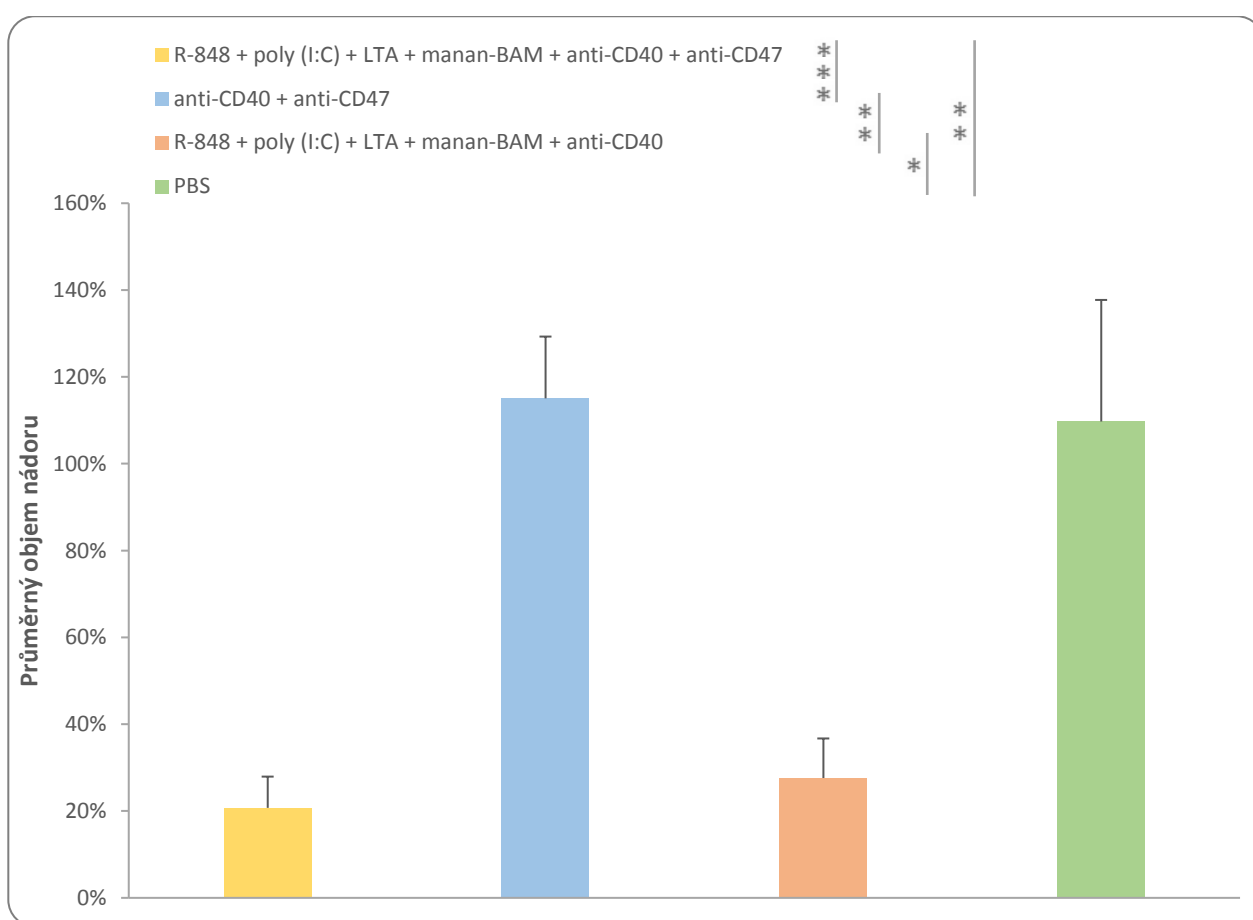
Graf (Obr. 4) znázorňuje AUC neboli velikost plochy pod křivkou. Jsou zde patrné signifikantní rozdíly mezi skupinami.

Hodnoty ve skupinách A i C jsou prokazatelně nižší než hodnoty skupin B a K.

Samotné protilátky anti-CD40 a anti-CD47 nemají na velikost nádoru vůbec žádný vliv. V našem případě dokonce i trochu horší než u kontrolní skupiny. Statisticky mezi těmito skupinami není signifikantní odlišnost.

Mezi skupinami A a C není statisticky prokazatelný rozdíl, ačkoli AUC skupiny A je trochu menší.

Mezi skupinami B a K není signifikantní rozdíl.



Obr. 4: Vliv účinku různých terapeutických směsí na růst nádorů Panc02 – velikost ploch pod křivkou (AUC).

