

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

**Studium imunitní paměti při imunoterapii
pankreatického adenokarcinomu**

Diplomová práce

Bc. Kristýna Danielová

Vedoucí práce: RNDr. Jan Ženka, CSc.

České Budějovice 2022

Danielová, K., 2022: Studium imunitní paměti při imunoterapii pankreatického adenokarcinomu. [Study of immune memory in pancreatic adenocarcinoma immunotherapy. Mgr. Thesis, in Czech] – 77 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

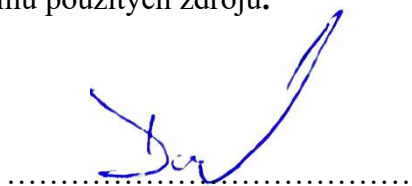
Annotation:

This thesis is focused on immunotherapeutic strategy of pancreatic adenocarcinoma based on combination of TLR agonists, the ligands stimulating phagocytosis and monoclonal antibody anti-CD40. The aim of this thesis was to analyze the memory subpopulations of the T lymphocytes and efficacy of isolated CD3⁺ T lymphocytes from cured mice on pancreatic adenocarcinoma cell attachment.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích, 5. 4. 2022



Bc. Kristýna Danielová

Poděkování:

V prvé řadě bych chtěla ze srdce poděkovat mému skvělému školiteli RNDr. Janu Ženkovi, CSc. za odborné vedení práce, ochotu, cenné rady a především za trpělivost. Dále mé poděkování patří Mgr. Andree Frejlachové za odborné rady a předání vědeckých zkušeností a poznatků. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat RNDr. Heleně Langhansové, Ph.D. za velkorysé zaškolení na průtokovém cytometru a prof. RNDr. Janu Kopeckému, CSc. za předání svých cenných vědeckých zkušeností. Mé obrovské poděkování si též zaslouží můj drahý snoubenec a rodina, kteří mi byli po celou dobu psaní této diplomové práce velkou oporou.

Obsah

1. ÚVOD.....	1
1.1. Nádorová onemocnění.....	1
1.1.1. Klasifikace nádorů.....	1
1.1.2. Šíření nádoru.....	2
1.1.3. Pankreatický adenokarcinom.....	2
1.1.3.1. Linie nádorových buněk Panc02.....	3
1.2. Imunitní systém.....	3
1.2.1. Vrozená (nespecifická) imunita	4
1.2.1.1. Buněčná složka vrozené imunity	5
1.2.1.2. Humorální složka vrozené imunity	6
1.2.2. Získaná (specifická) imunita.....	6
1.2.3. Imunitní paměťové buňky	8
1.2.3.1. Paměťové B lymfocyty.....	8
1.2.3.2. Paměťové T lymfocyty.....	11
1.2.3.2.1. Tcm lymfocyty.....	13
1.2.3.2.2. Tem lymfocyty.....	13
1.2.3.2.3. Mechanismy vzniku paměťových T lymfocytů.....	13
1.2.3.2.4. Účinnost paměťových T lymfocytů proti nádorům	14
1.2.3.3. Paměťové NK buňky	15
1.2.4. Únik nádorových buněk imunitnímu systému	16
1.3. Nádorová imunoterapie	18
1.3.1. MBTA imunoterapie a její složky.....	18
1.3.1.1. Mechanismus účinku MBTA terapie	20
2. CÍLE PRÁCE.....	21
3. MATERIÁL A METODY	22
3.1. Chemikálie.....	22

3.2. Laboratorní myši	22
3.3. Příprava buněk Panc02	23
3.4. Transplantace buněk Panc02	23
3.5. Příprava terapeutických látek.....	24
3.5.1. Manan-BAM	24
3.5.2. MBTA.....	24
3.6. Měření velikosti nádorů.....	24
3.7. Výpočet plochy pod křivkou.....	24
3.8. Statistické zhodnocení dat	25
3.9. Experimenty.....	25
3.9.1. Terapie metastatického pankreatického adenokarcinomu rozdílným množstvím MBTA	25
3.9.2. Terapie pankreatického adenokarcinomu kombinací MBTA s DON aplikovaným i.t. a i.p.....	26
3.9.3. Terapie pankreatického adenokarcinomu MBTA a MBTA v kombinaci s DON v různých aplikačních schématech.....	27
3.9.4. Srovnání různých režimů aplikace MBTA při terapii pankreatického adenokarcinomu.....	29
3.9.5. Terapie rekurencí a prodloužení přežití.....	30
3.9.6. Analýza subpopulací paměťových imunitních buněk ve splenocytech myši léčených MBTA terapií	30
3.9.6.1. Odběr a zpracování splenocytů.....	31
3.9.6.2. Příprava splenocytů pro analýzu na průtokovém cytometru (FACS)	31
3.9.6.3. Analýza paměťových buněk pomocí FACS	32
3.9.7. Adoptivní transfer T lymfocytů a vliv na uchycení buněk Panc02.....	32
3.9.7.1. Odběr a zpracování splenocytů.....	33
3.9.7.2. Negativní magnetická separace (MACS)	33
3.9.7.3. Příprava buněk pro analýzu na FACS	34
3.9.7.4. Stanovení čistoty buněk pomocí FACS.....	34

3.9.7.5.	Adoptivní transfer VYizolovaných T lymfocytů.....	34
3.9.7.6.	Transplantace Panc02.....	35
4.	VÝSLEDKY.....	36
4.1.	Terapie metastatického pankreatického adenokarcinomu rozdílným množstvím MBTA	36
4.3.	Terapie pankreatického adenokarcinomu MBTA a MBTA v kombinaci s DON v různých aplikačních schématech.....	39
4.4.	Srovnání různých režimů aplikace MBTA při terapii pankreatického adenokarcinomu.....	40
4.6.	Analýza subpopulací paměťových imunitních buněk ve splenocytech myší léčených MBTA terapií.....	45
4.7.	Adoptivní transfer T lymfocytů a vliv na uchycení buněk Panc02.....	49
5.	DISKUSE	51
6.	ZÁVĚR.....	55
7.	SEZNAM ZKRATEK.....	56
8.	LITERATURA.....	59

1. ÚVOD

1.1. Nádorová onemocnění

Nádorová onemocnění jsou označována jako zhoubný novotvar nebo častěji se můžeme setkat s označením rakovina. Rakovina vzniká transformací z buněk těla vlastních vlivem nahromaděných mutací ve zdravé buňce. Navíc daná zmutovaná buňka přestává odpovídat na signály vedoucí k programované buněčné smrti a začne se nekontrolovatelně množit (Chabner a Chabner, 2013).

Hlavní příčinou ovlivňující vznik rakoviny je nahromadění velkého množství mutací. Mutace mohou být vrozené či získané působením vnějších faktorů. Vnější mutageny dělíme na biologické (lidský papillomavirus, Epstein-Barrové virus a lidský herpetický virus 8), fyzikální (ionizační a UV záření) a chemické (polycyklické aromatické uhlovodíky) (Comings, 1973).

Dalšími vlastnostmi charakteristickými pro nádorová onemocnění jsou schopnost pronikat do okolních tkání a zakládání metastáz, schopnost přeprogramovat energetický metabolismus buněk, možnost uniknout imunitnímu systému, soběstačnost v potřebě růstových faktorů, necitlivost k růst regulujícím signálům, neomezená replikace, rezistence vůči apoptóze, angiogeneze, genomová nestabilita (vznik mutací) (Hanahan a kol., 2011).

1.1.1. Klasifikace nádorů

Nádory rozlišujeme na benigní, maligní, semimaligní a potencionálně maligní podle jejich klinického a biologického chování a podle jejich vztahu k okolní tkáni.

Benigní (nezhoubné) nádory jsou charakterizovány jako ohraničené, neinvazivní, snadno chirurgicky odstranitelné, expanzivně a pomalu rostoucí. Benigní nádory mohou způsobovat problémy v případě, že působí mechanickým tlakem v nepříznivé lokaci (například v CNS) (Rejthar a Vojtěšek, 2002).

Maligní (zhoubné) nádory jsou charakterizovány jako invazivní (metastázující), agresivní vůči okolní tkáni, rychle rostoucí, neohraničené a tím pádem i hůře chirurgicky

odstranitelné. Pokud nejsou úspěšně odstraněny všechny maligní buňky, dochází k znovuoobnovení nádoru a metastazování do různých částí těla (Rejthar a Vojtěšek, 2002).

Semimaligní a potencionálně maligní nádory jsou takové druhy nádorů, u kterých nemůžeme podle diagnostických metod určit jejich malignitu nebo benignitu (Rejthar a Vojtěšek, 2002).

Dále nádorová onemocnění klasifikujeme podle tkáně, ze které vznikají, na epitelové, mezenchymové, neuroendokrinní, mezoteliomy, choriokarcinomy, lymfomy, smíšené a nádory z krvetvorné tkáně kostní dřeně (Vorlíček a kol., 2016). A podle orgánové lokalizace na rakovinu varlat, prsu, žaludku, tlustého střeva apod. (Sell, 2004).

1.1.2. Šíření nádoru

Schopnost buněčné migrace se řadí mezi jeden z nejdůležitějších buněčných procesů. Nádor se šíří prostřednictvím metastáz, což jsou dceřiné buňky vytvořené buňkami primárního nádoru za účelem expanze. Metastáze se šíří do tělních dutin, lymfatických uzlin, tkání či orgánů (Adam a Vorlíček, 2004). Zejména metastáze jsou zodpovědné za úmrtí u 90 % pacientů s rakovinou (Hejmadi, 2010).

Metastáze dělíme podle způsobu šíření na lymfogenní, hematogenní a implantační (v serózních dutinách - kloubní prostory, perikard) metastáze (Rejthar a Vojtěšek, 2002; Adam a Vorlíček, 2004).

1.1.3. Pankreatický adenokarcinom

Pankreatický adenokarcinom vzniká z exokrinního nebo endokrinního parenchymu slinivky břišní. V 95 % případů jde o exokrinní karcinom, který vzniká z pojivové tkáně, duktálního epitelu nebo z acinózních buněk. Nejčastěji bývá diagnostikován maligní adenokarcinom pankreatu z duktálního epitelu. Přibližně 70 % pankreatických adenokarcinomů vzniká v hlavě pankreatu, dalších 15 % se nachází v těle a zbylých 15 % v ocasu. V době diagnózy se většina adenokarcinomů pankreatu již rozšířila za pankreas a nodální metastáze nejsou neobvyklé (Ducieux a kol., 2015; Luchini a kol., 2016).

Adenokarcinom pankreatu je spojen se špatnou prognózou a rostoucí incidencí. Od stanovení diagnózy do pěti let zemře 95 % pacientů. Nádor je většinou asymptomatický a

příznaky se projevují až v pozdní fázi, kdy dochází k šíření metastáz do okolních uzlin, plic a jater. Přitom včasná diagnostika karcinomu je pro úspěšnou léčbu klíčová (Miller a kol., 2016).

Klinické příznaky jsou nespecifické. Nejčastějšími příznaky jsou ztráta hmotnosti, zvracení, bolest břicha, žloutenka a počínající diabetes (De Souza a kol., 2016).

Mezi rizikové faktory zvyšující výskyt rakoviny slinivky břišní řadíme zejména kouření. Kouření zvyšuje riziko vzniku karcinomu až o 75 % a toto zvýšené riziko přetrvává ještě dalších 10 let po ukončení kouření. Diabetes mellitus zvyšuje u pacientů vznik pankreatického karcinomu o 30 % (Bosetti a kol., 2014). Geneticky je ovlivněn vznik u 5-10 % pacientů (Ducieux a kol., 2015). Dalšími rizikovými faktory jsou chronická pankreatitida, obezita a zvýšená konzumace alkoholu (Raimondi a kol., 2009).

Prozatím jedinou léčbou adenokarcinomu pankreatu je chirurgická resekce s lymfadenektomií a adjuvantní chemoterapií gemcitabinem či deriváty fluoropyrimidinu (Alexakis a kol., 2004; Kamisawa a kol., 2016). Chemoterapeutika působí na S fázi buněčného cyklu a s jejich léčbou se začíná šest týdnů po operaci (Sanabria a Conlon, 2016). Jelikož adenokarcinom slinivky bývá odhalen až v terminální fázi je radikálně resekovatelných pouze 20 % nemocných, a proto se často léčí pouze chemoterapeutiky (Vincent a kol., 2011).

Adenokarcinom pankreatu je z histologického hlediska charakteristický rozsáhlým stroma, které se nachází okolo nádorových buněk a podílí se 90 % na celkovém objemu nádoru. Stroma má vliv na progresi a růst nádorové tkáně, navíc znesnadňuje prostup chemoterapeutik, což je typickým znakem pankreatického adenokarcinomu (Farrell a kol., 2009; Luo a kol., 2012).

1.1.3.1. Linie nádorových buněk Panc02

Nádorová linie Panc02 byla získána před více než třiceti lety z myšího kmene C57BL/6 po ošetření 3-methylcholatenem, který byl zaveden na bavlněném vlákně do pankreatu. Tato linie je charakteristická vysokou agresivitou a schopností metastazovat do jater a plic.

1.2. Imunitní systém

Imunitní systém je charakterizován jako skupina buněk a molekul, jejichž úlohou je rozpoznat cizí antigeny na povrchu buněk a tím spustit imunitní reakci a ochránit organismus před infekcí. Aby nedocházelo k napadení vlastních buněk imunitním systémem, musí být

tento systém schopný rozpoznat tělu vlastní povrchové struktury na buňkách od cizích či pozměněných (zmutovaných) struktur.

Imunitní systém rozdělujeme na dvě části. První částí je **vrozená (nespecifická)** imunita, jež vyvolá imunitní reakci vždy ve stejné míře, nehledě na to, kolikrát se systém s daným patogenem setkal. Druhou částí je **získaná (adaptivní/specifická)** imunita, u které se zvyšuje míra imunitní reakce v závislosti na množství opakovaného setkání s daným infekčním agens (Delves a Roitt, 2000).

Imunitní systém je schopný na povrchu nádorových buněk rozpoznat specifické antigeny, tzv. **TSA** (*tumor-specific antigens*), které se vyskytují pouze na nádorových buňkách a na normálních, zdravých buňkách je nenalezneme (Neville a kol., 1975). Díky těmto antigenům imunitní systém rychle rozpozná nádorové buňky a následně je odstraní (Dunn a kol., 2002; Zitvogel a kol., 2006; Vesely a kol., 2011). Dalšími strukturami, které se nacházejí na povrchu nádorových i normálních buněk jsou antigeny asociované s nádory, tzv. **TAA** (*tumor-associated antigens*). Mezi tyto antigeny řadíme například CEA (karcinoembryonální antigen), který je možné stanovit v krevním séru během těhotenství, ale též jsou jeho hladiny měřitelné při pankreatickém adenokarcinomu. TAA se tedy řadí mezi nádorové markery (Neville a kol., 1975).