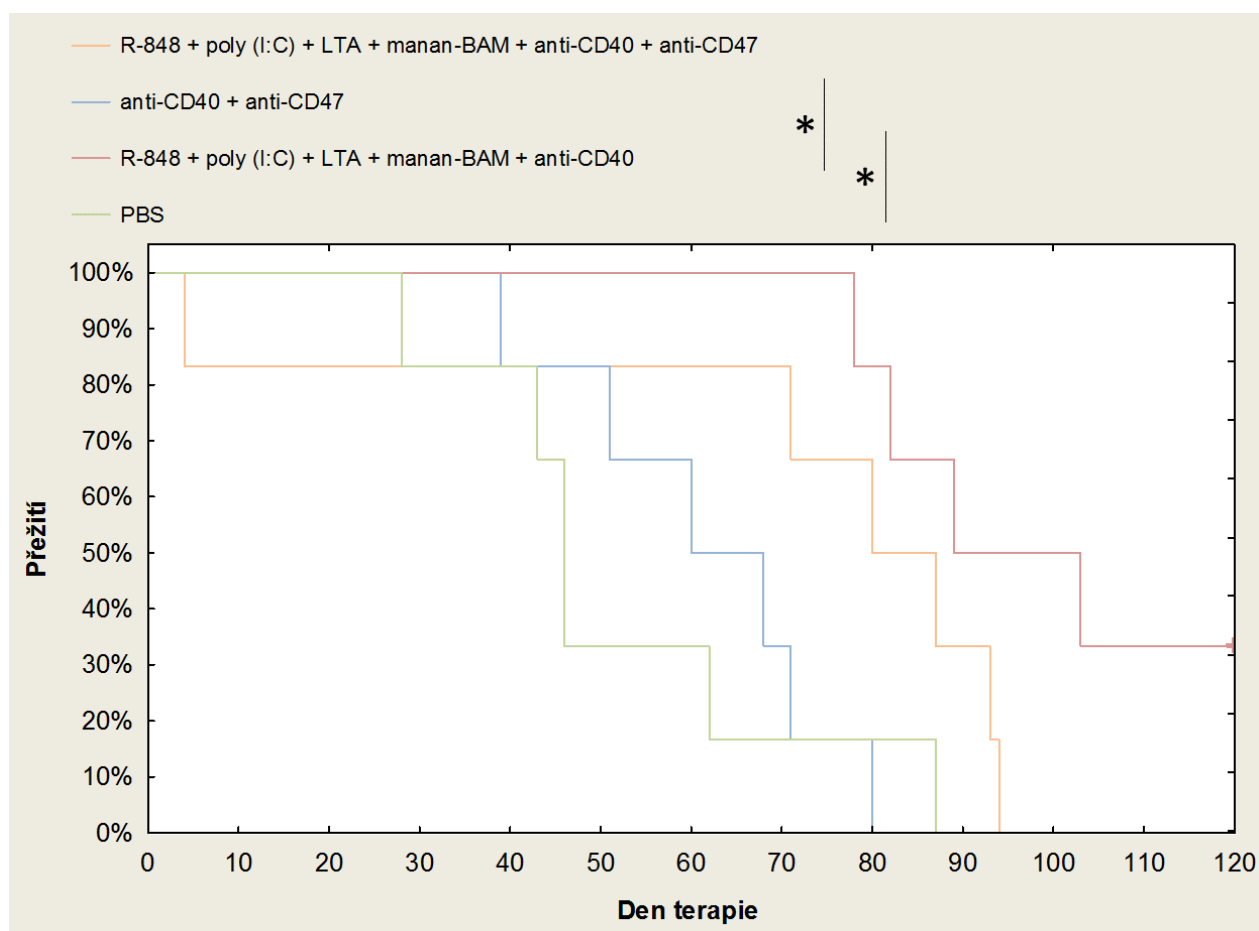
Skupina A – R-848 + poly (I:C) + LTA + manan-BAM + anti-CD40 + anti-CD47, **skupina B** – anti-CD40 + anti-CD47, **skupina C** – R-848 + poly (I:C) + LTA + manan-BAM + anti-CD40, **skupina K** – PBS.

Hladiny statistické významnosti: $p \leq 0,05$ *, $p \leq 0,01$ **, $p \leq 0,005$ ***.

V následujícím grafu (Obr. 5) je možno sledovat vliv podání terapeutik na dobu přežití. Jak je zde patrné, ačkoli byl vliv aplikace terapeutika s anti-CD47 na redukci nádorového růstu velký, žádná myš ze skupiny se nedožila 120. dne. Mezi dobou přežití této skupiny a skupin B a K, není žádný signifikantní rozdíl. Jedna myš ze skupiny A uhynula velice brzy, avšak nikoli na následky nádorového onemocnění, nýbrž patrně kvůli prožitému stresu.

Naproti tomu ve skupině C se 120. dne dožily dvě myši a mezi skupinami C a B a skupinami C a K je prokazatelný rozdíl s hladinou významnosti $p \leq 0,05$.

Ani na dobu přežití neměly samotné protilátky anti-CD40 a anti-CD47 velký vliv. Většina myší kontrolní skupiny sice uhynula dříve, avšak jedna myš dokonce déle, než myši ze skupiny B. Mezi těmito skupinami není statisticky prokazatelný rozdíl.



Obr. 5: Vliv intratumorální aplikace anti-CD47 na dobu přežití.

Skupina A – R-848 + poly (I:C) + LTA + manan-BAM + anti-CD40 + anti-CD47, **skupina B** – anti-CD40 + anti-CD47, **skupina C** – R-848 + poly (I:C) + LTA + manan-BAM + anti-CD40, **skupina K** – PBS.

Hladiny statistické významnosti: $p \leq 0,05$ *.

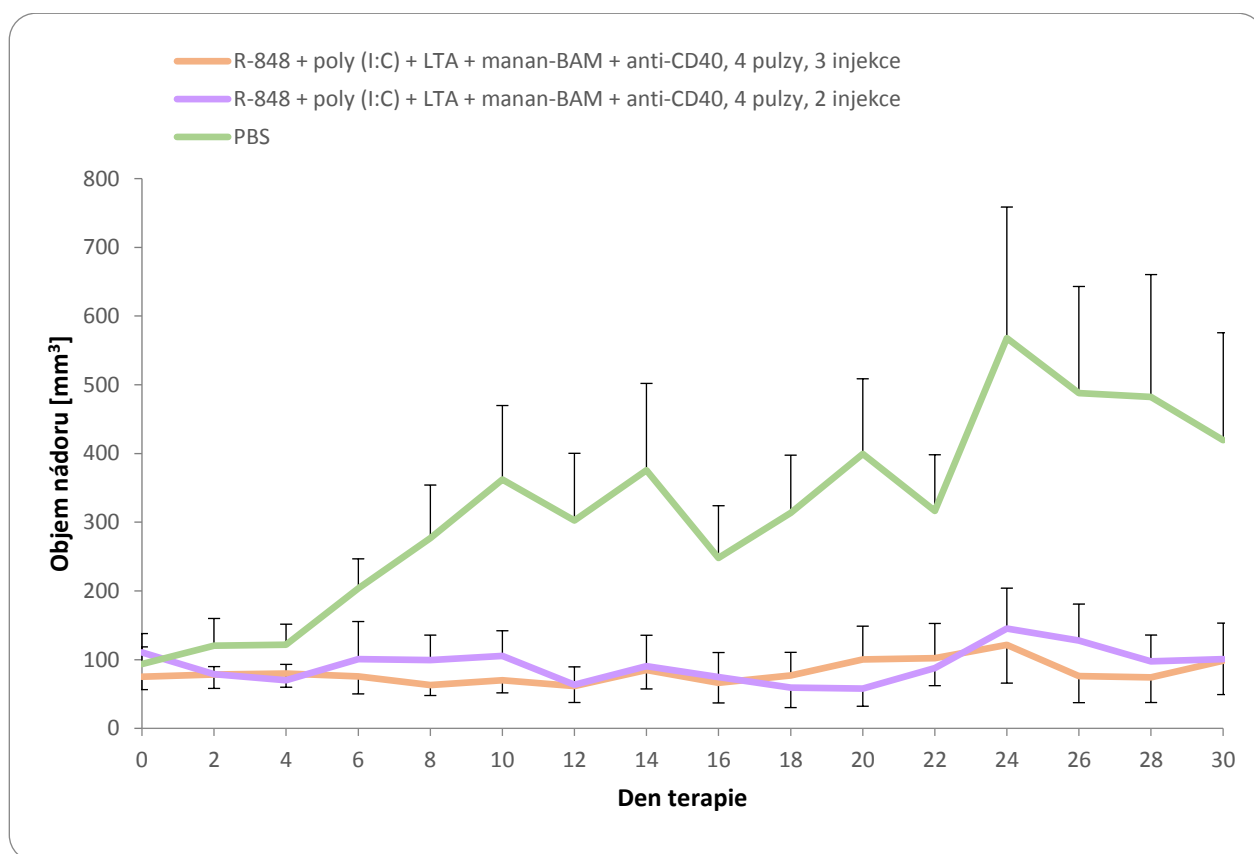
5.2 Pokus č. 2

Cílem tohoto pokusu bylo zjistit, zda by nebylo možné zredukovat počet injekcí za pulz, a to ze tří pouze na dvě.