1.2.1. Vrozená (nespecifická) imunita

Je fylogeneticky starší částí imunitního systému, jež využívá mechanismů, které jsou neměnně zapsány v genetickém kódu buňky. Tyto mechanismy slouží k rozpoznání biologických a chemických struktur na povrchu patogenu. Vrozená imunita je méně specifická, ale na druhou stranu je rychlejší než imunita získaná a reaguje vždy stejnou silou (Medzhitov a Janeway, 2000). Hlavní obrannou složku tvoří bariérové, buněčné a humorální mechanismy.

Při vstupu patogenu do organismu se jako první mechanismus uplatňuje fyziologická a anatomická bariéra, která je tvořena chemickou a mechanickou složkou (Raval a kol., 2014). Jestliže patogen překoná primární bariérovou ochranu, aktivují se buněčné a humorální obranné složky.

1.2.1.1. Buněčná složka vrozené imunity

Buněčná složka je tvořena cytotoxickými NK (*natural killer*) buňkami a fagocytujícími buňkami (makrofágy, bazofily, neutrofily, eozinofily, monocyty, žírnými a dendritickými buňkami (DCs)). Buňky schopné fagocytovat rozpoznávají pomocí svých PRRs (*pattern recognition receptors*) PAMPs (*pathogen associated molecular patterns*), které se nacházejí na povrchu cizích buněk, a DAMPs (*damage associated molecular patterns*), jenž se nacházejí na vlastních buňkách poškozených infekcí nebo vlivem fyziologických procesů (apoptóza, poškození tkáně, buněčný stres). U Gram-negativních bakterií jsou důležitými PAMPs lipopolysacharidy, u Gram-pozitivních bakterií peptidoglykany a u hub a kvasinek manany a glukany. Po rozpoznání PAMPs nebo DAMPs dochází buď k fagocytóze, opsonizaci, spuštění koagulační kaskády, aktivaci komplementu, zánětu či apoptóze (Beutler, 2004).

PRRs jsou klíčové pro imunitní odpověď a v imunoterapii se využívá vazeb různých ligandů právě na tyto receptory, díky čemuž se nastartuje imunitní odpověď. PRRs dělíme na základě jejich funkčnosti na signální, sekretované a endocytární receptory.

Signální PRRs – jsou exprimovány buňkami vrozené imunity (makrofágy, monocyty, granulocyty, DCs, NK buňky), ale najdeme jejich expresi i na buňkách získané imunity (T lymfocyty, Tregs, B lymfocyty). Tyto buňky infiltrují ve velkém množství nádorové mikroprostředí a jejich přítomnost a míra infiltrace je spojována s určitou prognózou u různých typů nádorového onemocnění (Marabelle a kol., 2014). V okamžiku, kdy dojde k navázání PAMPs nebo DAMPs na signální PRRs, dojde k zahájení signální kaskády, jejímž výsledkem je produkce cytokinů. Pod vlivem uvolněných cytokinů se aktivuje vrozená a získaná imunitní odpověď. Mezi signální PRRs řadíme například TLR (*tool-like receptor*) nebo NOD (nukleotide-binding oligomerization domain) (Krejsek a Kopecký, 2004; Neth a kol., 2005).

Sekretované PRRs – se vážou na buněčnou stěnu patogenu a takto jsou rozpoznávány fagocytárními buňkami a komplementovým systémem. Mezi sekretované PRRs řadíme SAP (*serum amyloid protein*), CRP (*C-reactive protein*) a MBL (*mannose-binding lectin*) (Krejsek a Kopecký, 2004; Neth a kol., 2005). MBL má schopnost vázat se a rozpoznat sacharidové struktury mananu na povrchu patogenů. Dochází tak k aktivaci komplementu lektinovou cestou, jenž vede k opsonizaci iC3b jednotkou komplementu s následnou stimulací fagocytózy či vzniku terminálního komplexu a následné eliminaci patogena (Dahl a kol., 2001; Jack a kol., 2001).

Endocytární PRRs – je exprimován na povrchu fagocytárních buněk (DCs, makrofágy a některými endoteliálními buňkami). V okamžiku, kdy dojde k rozpoznání cizího agens, vznikne vazba PAMPs-PRRs s následnou fagocytózou. Mezi endocytární PRRs řadíme makrofágový scavenger receptor a manózový receptor (Krejsek a Kopecký, 2004; Neth a kol., 2005). Doména CTLD2 manózového receptoru rozeznává patogeny na základě přítomnosti manózy v buněčné stěně (Martinez-Pomares, 2012).

1.2.1.2. Humorální složka vrozené imunity

Humorální složka je tvořena cytokiny (interleukiny, lymfokiny, chemokiny, interferony, TGF (*transforming growth factor*), CSF (*colony-stimulating factor*), TNF (*tumor necrosis factor*)) a složkami komplementu. Humorální složka má za úkol chránit organismus před extracelulárními bakteriemi jejich opsonizací pro fagocytující buňky (Hořejší a Bartůňková, 2009).

1.2.2. Získaná (specifická) imunita

Získaná imunita je vývojově mladší než imunita vrozená a rekombinací genových segmentů vzniká velká škála receptorů, díky nimž pak rozeznává velké množství specifických antigenů (Clark a Kupper, 2005). Specifickou imunitu můžeme rozdělit na humorální složku, tvořenou protilátkami, a buněčnou složku, reprezentovanou T a B lymfocyty a plazmatickými buňkami (Hořejší a kol., 2017). Získaná imunita je charakteristická tvorbou paměťových buněk, díky nimž při opětovném setkání se specifickým antigenem dojde k rychlejší a silnější imunitní odpovědi než při primárním setkání (Delves a kol., 2012).

B lymfocyty vznikají v kostní dřeni, kde následně i dozrávají. B lymfocyty tvoří protilátkové molekuly tzv. receptory (BCR- B buněčné receptory), které se nacházejí buď na jejich povrchu nebo jsou sekretovány. Receptory jsou tvořeny těžkými a lehkými imunoglobulinovými řetězci. Těžké řetězce vytvářejí pět základních izoform IgA, IgD, IgE, IgG a IgM (Krejsek a Kopecký, 2004). Pokud receptor B lymfocytu za přítomnosti interferonu gama (IFN- γ), produkovaného T pomocnými (Th) lymfocyty, rozezná specifický antigen (Ag), dojde k jeho rozdělení na paměťové a plazmatické lymfocyty. Paměťové buňky tvoří imunologickou paměť, což při sekundárním setkání s Ag urychluje imunitní odpověď, navíc se v těle nacházejí po celý život. Plazmatické buňky vytvářejí protilátky vůči danému specifickému Ag, které Ag opsonizují a tím iniciují ADCC (*Antibody Dependent Cell*

Cytotoxicity), ADP (*Antibody Dependent Phagocytosis*), CDC (*Complement Dependent Cytotoxicity*) a CDP (*Complement Dependent Phagocytosis*) (Bonilla a Oettgen, 2010).

T lymfocyty vznikají v kostní dřeni a následně dozrávají v brzlíku. T lymfocyty rozpoznávají antigenní peptidy prezentované v komplexu s hlavním histokompatibilním komplexem (MHC) (Clark a Kupper, 2005). Poté, co T lymfocyty rozpoznají Ag v komplexu s MHC molekulami pomocí svého receptoru, dojde k jejich diferenciaci na subpopulace pomocných T lymfocytů (Th) a cytotoxických T lymfocytů (Tc) (Bonilla a Oettgen, 2010).

Th (CD4+) lymfocyty hrají důležitou roli jak při aktivaci B lymfocytů, tak při aktivaci Tc lymfocytů (Parkin a kol., 2001). Th buňky na svém povrchu nesou CD4 molekuly a antigenní peptidy rozpoznávají v komplexu s MHC II. Th lymfocyty produkují cytokiny, díky kterým dochází k další diferenciaci Th buněk. Působení IL-12, IL-18 a INF- γ indukuje diferenciaci na Th1 lymfocyty a působením IL-4 dochází k diferenciaci na Th2 lymfocyty. Dále existují Th9, Th17 a Th23 subpopulace Th lymfocytů (Hořejší a kol., 2009).

Th1 lymfocyty se podílejí na buněčné imunitě, zejména mají vliv na NK a Tc lymfocyty. Th1 lymfocyty mají prozánětlivé účinky díky expimaci cytokinů IL-2, INF- γ a TNF- β . Jejich funkcí je zejména obrana před intracelulárními parazity (Hořejší a kol., 2009).

Th2 lymfocyty se podílejí na humorální imunitě tak, že aktivují B lymfocyty, které následně produkují protilátky. Th2 lymfocyty produkují cytokiny IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 a IL-13. Th2 buňky se podílejí na antiparazitické imunitě. V patologii je ale účinek Th2 lymfocytů často spojován s alergiemi - atopií (Krejsek a kol., 2004). Jejich funkcí je zejména obrana před extracelulárními parazity (Hořejší a kol., 2009).

Tc (CD8+) lymfocyty jsou charakteristické tím, že na svém povrchu nesou CD8 molekuly a jejich hlavním úkolem je rozeznat buňky napadené virem, parazity, pozměněné buňky stresem a nádorové buňky. Tc lymfocyty rozeznávají antigenní peptidy, které jsou prezentovány na povrchu APC buněk (DCs, makrofágy) v komplexu s MHC I. Jak z názvu vypovídá, Tc lymfocyty jsou toxické pro buňky, které na svém povrchu nesou specifický Ag pro Tc receptor. Po navázání receptoru Tc buňky na antigenní peptid dojde k uvolnění perforinu, který zapříčiní apoptózu buňky, která na svém povrchu nese cizí peptidy (Parkin a kol., 2001).

1.2.3. Imunitní paměťové buňky

Imunitní paměťové buňky jsou reprezentovány zejména **T a B lymfocyty** a **NK** buňkami, které určují rychlost a efektivitu odpovědi proti antigenu, kterému je imunitní systém sekundárně vystaven. Imunitní paměť je jedinečnou vlastností imunitního systému, jelikož dokáže ukládat informace o dřívějším stimulu a při sekundárním setkání s patogenem vyvolat silnější a rychlejší odpověď. Výhodou sekundární odezvy je, že vyžaduje menší stimul, a navíc k němu dochází i po mnoha letech od první expozice. Imunologická paměť je důležitým mechanismem, který chrání organismus před opakovanými infekcemi způsobenými viry, bakteriemi, parazity a houbami. T a B lymfocyty hrají významnou roli v autoimunitě a v navození tolerance matky k plodu. NK buňky reagují na hapteny nebo viry, což vede k vytvoření antigenně specifických paměťových buněk. Sekundární imunitní odpověď je jedním z rozhodujících faktorů úspěšné léčby během transplantace a také jsou její vlastnosti zásadní při vakcinaci. (Ratajczak a kol., 2018).

1.2.3.1. Paměťové B lymfocyty

Vystavení se infekci často vede k celoživotní imunitě vůči infikujícímu patogenu a taková ochrana je z velké části zprostředkována dvěma hlavními typy paměti B lymfocytů – konkrétně plazmatickými buňkami s dlouhou životností a paměťovými B buňkami. Buněčné a molekulární procesy, které řídí produkci plazmatických buněk s dlouhou životností a paměťových B buněk, jsou předmětem intenzivního výzkumu a mají důležité důsledky pro globální zdraví. Přestože téměř všechny dnes používané vakcíny závisí na schopnosti vyvolat paměť B buněk, dosud se nepodařilo vyvinout vakcíny proti některým z nejsmrtelnějších nemocí světa, včetně AIDS a malárie (Akkaya a kol., 2020).

Naivní B buňky se mohou diferencovat na plazmatické buňky s krátkou životností, které rychle produkují antigen-specifické protilátky. Krátkodobé plazmatické buňky se hromadí v oblastech červené dřene sleziny a dřevných provazců lymfatických uzlin a jejich životnost je obecně omezena na průběh infekce (Bortnick a Allman, 2013). Naivní B buňky se dále diferencují na plazmatické buňky s dlouhou životností a paměťové B lymfocyty (Toyama a kol., 2002). Plazmatické buňky jsou charakteristické tím, že na začátku infekce produkují velké množství IgM protilátek, které poté klesají a po prodělané infekci plazmatické buňky zanikají. Při sekundárním setkání B lymfocytů s antigenem dochází k přesmyku a vzniku vysokoafinních IgG protilátek. Tyto protilátky poté mohou indukovat aktivaci

cytotoxických buněk, komplementu nebo opsonizovat a neutralizovat. Protilátkovou odpověď zajišťují jak paměťové B lymfocyty, tak plazmatické buňky, jejichž protilátky zajišťují primární obrannou linii a pokud jsou přítomny v dostatečném množství, jsou schopny neutralizovat patogen, aniž by byly aktivovány paměťové B buňky (Kurosaki a kol., 2015). Vzniklé paměťové B buňky se nacházejí v kostní dřeni a cirkulují mezi lymfatickými uzlinami, kde jsou připravené rozpoznat antigen (Shinnakasu a Kurosaki, 2018). Paměťové B lymfocyty jsou zapojené do sekundární vrozené humorální imunitní odpovědi (Dörner a Radbruch, 2007). Sekundární vrozená humorální imunitní odpověď je po druhé expozici antigenu založena na rychlé produkci protilátek se změněnými izotypy s vysokou afinitou BCR k antigenu (Kurosaki a kol., 2015).