Z následujícího grafu (Obr. 6) lze vysledovat, že snížení dávky terapeutika nemělo na objem nádoru žádný vliv. Objemy nádorů skupin A i B se pohybují ve stejném rozmezí.

Objemy nádorů skupin A a B jsou výrazně menší než u kontrolní skupiny K.

Výrazné kolísání křivek je přičítáno nekrotizaci nádorové tkáně a chybě v měření způsobené lidským faktorem.



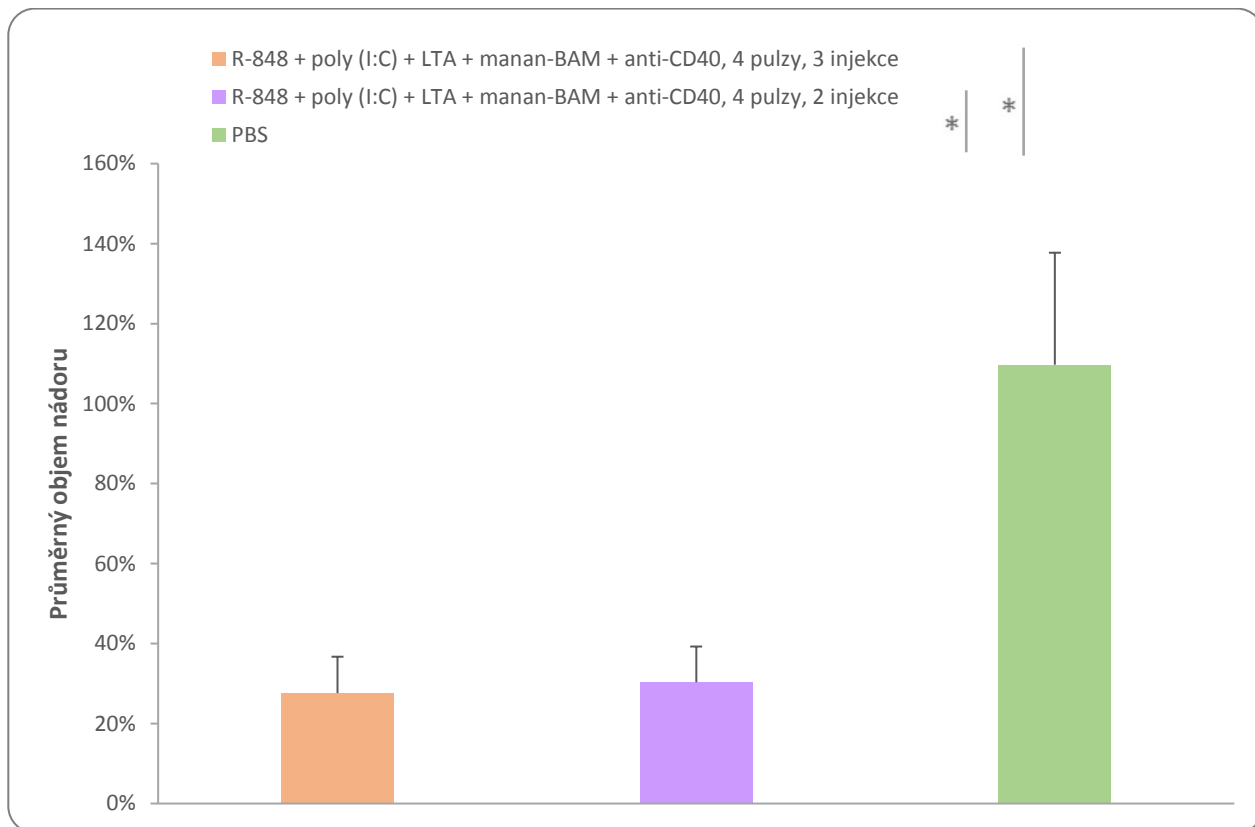
Obr. 6: Vliv počtu injekcí v pulzu na velikost nádoru.

Skupina A – R-848 + poly (I:C) + LTA + manan-BAM + anti-CD40, 4 pulzy, 3 injekce, **skupina**

B – R-848 + poly (I:C) + LTA + manan-BAM + anti-CD40, 4 pulzy, 2 injekce, **skupina K** – PBS.

I v tomto grafu (Obr. 7) jsou hodnoty skupin A i B takřka totožné a statisticky mezi nimi není prokazatelný rozdíl. Redukce počtu podaných injekcí nemá negativní vliv na růst nádoru.

AUC obou skupin A i B jsou signifikantně odlišné od kontrolní skupiny K s hladinou významnosti $p \leq 0,05$.