Většina antigenů, zejména proteiny, vyvolává **protilátkovou odpověď závislou na T lymfocytech**, antigeny jsou tedy tzv. T-závislé. Pro tento typ odpovědi je tedy nutná kooperace Th lymfocytů s B lymfocyty. Pro optimální stimulaci B lymfocytů jsou tedy nutné tři typy buněk: APC (DCs), Th a B lymfocyty. V tomto případě je nejprve antigen zachycen v tkáních APC, které poté migrují do lymfatických uzlin. V lymfatické uzlině se T lymfocyty naváží na antigen prezentovaný na povrchu DCs a dojde ke vzniku Th lymfocytů. Zároveň B lymfocyty pomocí svého antigenně specifického BCR rozpoznají antigen, který je následně pohlcen (receptorem zprostředkována endocytóza). V B lymfocytu dojde k rozštěpení antigenu na antigenní peptidové fragmenty, které jsou prezentovány v komplexu s MHC II na povrchu. Komplex MHC II s peptidovými fragmenty je rozpoznán Th lymfocyty a B lymfocyty se diferencují na plazmatické buňky a paměťové lymfocyty (Hořejší a kol., 2013). Může nastat ale i situace, kdy není nutná přítomnost APC, jelikož sami B lymfocyty zastávají dobrou funkci APC, a tak stačí pouhá spolupráce mezi Th a B lymfocyty. Tento případ bez APC tedy nastane, pokud B lymfocyt dostane signál přes svůj BCR, tím že rozezná antigen, a zároveň je nespecificky stimulován přes TLR některými bakteriálními produkty-bakteriální DNA, povrchovým lipopolysacharidem. Tím je B lymfocyt částečně aktivován a na jeho povrchu se objeví kostimulační ligandy (CD80, CD86) a komplex MHC II s navázanými fragmenty pohlčeného antigenu. Takovýto B lymfocyt funguje jako APC a stimuluje vznik klonů specifických Th lymfocytů. T-závislé antigeny tedy aktivují T lymfocyty i B lymfocyty a vytvářejí Ig reakce, ve kterých T lymfocyty napomáhají B lymfocytům dozrát. Toto zrání zahrnuje jak indukci změny izotypu, při kterém cytokiny produkované T lymfocyty kontrolují izotyp produkovaného Ig, tak aktivaci somatických mutací (Durandy a kol., 2007). Izotypové přepínání a somatické mutace jsou silně spojeny s rozvojem paměti B buněk. Paměťové

reakce, definované jako rychlá indukce vysokých hladin vysoce afinitních protilátek po sekundární expozici antigenu, jsou charakterizovány produkcí protilátek IgG, IgA a IgE a somatickými mutacemi těchto protilátek v doménách těžkých a lehkých řetězců vázajících antigen. Rozvoj paměti B buněk je rozhodující pro úspěch vakcinace proti patogenům a také předchází vzniku mnoha autoimunitních a alergických syndromů (Tangye a Tarlinton, 2009).

Naopak **protilátkovou odpověď nezávislou na T lymfocytech** vyvolají tzv. T-nezávislé antigeny, zejména pak tedy polysacharidy (LPS) a polymerní proteiny. Takové antigeny tedy vyvolají diferenciaci B lymfocytů na plasmocyty a sekreci protilátek bez spolupráce Th lymfocytů. U jedinců, jež mají poruchu funkce T lymfocytů (novorozenci se zcela nevyvinutým imunitním systémem, pacient po splenektomii, imunodeficientní jedinci), je i přes to zachována schopnost produkovat protilátky proti těmto T-nezávislým antigenům. Nezávislost na T lymfocytech není zcela úplná. B lymfocyty stimulované polymerními proteiny či polysacharidy sice nevyžadují přítomnost T lymfocytů, ale vyžadují některé cytokiny (IL-2, IL-3, IFN- γ), které jsou produkovány T lymfocyty nebo NK buňkami či mohou pocházet z jiných zdrojů. Při této reakci vznikají nízkoafinitní IgM protilátky. Somatické mutace se nevyskytují u většiny protilátkových odpovědí nezávislých na T lymfocytech. V důsledku toho je imunitní paměť vůči antigenům nezávislým na T buňkách obecně slabá (Chaplin, 2010).

Hlavní významnou vlastností paměťových B lymfocytů je schopnost dlouhodobě přežívat a při opětovném setkání s antigenem se rychle aktivovat, dělit se, dát vznik plazmatickým buňkám a zvyšovat protilátkovou afinitu. **Dlouhá životnost** paměťových B lymfocytů je zajištěna změnami metabolismu (z anabolického na katabolický, což snižuje požadavky na růstové faktory, cytokiny) a exprese anti-apoptických proteinů (BCL-2). K jejich přežívání není zapotřebí přítomnost T lymfocytů. **Rychlé a intenzivní reakce** je dosaženo díky izotypovému přesmyku v Fc oblasti imunoglobulinu a pozměněným hladinám transkripčního faktoru. **Reaktivace** paměťových B lymfocytů závisí na interakci s folikulárními T pomocnými lymfocyty (Tfh) přes komplex MHC II. Tyto oba typy buněk se nacházejí v sekundárních lymfatických tkáních a jestliže se objeví antigen, B buňka nejprve funguje jako APC a aktivuje Tfh lymfocyt, který poté aktivuje paměťový B lymfocyt (Kurosaki a kol., 2015). Bylo prokázáno, že paměťové B lymfocyty také zajišťují toleranci mezi imunitním systémem a hostitelskou mikroflórou.

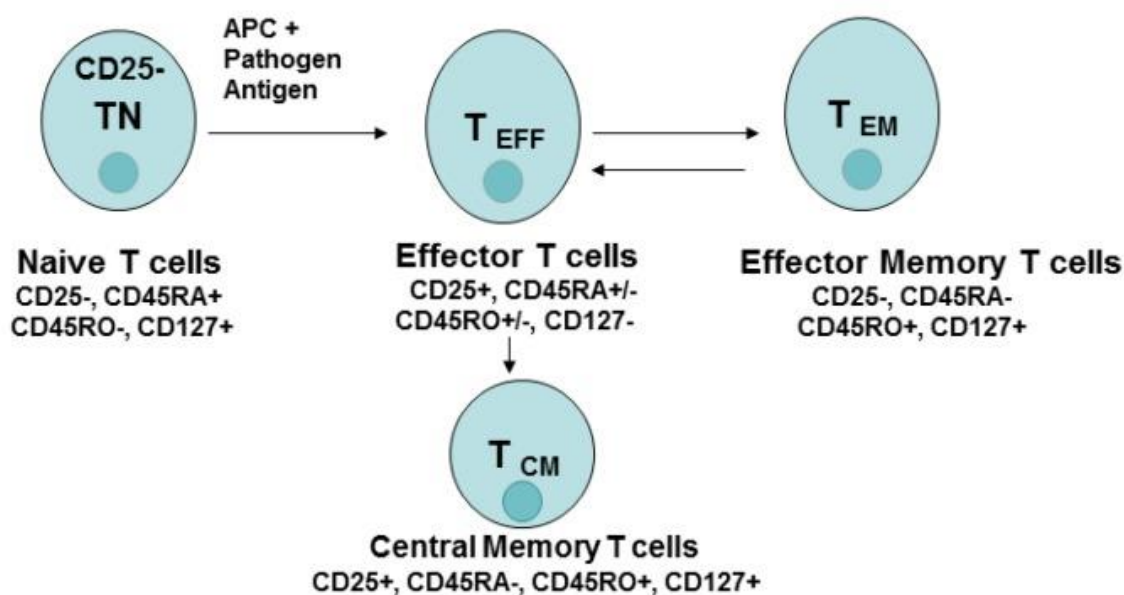
1.2.3.2. Paměťové T lymfocyty

Diferenciace a aktivace T lymfocytů je závislá na signálech přenášených třemi různými receptory, kterými jsou TCR (posílení jeho účinku pomocí ko-receptorů CD4 a CD8, které reagují na antigeny v komplexu s MHC I nebo MHC II) (Liu a Gao, 2008), kostimulační receptory a cytokinové receptory. Tyto signály řídí naivní T lymfocyty k diferenciaci na efektorové nebo paměťové T lymfocyty. Po aktivaci je cílem T lymfocytů zničit zdroj příbuzného antigenu, jako jsou infikované nebo nádorové buňky. Likvidace patogenu je uskutečňována uvolňováním cytokinů a přímým zabíjením cílových buněk (Smith-Garvin a kol., 2009). Výhodou paměťových T lymfocytů je silnější, rychlejší a účinnější reakce při opětovném setkání s antigenem, než jakou mají naivní T lymfocyty (Dutton a kol., 1998; Linsley a Ledbetter, 1993; Woodland, 2003). Výzkum Dr. Cui prokázal, že významný vliv na udržení dlouhodobé paměti T lymfocytů má IL-7 (Cui a kol., 2015).

Naivní T lymfocyty jsou aktivně udržovány ve stavu hyporeaktivity, která je charakterizována malou velikostí buněk, nízkou rychlostí proliferace a nízkým bazálním metabolismem. Naivní T buňky na svém povrchu exprimují markery CD45RA, CD62L a CCR7, jejichž úkolem je navádět T lymfocyty do lymfatických uzlin, kde se setkávají s antigeny prezentovanými na povrchu DCs. T buňky, které se již setkaly s antigenem, snižují expresi CD45RA a exprimují na svém povrchu CD45RO. 90–95 % aktivovaných T lymfocytů podstoupí apoptózu a zbývajících 5–10 % se diferencuje na paměťové T buňky (Gasper a kol., 2014; Valbon a kol., 2016).

Vzniku paměťových CD4⁺ T lymfocytů předchází setkání naivních T lymfocytů s antigenem prezentovaným APC v komplexu s MHC II a dochází k jejich aktivaci a diferenciaci na CD4⁺ efektorové T lymfocyty, které migrují do místa infekce a eliminují patogen. Z CD4⁺ efektorových T lymfocytů poté vznikají CD4⁺ efektorové paměťové T lymfocyty (Tem) a CD4⁺ centrální paměťové T lymfocyty (Tcm) (Obr. 1) (Golubovskaya a Wu, 2016).

Vývoj CD8⁺ paměťových T lymfocytů má lineárnější vývoj a postupně se z naivních CD8⁺ lymfocytů diferencují na paměťové T buňky kmenových buněk (Tscm), Tcm a Tem, které mají různé specifické povrchové markery (Tab. I) (Gattinoni a kol., 2011).



Obr. 1.: Diferenciace CD4⁺ naivních T lymfocytů a povrchové markery (Golubovskaya a Wu, 2016).

Tab. I: Shrnutí povrchových markerů T lymfocytů (Qingjun L. a kol., 2020).

	Naivní	Tscm	Tcm	Tem
CD45RA	+++	++	++	+
CD45RO	–	+	+	+
CD44	–	+/-	+++	+/-
CCR7	+++		+++	+/-
CD62L	+++	+++	+++	+/-
CD127	+ / +++	+++	+++	+
CD122	+	+++	+++	+
CD28	++	+++	+++	+
CD27	+/-		++	++
CD43	–	–	–	+/-
CD95	+/-		+/-	++
KLRG1	–	–	–	++
Perforin	–	–	–	++
GranzymeB	–	–	–	+

Výzkumy ukazují, že paměť T lymfocytů se zlepšuje v průběhu času a zdá se, že trvá nejméně 1 rok, než se paměť plně ustanoví. Rozdílné výsledky týkající se relativních příspěvků Tem a Tcm lymfocytů lze částečně vysvětlit dobou po infekci, kdy jsou buňky analyzovány. Experimenty ukázaly, že v časných dobách po infekci dominují Tem lymfocyty, zatímco v pozdějším měření převažují Tcm (Kaech a kol., 2002; Wherry a kol., 2003).

V mém výzkumu jsem se zaměřila na vznik Tcm a Tem lymfocytů, a proto se níže podrobněji zaměřím na charakteristické znaky právě těchto buněk.

1.2.3.2.1. Tcm lymfocyty

Tcm se vyskytují v sekundárních lymfoidních orgánech, především v lymfatických uzlinách a mandlích a nemají okamžitou lytickou funkci. Jejich hlavní funkcí je udržet odpověď proliferací v sekundárních lymfoidních orgánech (Harris a kol., 2002; Berenzon a kol., 2003; Hengel a kol., 2003). Na svém povrchu Tcm exprimují molekuly: CD45RO, CCR7, CD40L, CD62L, CD44, CD27, CD28, CD95, CD122 (Flynn a Gorry, 2014; Busch a kol., 2016) a LFA-1 interagující s APC (Faint a kol., 2001). Tcm navíc vylučují IL-2, IL-4, IFN γ a TNF (Rosado a kol., 2011; Sage a Mallat, 2014).

1.2.3.2.2. Tem lymfocyty

Na rozdíl od Tcm buněk se Tem buňky nacházejí především v nelymfoidních periferních tkáních, včetně plic, jater a střev, díky čemuž poskytují silnou ochrannou imunitu (Sallusto a kol., 2004; Ahlers a Belyakov, 2010). Tem lymfocyty jsou schopné recirkulace mezi krví a tkání (Zhang a Lakki, 2015) a navíc mají lytickou aktivitu (Unsoeld a Pircher, 2005). Tyto buňky exprimují vyšší hladiny receptorů odpovědných za migraci do zanícených tkání a mají silnější okamžitou, ale nikoli trvalou obranu v místě vstupu patogenu (Sallusto a kol., 2004; Geginat a kol., 2001). Na svém povrchu exprimují CD45RO, CD44, CD95, CD122 molekuly (Busch a kol., 2016; Roberts a kol., 2005) a protein KLRG1 (*killer cell lectin-like receptor G1*). Naopak na svém povrchu Tem buňky neexprimují CCR7 ani CD62L (neboli L-selektin). Tem buňky vylučují prozánětlivé cytokiny jako je IL-4, IL-5, IFN γ a také granulární perforin s granzymem B, což potvrzuje jejich cytotoxické vlastnosti (Valbon a kol., 2016; Ahlers a Belyakov, 2010). Populace CD4⁺ Tem lymfocyty, zejména s fenotypem Th1 (Borges a kol., 2015), a CD8⁺ Tem lymfocyty (Martin a kol., 2015), hrají důležitou roli u chronických bakteriálních, virových a parazitárních infekcí, protože jejich efektorové funkce jsou navíc posilovány účinkem IFN γ (Borges a kol., 2015). Bylo prokázáno, že CD4⁺ i CD8⁺ Tem buňky se účastní každé sekundární imunitní reakce a že se jejich počty liší. Výzkumy ukázaly, že CD4⁺ Tem lymfocyty expandují méně než CD8⁺ Tem lymfocyty (MacLeod a kol., 2010).

1.2.3.2.3. Mechanismy vzniku paměťových T lymfocytů

Vznik paměťových T lymfocytů je představován třemi modely, avšak nejrozšířenější je model popisující vznik paměťových T lymfocytů z efektorových T lymfocytů prostřednictvím epigenetických modifikací. Bylo zjištěno, že Dnmt3a funguje jako klíčová DNA methyltransferáza při řízení tvorby paměťových T buněk (Akondy a kol., 2017).