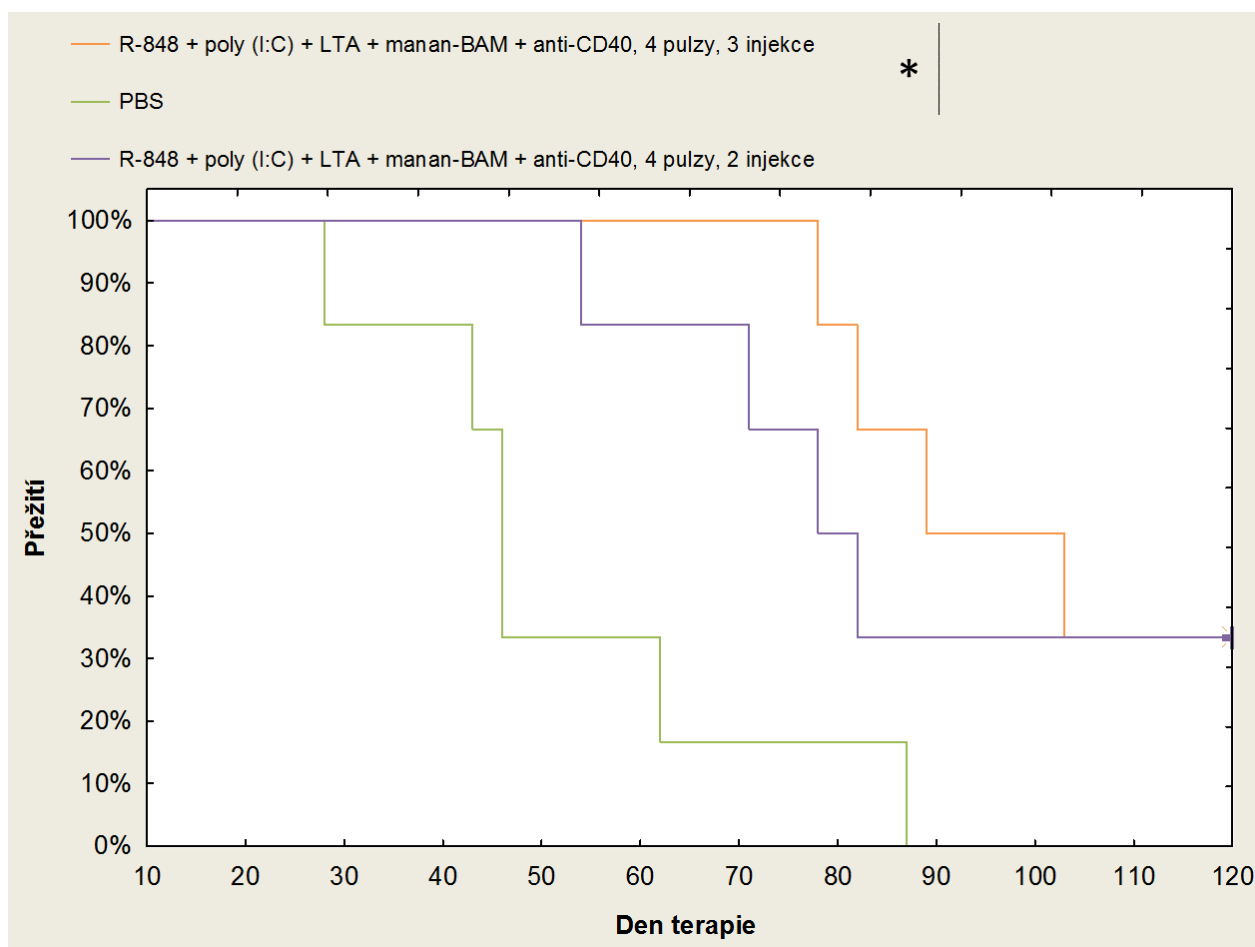
Obr. 7: Vliv počtu injekcí v pulzu na velikost plochy pod křivkou (AUC).

Skupina A – R-848 + poly (I:C) + LTA + manan-BAM + anti-CD40, 4 pulzy, 3 injekce, **skupina B** – R-848 + poly (I:C) + LTA + manan-BAM + anti-CD40, 4 pulzy, 2 injekce, **skupina K** – PBS.

Hladiny statistické významnosti: $p \leq 0,05$ *.

V následujícím grafu (Obr. 8) už lze pozorovat rozdíl mezi skupinami A a B. Je možno zde pozorovat dobu přežití skupin A, B a K.

Ačkoli se z obou skupin A a B 120. dne dožily dvě myši, vyšší frekvence podávání terapeutika má prokazatelně pozitivní vliv na dobu přežití vzhledem ke kontrolní skupině s hladinou významnosti $p \leq 0,05$, zatímco skupina B nikoli. Avšak mezi samotnými skupinami A a B opět statisticky významný rozdíl není. Lze pouze pozorovat, že mezi úhyny první myši obou skupin je takřka třicetidenní rozdíl.



Obr. 8: Vliv počtu injekcí v pulzu na dobu přežití.

Skupina A – R-848 + poly (I:C) + LTA + manan-BAM + anti-CD40, 4 pulzy, 3 injekce, **skupina**

B – R-848 + poly (I:C) + LTA + manan-BAM + anti-CD40, 4 pulzy, 2 injekce, **skupina K** – PBS.

Hladiny statistické významnosti: $p \leq 0,05$ *.

6 Diskuse

Naše terapie je založená na synergii TLR agonistů a umělé opsonizaci nádorových buněk pomocí manan-BAM. Ten působí tak, že se ukotví do membrány nádorových buněk, a tím aktivuje komplement. Díky tomu dojde k opsonizaci těchto buněk molekulami iC3b. Tyto molekuly jsou rozpoznány buňkami vrozené imunity pomocí svých povrchových receptorů CR3. Tyto buňky mohou pak nádorové buňky napadnout a odstranit (Janotová a kol., 2014; Waldmannová a kol., 2016). Na vrozenou imunitu pak navazuje imunita získaná, která nádor doléčí zhruba 40. až 50. den po zahájení léčby (Caisová a kol., 2016; Caisová a kol., 2018).

Tato kombinace (R-848 + poly (I:C) + LTA + manan-BAM), účinná při terapii myšího melanomu, se však při aplikaci na karcinom slinivky ukázala jako nedostatečná (Caisová a kol., 2018). Jak již bylo zmíněno, důvody nižšího terapeutického účinku můžou být částečně nízká infiltrace efektorovými T buňkami a současná masivní infiltrace imunosupresivními leukocyty. Hustá desmoplastická stroma podporuje angiogenezi a zabraňuje vstupu buněk imunitního systému, přičemž stroma není jen pasivní bariérou pro imunitní systém, ale také interaguje s nádorovými buňkami, stimuluje jejich progresi a invazivitu. (Kunk a kol., 2016).

Proto bylo nutné vakcínu vylepšit. Správným řešením se ukázalo být přidání anti-CD40 protilátky. Z práce Ahonena a jeho kolegů totiž vyplývá, že kombinace anti-CD40 s R-848 a poly (I:C) iniciuje tvorbu stabilních CD8+ paměťových buněk. Ty jsou odolné proti fyzikálním a chemickým vlivům, a navíc jim nevadí imunosupresivní prostředí vyvolané nádorem (Ahonen a kol., 2004).

Tímto krokem bylo dosaženo 80% přežití při počáteční velikosti nádoru 40 mm³ (Caisová a kol., 2018). Co by se ale stalo, kdyby byla vakcína aplikována na objemnější nádory? Předpokládaly jsme, že při větším počátečním objemu nádorů by mohlo přežití klesnout, proto byla vyvinuta snaha naši vakcínu ještě vylepšit. Jelikož důležitou součástí účinku naší terapie je vyvolání fagocytózy nádorových buněk buňkami vrozené imunity, bylo logické pokusit tento účinek posílit. Nádorové buňky se brání ataku fagocytujícími buňkami exprimováním „*don't eat me*“ molekul CD31, CD47 a CD200 na svém povrchu (Elward a Gasque, 2003). Nejvýznamnější z nich CD47, která se hojně vyskytuje i u pankreatického adenokarcinomu (Cioffi a kol., 2015), se zdála být dobrým kandidátem pro bližší zkoumání. Z literatury bylo zjištěno, že proběhlo již mnoho pokusů o inhibici CD47 pomocí anti-CD47 monoklonální protilátky. Tyto pokusy proběhly v rámci nádorové imunoterapie několika lidských malignit, včetně pankreatického adenokarcinomu,

a výsledky vykazovaly kladný vliv anti-CD47 na léčbu (Jaiswal a kol., 2009; Majeti a kol., 2009; Rendtlew Danielsen a kol., 2007; Chan a kol., 2009; Cioffi a kol., 2015).

To vše vede k závěru, že použití anti-CD47 protilátky jako další složky naší vakcíny by bylo správným krokem.

Po prostudování účinků anti-CD47 protilátky se však naskytá otázka, zda nebude její účinek v kombinaci s vakcínou příliš prudký, což by vedlo k příliš rychlé redukci nádorové hmoty, která je potřebná k dosažení dostatečného navakcinování organismu. Podobný jev, kdy se obdobně drastické zmenšení nádoru negativně projevilo na jeho léčbě, byl totiž již sledován (J. Ženka, ústní sdělení).

Ze zjištění těchto skutečností vyvstala otázka: Bude vakcína po přidání anti-CD47 protilátky účinnější, nebo bude její připojení ke směsi naopak v konečném důsledku kontraproduktivní? Odpověď mohla být nalezena pouze zrealizováním praktického experimentu. Z výsledků tohoto výzkumu vyplývá několik závěrů.

Prvním závěrem je, že anti-CD47 protilátka v kombinaci s naší terapeutickou vakcínou má opravdu silný pozitivní účinek na redukci nádorové hmoty. Velikost nádorů od počátku terapie klesala, až dvanáctý den nádory téměř vymizely. Potom však nastal zlom, pravděpodobně paradoxně kvůli malému množství nádorových buněk, a nádory opět začaly zvolna nabírat na objemu. Znamená to, že nedošlo k dostatečnému navakcinování organismu. Dostatečné množství nádorové hmoty nevydrželo déle než dva pulzy. To v konečném důsledku zeslabilo navakcinování organismu a zapojení získané imunity. Jeví se, že pro naši terapii je počet pulzů důležitý. Aby se k léčbě stihla zapojit získaná imunita, je potřeba čtyř pulzů (Caisová a kol., 2018).

Ačkoli byla doba přežití u těchto myší lepší než u kontrolní skupiny a skupiny léčené pouze anti-CD40 a anti-CD47, tento rozdíl nebyl statisticky signifikantní a žádná z myší se nedožila 120 dnů. Naproti tomu pomocí vakcíny v původním složení (bez přidaného anti-CD47) se podařilo dvě myši vyléčit (33% přežití).

Z toho plyne, že naši terapeutickou vakcínu již nelze více vylepšit. Každé zlepšení je paradoxně kontraproduktivní. Pokud má být zvýšena účinnost terapie, musí být zkombinována s léčbou s jiným terapeutickým přístupem.

Druhou otázkou bylo, zda by nebylo možné redukovat počet terapeutických injekcí z dvanácti na osm. Z praktického hlediska by pak byla léčba méně nákladná a o trochu méně

bolestivá pro pacienta. Navíc se zdá, že pro terapii není významný počet injekcí za pulz, nýbrž počet pulzů (Caisová a kol., 2018).

Výsledek experimentu není zcela jednoznačný. Co se týče redukce nádorové hmoty, nebyl mezi skupinami léčenými dvanácti a osmi injekcemi prakticky žádný rozdíl. Objemy nádorů obou skupin byly signifikantně nižší než objemy nádorů kontrolní skupiny. Jediným rozdílem mezi nimi byly pak délky přežití.

Zatímco vyšší frekvence podávání terapeutika má prokazatelně (s hladinou významnosti menší než 0,05) pozitivní vliv na dobu přežití vzhledem ke kontrolní skupině, mezi skupinou s nižší frekvencí podání terapeutika a kontrolní skupinou statisticky prokazatelný rozdíl nebyl.

Avšak mezi samotnými skupinami s odlišnou frekvencí podání terapeutika statisticky významný rozdíl také není a v obou skupinách se 120 dnů shodně dožily dvě myši. Lze pouze pozorovat, že mezi úhyny první myši obou skupin je takřka třicetidenní rozdíl.

Zdá se, že by se bez následků mohl zredukovat počet aplikací vakcíny. Výsledky jsou však natolik nejednoznačné, že bude potřeba tuto hypotézu ještě ověřit několika pokusy.

7 Závěr

- Provedená rešerše ukázala na potenciální možnost kombinovat anti-CD47 protilátku s naší imunoterapií založenou na synergii TLR agonistů a stimulace fagocytózy.
- Anti-CD47 protilátka v kombinaci s naší imunoterapií působí velmi kladně na redukci nádorové hmoty.
- Anti-CD47 protilátka působí účinně pouze v počátku terapie.
- Všechny myši léčené terapeutikem s přidanou anti-CD47 protilátkou se nedožily 120 dnů, touto cestou nebylo dosaženo dostatečného vakcinačního účinku.
- Zvyšování účinnosti primárního ataku nádorů pomocí naší imunoterapie se jeví jako kontraproduktivní. Je diskutována nutnost kombinace s jiným terapeutickým přístupem – bude předmětem dalšího výzkumu.
- Dosažení vakcinačního účinku se zdá být pro vyléčení velkých nádorů pankreatu klíčové.
- Zdá se že, navakcinování organismu, které pomáhá doléčit nádor, lze dosáhnout pouze s dostatečným množstvím nádorové hmoty po dostatečnou dobu. Tato hypotéza bude dále předmětem zkoumání.
- U velkých pankreatických nádorů jsme schopni naší imunoterapií (bez přídatku anti-CD47) vyléčit 33 % myši.
- Nebyl prokázáný jednoznačný rozdíl mezi léčbou podle vakcinačního schématu se třemi aplikacemi terapeutika na pulz a léčbou podle schématu jen se dvěma aplikacemi.