Po odeznění infekce efektorové T lymfocyty hynou a z některých vzniknou paměťové T lymfocyty, které se nachází v G0 buněčném cyklu, z kterého mohou kdykoli přejít do dalšího cyklu a proliferovat. Na rozdíl od toho se naivní T lymfocyty též nacházejí v G0 buněčném cyklu, ale vyžadují stimulaci DCs, aby mohly přejít do dalšího cyklu a proliferovat (Youngblood a kol., 2017).

Bylo potvrzeno, že DCs hrají velmi důležitou roli při tvorbě paměťových T lymfocytů u nádorů. CD4⁺ T lymfocyty pomáhají zvětšit počáteční odpověď CD8⁺ T lymfocytů a naprogramovat diferenciaci odpovídajících CD8⁺ T lymfocytů tak, aby generovaly dlouhotrvající ochrannou paměť (Bevan, 2004). Dále bylo zjištěno, že přítomnost CD4⁺ T lymfocytů je nutná ještě dlouho po eliminaci antigenu k udržení CD8⁺ T lymfocytů (Sun a kol., 2004; Badovinac a kol., 2006; Williams a Bevan, 2007). Další studie ukázaly, že mikroprostředí kostní dřeně podporuje udržení Ag-specifických paměťových T lymfocytů (Feuerer a kol., 2001; Mahnke a kol., 2005).

Metabolická aktivita je úzce spojena s osudem a funkcí T lymfocytů. Zvýšené hladiny L-argininu indukují v aktivovaných T buňkách metabolické změny, a navíc podporují tvorbu Tcm buněk s vysokou schopností přežití. U myších modelů bylo zjištěno, že zvýšené hladiny L-argininu zajišťovaly vyšší protinádorovou aktivitu (Geiger a kol., 2016). Nedávno bylo zjištěno, že střevní mikroflóra může podporovat tvorbu paměťových CD4⁺ T buněk u myší s nádorem a pacientů s rakovinou (Pitt a kol., 2016).

1.2.3.2.4. Účinnost paměťových T buněk proti nádorům

Vyšší protinádorová účinnost paměťových T lymfocytů může být spojena s několika faktory. Prvním faktorem je, že paměťové T lymfocyty mají nižší aktivační práh než naivní T lymfocyty, to znamená, že tyto buňky mohou reagovat na 100krát nižší dávky antigenu a reagovat rychleji v případě kostimulace. V závislosti na dávce antigenu a úrovni kostimulace vyžadují naivní T lymfocyty 6-30 hodin a více stimulace TCR k dosažení aktivace, zatímco paměťovým T lymfocytům stačí k aktivaci 0,5-2 hodiny (Lanzavecchia a Sallusto, 2001).

Druhým faktorem ovlivňujícím vyšší účinnost paměťových T lymfocytů vůči nádoru je, že paměťové T lymfocyty mají zvýšenou kapacitu migrovat do lymfatických uzlin. Jelikož na svém povrchu exprimují paměťové T buňky naváděcí receptor CCR7, je tak zajištěna migrace těchto buněk do lymfatických uzlin, kde jim DCs prezentují antigeny v komplexu s molekulami MHC (Yang a kol., 2007).

Třetím faktorem je dlouhá doba přežívání paměťových T buněk. Některé studie uvádějí, že buňky Tcm mohou přežít déle než 10 let (Yang a kol., 2007).

Čtvrtým faktorem je imunitní ochrana periferních tkání Tcm buňkami, jelikož jsou přítomny ve zdravé, nezanícené lidské kůži, plicích, tlustém střevě a tkáních děložního čípku (Yang a kol., 2007).

Posledním faktorem ovlivňujícím účinnost paměťových T lymfocytů je fakt, že Tregs přítomné v nádorovém mikroprostředí (TME) mají relativně slabou schopnost inhibovat funkce paměťových T buněk (Yang a kol., 2007).

1.2.3.3. Paměťové NK buňky

NK buňky jsou buňkami vrozeného imunitního systému a jsou důležité v ochraně hostitele proti infekcím vyvolaným patogeny a v boji proti rakovinným buňkám. Díky své schopnosti uvolňovat zánětlivé cytokiny, růstové faktory a chemokiny mohou NK buňky zabít infikované a transformované buňky (Geiger a Sun, 2016; Vivier a kol., 2011). NK buňky pocházejí z kmenových buněk kostní dřeně. Jsou charakterizovány povrchovými markery CD16 a CD56 (Niedźwiedzka-Rystwej a kol., 2013) a jejich exprese je odlišuje do dvou hlavních subpopulací: NK1 a NK2 (Niedźwiedzka-Rystwej a kol., 2012). NK1 buňky vykazují mírnou expresi CD56 a vysokou expresi CD16. NK2 vykazují vysokou expresi markeru CD56 a nulovou expresi CD16 (Vivier a kol., 2008).

Ačkoli naivní NK buňky byly dlouho považovány za vrozené lymfocyty s krátkou životností, které rychle reagují na transformované a virem infikované buňky bez předchozí senzibilizace, získané důkazy z experimentů nedávno ukázaly, že NK buňky jsou schopny si vyvinout dlouhotrvající a antigenně specifickou paměť na hapteny a viry. Kromě toho samotná cytokinová stimulace může vyvolat vznik paměťových NK buněk s dlouhou životností a funkční schopností, což vede k rostoucímu zájmu o využití paměti NK buněk pro imunoterapii rakoviny (Peng a Tian, 2017). Předpokládá se, že paměťové NK buňky jsou podmnožinou naivních NK buněk, u nichž tedy dochází ke vzniku paměti. Paměťové NK buňky exprimují na svém povrchu, podobně jako naivní NK buňky, Ly49H⁺ receptor, rozdíl je v tom, že u paměťových NK buněk je exprese receptoru mnohem vyšší. Na svém povrchu dále exprimují molekuly KLRG1, CD43, Ly6C a sníženou expresi CD27, což je fenotypově přibližuje běžným paměťovým T lymfocytům (Sun a kol., 2009). Výzkumy prokázaly citlivost paměťových NK buněk na prozánětlivé cytokiny vylučované DCs (Min-Oo a kol., 2013).

Osídlují nejen játra, ale také krev, slezinu a ledviny (Sun a kol., 2011). Byly zjištěny rozdílné markery u lidských a myších paměťových NK buněk. Lidské paměťové NK buňky exprimují markery CD94/NKG2C (Gardiner a Mills, 2016; Sun a kol., 2011; Rölle a kol., 2013), CD57 (Cerwenka a Lanier, 2016; Sun a kol., 2011), CG69, SYK, EAT2 a KIRD2DL (Cerwenka a Lanier, 2016). Paměťové NK buňky u myši exprimují THY1, LY49C nebo LY49I a CXCR6, LY49H, CD11b, KLRG1 a LY6C (O’Leary a kol., 2006).

1.2.4. Únik nádorových buněk imunitnímu systému

Primární funkcí imunitního systému je chránit organismus před vstupem patogenů a schopnost rozeznat vlastní buňky od cizích. Nádorové buňky vyvinuly mechanismy, kterými jsou však schopné unikat pozornosti imunitního systému (Hořejší a kol., 2017). Mezi hlavní mechanismy se řadí snížení prezentace povrchového antigenu, snížená exprese MHC I molekul na povrchu, produkce Fas ligandu a produkce faktorů, jež inaktivují T lymfocyty (Vinay a kol., 2015).