8 Citovaná literatura

Ahonen, C. L., Doxsee, C. L., McGurran, S. M., Riter, T. R., Wade, W. F., Barth, R. J., et al. (2004). Combined TLR and CD40 triggering induces potent CD8+ T cell expansion with variable dependence on type I IFN. *Journal of Experimental Medicine*; 199(6): 775–784.

Akira, S., Hemmi, H. (2003). Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. *Immunology Letters*; 85: 85–95.

Allavena, P., Sica, A., Garlanda, C., Mantovani, A. (2008). The yin-yang of tumor-associated macrophages in neoplastic progression and immune surveillance. *Immunological Reviews*; 222: 155–161.

Allema, J. H., Reinders, M. E., van Gulik, T. M., et al. (1995). Prognostic factors for survival after pancreaticoduodenectomy for patients with carcinoma of the pancreatic head region. *Cancer*; 75: 2069–2076.

Bajor, D. L., Mick, R., Riese, M. J., Richman, L. P., Xu, X., Torigian, D. A., et al. (2015). Abstract CT137: combination of agonistic CD40 monoclonal antibody CP-870,893 and anti-CTLA-4 antibody tremelimumab in patients with metastatic melanoma. *Cancer Research*; 75(15): 1158/1538–7445.

Bennett, S. R., Carbone, F. R., Karamalis, F., Flavell, R. A., Miller, J. F., Heath, W. R. (1998). Help for cytotoxic-Tcell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature*; 393(6684): 478–480.

Bianchi, M. E. (2007). DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *Journal of leukocyte biology*; 81: 1–5.

Blazar, B. R., Lindberg, F. P., Ingulli, E., Panoskaltsis-Mortari, A., Oldenborg, P. A., Iizuka, K., Yokoyama, W. M., Taylor, P. A. (2001). Cd47 (integrin-associated protein) engagement of dendritic cell and macrophage counterreceptors is required to prevent the clearance of donor lymphohematopoietic cells. *Journal of Experimental Medicine*; 194(4): 541–549.

Brown, E. J., Frazier, W. A. (2001). Integrin-associated protein (cd47) and its ligands. *Trends Cell Biology*; 11(3): 130–135.

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

Caisová, V., Vieru, A., Kumžáková, Z., Glaserová, S., Husníková, H., Vácová, N., Krejčová, G., Paďouková, L., Jochmanová, I., Wolf, K. I., Chmelař, J., Kopecký, J., Ženka, J., 2016. Innate immunity based cancer immunotherapy: B16-F10 murine melanoma model. *BMC Cancer*; 16: 1-11.

Cameron, J. L., Crist, D. W., Sitzmann, J. V., Hruban, R. H., Boitnott, J. K., Seidler, A. J., et al. (1991). Factors influencing survival after pancreaticoduodenectomy for pancreatic cancer. *The American Journal of Surgery*; 161: 120–124.

Castellino, F., Galli, G., Giudice, G. D., Rappuoli, R. (2009). Generating memory with vaccination. *European Journal of Immunology*; 39: 2100–2105.

Cioffi, M., Trabulo, s., Hidalgo, M., Costello, E., Greenhalf, E., Erkan, M., et al. (2015) Inhibition of CD47 effectively targets pancreatic cancer stem cells via dual mechanisms. *Clinical Cancer Research*; 21: 2325–2337.

Český statistický úřad. *Vývoj obyvatelstva České republiky, Úmrtnost*. 21.3.2018. Dostupné z: <https://www.czso.cz/documents/10180/45964328/1300691706.pdf/22f73924-f09f-4ef1-8942-ddbca8265c44?version=1.0> .

Dvořáčková, J., Gamratová, M. (2017). *Patologie v kostce*. 2. vydání. Ostrava: Ostravská univerzita. ISBN: 978-80-7464-926-4.

Elward, K., Gasque, P. (2003). “Eat me” and “don’t eat me” signals govern the innate immune response and tissue repair in the CNS: emphasis on the critical role of the complement systém. *Molecular Immunology*; 40: 85–94.

Ferenčík, M., Rovenský, J., Macha, V. (2004). *Ilustrovaný imunologický slovník*. 1. vydání. Praha: Galén. ISBN: 8072622439.

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

Fridlender, Z. G., Sun, J., Kim, S., Kapoor, V., Cheng, G., Ling, L., Worthen, G. S., Albelda, S. M. (2009). Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF- β : "N1" versus "N2" TAN. *Cancer Cell*; 16: 183–194.

Gardai, S. J., McPhillips, K. A., Frasch, S. C., Janssen, W. J., Starefeldt, A., Murphy-Ullrich, J. E., et al. (2005). Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of Irf on the phagocyte. *Cell*; 123(2): 321–334.

Gollob, J. A., Sciambi, C. J., Huang, Z., Dressman, H. K. (2005). Gene expression changes and signaling events associated with the direct antimelanoma effect of IFN- γ . *Cancer Research*; 65: 8869–8877.

Grimsley, C., Ravichandran, K. S. (2003). Cues for apoptotic cell engulfment: eat-me, don't eat-me and come-get-me signals. *Trends in Cell Biology*; 13(12): 648–656.

Gutterman, J. U. (1994). Cytokine therapeutics: lessons from interferon alpha. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 91(4): 1198–1205.

Hamplová, L. a kol. (2015). *Mikrobiologie, imunologie, epidemiologie, hygiena pro bakalářské studium a všechny typy zdravotnických škol*. 1. vydání. Praha: Triton. ISBN: 978-80-7387-934-1.

Hanahan, D., Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*; 144(5): 646–674.

Hemmi, H., Kaisho, T., Takeuchi O., Sato, S., Sanjo, H., Hoshino, K., Horiuchi, T., Tomizawa, H., Takeda K., and Akira, S. (2002). Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nature Immunology*; 3: 196.

Hlavsa, J., Man, M., Kala, Z., Procházka, V., Svatoň, R., Válek, V., Vášová, I., Novotný, I., Novotný, I., Starý, K., Kiss, I., Prášek, J. (2008). Nádory pankreatu. *Medicina pro praxi*; 5(10): 388–392.

Hořejší, V., Bartůňková, J., Brdička, T., Špišek, R. (2017). *Základy imunologie*. 6. vydání. Praha: Triton. ISBN: 978-80-7553-250-3.

Chan, K. S., Espinosa, I., Chao, M., Wong, D., Ailles, L., Diehn, M., et al. (2009). Identification, molecular characterization, clinical prognosis, and therapeutic targeting of human bladder tumor-initiating cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 106(33): 14016–14021.

Chao, M. P., Majeti, R., Weissman, I. L. (2011). Programmed cell removal: A new obstacle in the road to developing cancer. *Nature Reviews Cancer*; 12: 58–67.

International Agency for Research on Cancer. *GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012* [online graf]. 21.3.2018. Dostupné z: http://globocan.iarc.fr/Pages/bar_sex_site_sel.aspx .

Janeway, C. (1989). Immunogenicity signals 1,2,3 ... and 0. *Immunology Today*; 10: 283–286.

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., Jr., Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annual Review of Immunology*; 20: 197–216.

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

Janssen, E. M., et al. (2005). CD4+ T-cell help controls CD8+ T-cell memory via TRAIL-mediated activation-induced cell death. *Nature*; 434(7029): 88–93.

Jaiswal, S., Chao, M. P., Majeti, R., Weissman, I. L. (2010). Macrophages as mediators of tumor immunosurveillance. *Trends in Immunology*; 31(6): 212–219.

Jaiswal, S., Jamieson, C. H., Pang, W. W., Park, C. Y., Chao, M. P., Majeti, R., Traver, D., van Rooijen, N., Weissman, I. L. (2009). Cd47 is upregulated on circulating hematopoietic stem cells and leukemia cells to avoid phagocytosis. *Cell*; 138(2): 271–285.

Jílková, E. (2012). Principy aktivní imunizace. Je očkování zátěž? *Interní medicína*; 14(8 a 9): 336–338.

Jones, T. (2003). Resiquimod 3M. *Current Opinion in Investigational Drugs*; 4: 214.

Jurk, M., Heil, F., Vollmer, J., Schetter, C., Krieg, A. M., Wagner, H., Lipford, G., Bauer, S. (2002). Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848. *Nature Immunology*; 3: 499.

Kast, W. M., Bronkhorst, A. M., de Waal, L. P., Melief, C. J. (1986). Cooperation between cytotoxic and helper T lymphocytes in protection against lethal Sendai virus infection. Protection by T cells is MHC-restricted and MHC-regulated; a model for MHC-disease associations. *Journal of Experimental Medicine*; 164(3): 723–738.

Kastnerová, M. (2016). *Etiopatogeneze civilizačních onemocnění*. 1. vydání. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Pedagogická fakulta. ISBN: 978-80-7394-621-0.

Kato, K., Itoh, Ch., Yasukouchi, T., Nagamune, T. (2004): Rapid Protein Anchoring into the Membranes of Mammalian Cells Using Oleyl Chain and Poly(ethylene glycol) Derivatives. *Biotechnol Progr*; 20(3): 897–904.

Kilpatrick, D. C. (2002). Mannan-binding lectin and its role in innate immunity. *Transfusion Medicine*; 12(6): 335–352.

Kowanko, I. C., Ferrante, A. (1987). Stimulation of neutrophil respiratory burst and lysosomal enzyme release by human interferon- γ . *Immunology*; 62: 149-151.

Kunk, P. R., Bauer, T. W., Slingsluff, C. L., Rahma, O. E. (2016). From bench to bedside a comprehensive review of pancreatic cancer immunotherapy. *Journal for Immunotherapy of Cancer*; 4(14).

Kunkel, S. L., Standiford, T., Kasahara, K., Strieter, R. M. (1990). Interleukin-8 (IL-8): The Major Neutrophil Chemotactic Factor in the Lung. *Experimental Lung Research*; 17: 17–23.

Larangé, A., Antonios, D., Pallardy, M., Kerdine-Römer, S. (2009). TLR7 and TLR8 agonists trigger different signaling pathways for human dendritic cell maturation. *Journal of Leukocyte Biology*, 85(4), 673–683.

Lindberg, F. P., Bullard, D. C., Caver, T. E., Gresham, H. D., Beaudet, A. L., Brown, E. J. (1996). Decreased resistance to bacterial infection and granulocyte defects in iap-deficient mice. *Science*; 274(5288): 795–798.

Liu, Y., Merlin, D., Burst, S. L., Pochet, M., Madara, J. L., Parkos, C. A. (2001). The role of cd47 in neutrophil transmigration. Increased rate of migration correlates with increased cell surface expression of cd47. *Journal of Biological Chemistry*; 276(43): 40156–40166.

Longhi, M. P., Trumfheller, M. C., Idoyaga, J., Caskey, M., Matos, I., Kluger, C., et al. (2009). Dendritic cells require a systemic type I interferon response to mature and induce CD4⁺ Th1 immunity with poly IC as adjuvant. *Journal of Experimental Medicine*; 206: 1589–1602.

- Majeti, R., Chao, M. P., Alizadeh, A. A., Pang, W. W., Jaiswal, S., Gibbs, K. D., Jr., et al. (2009). Cd47 is an adverse prognostic factor and therapeutic antibody target on human acute myeloid leukemia stem cells. *Cell*; 138(2): 286–299.
- Mantovani, A., Bottazzi, B., Colotta, F., Sozzani, S., Ruco, L. (1992). The origin and function of tumor-associated macrophages. *Immunol Today*; 13(7): 265–270.
- Matzinger, P. (1994). Tolerance, danger, and the extended family. *Annual Review of Immunology*; 12: 991–1045.
- Medzhitov, R. (2007). Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*; 449: 819–826.
- Medzhitov, R., Janeway, C. A., Jr. (1997). Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Current Opinion in Immunology*. 9: 4–9.
- Melief, C. J. M., van Hall, T., Arens, R., Ossendorp, F., van der Burg, S. H. (2017). Therapeutic cancer vaccines. *The Journal of Clinical Investigation*; 125(9): 3401–3412.
- 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. *Journal of Biological Chemistry*; 276(28): 25680–6.
- Napolitani, G, Rinaldi, A., Bertoni, F., Sallusto, F., Lanzavecchia, A. (2005). Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1–polarizing program in dendritic cells. *Nature Immunology*; 6(8): 769–776.
- Ocana, A., Nieto-Jiménez, C., Pandiella, A., Templeton, A. J. (2017). Neutrophils in cancer: prognostic role and therapeutic strategies. *Molecular Cancer*; 16: 137.
- Poels, L. G., Peters, D., van Megen, Y., Vooijs, G. P., Verheyen, R. N., Willemsen, A., et al. (1986). Monoclonal antibody against human ovarian tumor-associated antigens. *Journal of the National Cancer Institut*; 76(5): 781–791.
- Quezada, S. A., et al. (2010). Tumor-reactive CD4(+) T cells develop cytotoxic activity and eradicate large established melanoma after transfer into lymphopenic hosts. *Journal of Experimental Medicine*; 207(3): 637–650.

Reinhold, M. I., Lindberg, F. P., Plas, D., Reynolds, S., Peters, M. G., Brown, E. J. (1995). In vivo expression of alternatively spliced forms of integrin-associated protein (cd47). *Journal of Cell Science*; 108(11): 3419–3425.

Rendtlew Danielsen, J. M., Knudsen, L. M., Dahl, I. M., Lodahl, M., Rasmussen, T. (2007). Dysregulation of cd47 and the ligands thrombospondin 1 and 2 in multiple myeloma. *British Journal of Haematology*; 138(6): 756–760.

Ribatti, D., Nico, B., Pezzolo, A., Vacca, A., Meazza, R., Cinti, R., et al. (2006). Angiogenesis in a human neuroblastoma xenograft model: mechanisms and inhibition by tumour-derived interferon- γ . *British Journal of Cancer*; 94: 1845–1852.

Ridge, J. P., Di, R. F., Matzinger, P. (1998). A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell. *Nature*; 393(6684): 474–478.

Richter, A., Niedergethmann, M., Sturm, J. W., Lorenz, D., Post, S., Trede, M. (2003). Long-term results of partial pancreaticoduodenectomy for ductal adenocarcinoma of the pancreatic head: 25-year experience. *World Journal of Surgery*; 27: 324–329.

Ross, G. D., Větvička, V. (1993). CR3 (CD11b, CD18): a phagocyte and NK cell membrane receptor with multiple ligand specificities and functions. *Clinical and Experimental Immunology*; 92: 181–184.

Rubartelli, A., Lotze, M. T. (2007). Inside, outside, upside down: damage-associated molecular-pattern molecules (DAMPs) and redox. *Trends in Immunology*; 28: 429–436.

Ryska, M. (2010). Karcinom pankreatu, Chirurgická strategie léčby. *Onkologie*; 4(6): 333–337.

Sarfati, M., Fortin, G., Raymond, M., Susin, S. (2008) Cd47 in the immune response: Role of thrombospondin and sirp-alpha reverse signaling. *Current Drug Targets*; 9(10): 842–850.

Selders, G. S., Fetz, A. E., Radic, M. Z., Bowlin, G. L. (2017). An overview of the role of neutrophils in innate immunity, inflammation and host-biomaterial integration. *Regenerative Biomaterials*; 4(1): 55–68.

Schoenberger, S. P., Toes, R. E., van der Voort, E. I., Offringa, R., Melief, C. J. (1998). T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature*; 393(6684): 480–483.

Schwandner, R., Diarski, R., Wesche, H., Rothe, M., Kirschning, C. J. (1999). Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *Journal of Biological Chemistry*; 274: 17406–9

Siegel, R. L., Miller, K. D., Jemal, A. (2017). Cancer statistics, 2017. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*; 67: 7–30.

Silva, J. M., Videira, M., Gaspar, R., Preat, V., Florindo, H. F. (2013). Immune system targeting by biodegradable nanoparticles for cancer vaccines. *Journal of Controlled Release*; 168(2): 179–199.

Sohn, T. A., Yeo, C. J., Cameron, J. L., Koniaris, L., Kaushal, S., Abrams, R. A., et al. (2000). Resected adenocarcinoma of the pancreas-616 patients: results, outcomes, and prognostic indicators. *Journal of Gastrointestinal Surgery*; 4: 567–579.

Svane, I. M., Engel, A. M., Nielson, M., Werdelin, O. (1997). Interferon- γ -induced MHC Class I expression and defects in Jak/Stat signalling in methylcholanthrene-induced sarcomas. *Scandinavian Journal of Immunology*; 46: 379–387.

Talamini, G., Falconi, M., Bassi, C., Sartori, N., Salvia, R., Caldiron, E., et al. (1999). Incidence of cancer in the course of chronic pancreatitis. *The American Journal of Gastroenterology*; 94: 1253–1260.

Torres, M. P., Rachagani, S., Soucek, J. J., Mallya, K., Johansson S. L., Batra, S. K. (2013). Novel pancreatic cancer cell lines derived from genetically engineered mouse models of spontaneous pancreatic adenocarcinoma: applications in diagnosis and therapy. *PLoS ONE*; 8(11): 1–12.

Treffers, L. W., Hiemstra, I. H., Kuijpers, T. W., van den Berg, T. K., Matlung, H. L. (2016). Neutrophils in cancer. *Immunological Reviews*; 273(1): 312–28.

Trumpfheller, C., Caskey, M., Nchinda, G., Longhi, M. P., Mizenina, O., Huang, Y., et al. (2008). The microbial mimic poly IC induces durable and protective CD4⁺ T cell immunity together with a dendritic cell targeted vaccine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 105: 2574–2579.

Tsai, R. K., Discher, D. E. (2008). Inhibition of “self” engulfment through deactivation of myosin-ii at the phagocytic synapse between human cells. *The Journal of Cell Biology*; 180(5): 989–1003.

Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR. *Novotvary 2015, ČR*. 21.3.2018. Dostupné z: <http://www.uzis.cz/publikace/novotvary-2015> .

van Gisbergen, K. P. J. M., Sanchez-Hernandez, M., Geijtenbeek, T. B. H., van Kooyk, Y., (2005). Neutrophils mediate immune modulation of dendritic cells through glycosylation-dependent interactions between Mac-1 and DC-SIGN. *The Journal of Experimental Medicine*; 201: 1281–1292.

Větvička, V., Thornton, B. P., Ross, G. D. (1996). Soluble beta-glucan polysaccharide binding to the lectin site of neutrophil or natural killer cell complement receptor type 3 (CD11b/CD18) generates a primed state of the receptor capable of mediating cytotoxicity of iC3b-opsonized target cells. *Journal of Clinical Investigation*; 98: 50–61.

Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T., Ugolini, S. (2008). Functions of natural killer cells. *Nature Immunology*; 9: 503–510.

Waldmannová, E., Caisová, V., Fáberová, J., Sváčková, P., Kovářová, M., Sváčková, D., Kumžáková, Z., Jačková, A., Vácová, N., Nedbalová, P., Horká, M., Kopecký, J., Ženka, J. (2016). The use of zymosan A and bacteria anchored to tumor cells for effective cancer immunotherapy: B16-F10 murine melanoma model. *International Immunopharmacology*; 39: 295–306.

Yasumoto, K., Okamoto, S., Mukaida, N., Murakami, S., Mai, M., Matsushima, K. (1992). Tumor necrosis factor alpha and interferon gamma synergistically induce interleukin 8 production in a human gastric cancer cell line through acting concurrently on AP-1 and NF-kB-like binding sites of the interleukin 8 gene. *The Journal of Biological Chemistry*; 267: 22506–22511.