Snížení exprese antigenu na povrchu nádorové buňky je jednou z možností, jak se nádor brání imunitní reakci. Snížení prezentace antigenu na povrchu je docíleno mutacemi, což vede k vyšší heterogenitě, a tím pádem je ztížena schopnost imunitního systému zaměřit a zneškodnit nádorovou buňku (Vinay a kol., 2015). Navíc se selektují nádorové buňky s nižší expresí antigenů na základě klasických mechanismů přirozeného výběru, nádorové buňky s vyšší antigenitou imunitní systém zlikviduje. Dále bylo prokázáno, že u metastáz je snížená exprese antigenu vyšší než u primárního nádoru. Další možností, jak nádor snižuje prezentaci antigenu, je schopnost překrýt antigen molekulami glykokalixu, například kyselinou sialovou. Bylo prokázáno, že v nádorových buňkách je exprimováno větší množství těchto molekul než u normálních buněk (Šťastný a kol., 2015).

Dalším mechanismem, jak nádor snižuje účinek imunitního systému, je **snížení exprese MHC I molekul** na jeho povrchu, čímž uniká CTL (Villalba a kol., 2013). Jelikož ale NK buňky reagují na sníženou expresi MHC I, tak nádorové buňky exprimují pozměněné molekuly MHC Ib, jež NK buňky považují za tělu vlastní (Haynes-Gilmore a kol., 2014).

Účinnost imunitního systému může být dále snížena **zvýšenou expresí Fas ligandu** a naopak **sníženou expresí Fas receptoru**. Fas ligand i Fas receptor se nacházejí na T lymfocytech a Fas ligand (CD95L) se váže na membránový Fas receptor (CD95), čímž dojde

k apoptóze a tato funkce je důležitá k nastolení periferní tolerance. Avšak čím dál víc důkazů ukazuje na velmi důležitou úlohu v karcinogenezi a metastazování, jelikož nádorové buňky snižují expresi Fas receptoru na svém povrchu, a poté je tedy snižená citlivost k Fas ligandu na lymfocytech. Na druhou stranu zvýšená exprese Fas ligandu na nádorových buňkách zvyšuje množství vazeb na Fas receptor na lymfocytech a tím dochází k apoptóze lymfocytů (Motz a kol., 2014).

Dalším faktorem, který ovlivňuje vznik a průběh nádoru jsou **Tregs**, neboli regulační T lymfocyty vzniklé z CD4⁺ T lymfocytů (Yamagiwa a kol., 2001). Funkcí Tregs je navodit toleranci vůči vlastním antigenům, a tím zajistit prevenci autoimunitních chorob (Kretschmer a kol., 2006). Výzkumy na myších nádorových modelech prokázaly, že pokud odstraníme Tregs, dojde k zesílení protinádorové odezvy a naopak, pokud Tregs posílíme, nastane omezení protinádorové odezvy (Abbas a kol., 2012).

MDSCs (*myeloid-derived suppressor cells*) se jako Tregs podílejí na potlačení imunitní odpovědi (Parker a kol., 2015). MDSCs podporují tvorbu Tregs, čímž snižují protinádorovou odpověď, a navíc produkují IL-10, jež se podílí na potlačení zánětlivé reakce a nespecifické imunity (Perez-Gracia a kol., 2014).

Dalšími regulačními buňkami spojovanými s nádorovým onemocněním jsou **makrofágy M2**, které řadíme mezi makrofágy asociované s nádory, tzv. TAM (*tumour associated macrophages*). Stejně jako MDSCs a Tregs mají vliv na mikroprostředí nádoru. Makrofágy M2 negativně ovlivňují T buněčnou odpověď produkcí IL-10, TGF- β , VEGF (*vascular endothelial growth factor*) (Sica a kol., 2008) a prostaglandinu E2 (Italiani a kol., 2014).

Podobně je tomu i u **neutrofilů N2**, které řadíme mezi neutrofile asociované s nádorem, tzv. TAN (*tumor associated neutrophils*). Neutrofile N2 vznikají z protinádorového fenotypu N1, který se pod vlivem TGF- β vylučovaným nádorovými buňkami mění na N2 s pronádorovými vlastnostmi (Fridlender a kol., 2009).

Nádorové buňky produkují řadu molekul s inhibiční funkcí na buňky imunitního systému. Řadíme sem například CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte antigen-4*), TIM-3 (*T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3*), VEGF, PD-L1 (*programmed death-1 ligand*) a LAG-3 (*lymphocyte activation gene-3*) (Perez-Gracia a kol., 2014). VEGF je produkován Tregs a snižuje diferenciaci DCs a společně s IL-10 a TGF- β inhibuje maturaci

DCs, jež se pak stávají tolerantními proti nádorovým povrchovým antigenům (Gabrilovich a kol., 2004).

1.3. Nádorová imunoterapie

Nádorová imunoterapie je forma léčby rakoviny, která využívá sílu vlastního imunitního systému k prevenci, kontrole a odstranění rakoviny. Imunoterapie může být využívána třemi směry. Zaprvé naučit imunitní systém, aby rozpoznával a napadal specifické rakovinné buňky. Zadruhé posílit imunitní buňky, aby lépe odstranily rakovinné buňky. A zatřetí poskytnout tělu další složky pro posílení imunitní odpovědi (Gravitz, 2013).

Nádorová imunoterapie existuje v různých formách včetně cílených protilátek, vakcín proti rakovině, adoptivního přenosu buněk, virů infikujících nádor, inhibitorů kontrolních bodů, cytokinů a adjuvans. Imunoterapie je formou biologické terapie, jelikož k boji s nemocí využívá materiály z živých organismů. Některé imunoterapeutické léčby využívají genetické inženýrství k posílení schopnosti imunitních buněk bojovat proti rakovině a lze je tedy označovat jako genové terapie (Gravitz, 2013).

1.3.1. MBTA imunoterapie a její složky

Tým Dr. Ženky vytvořil MBTA terapii, jejímž úkolem je označit nádorové buňky, které na svém povrchu nenesou žádné PAMPs a jen malé množství antigenů, a tím aktivovat buňky imunitního systému, které následně zahájí likvidaci nádorových buněk. Tato imunoterapie je založena na kombinaci ligandů fagocytárních receptorů s TLR agonisty a obohacena o protilátku anti-CD40.

Ligandy fagocytárních receptorů jsou pomocí biokompatibilní kotvy pro membránu - **BAM** (*biocompatible anchor for cell membrane*) upevněny do membrány nádorových buněk, a tím je zajištěno nasměrování fagocytárních buněk k nádorové buňce. Hydrofóbní konec tvořený kyselinou olejovou umožňuje ukotvení do membrány. Hydrofilní konec tvořený polyethylenglykolem a NHS skupinou slouží k navázání ligandů fagocytárních receptorů, nebo **mananu**, který těmito ligandy vyvolá opsonizaci (Kato a kol., 2004). Manan je rozeznáván vrozenou imunitou jako PAMPs pomocí rozpustných MBL a MR receptorů, jenž se nachází na povrchu makrofágů. Poté co se naváže MBL a stimuluje se tvorba komplementu dojde k opsonizaci nádorových buněk iC3b složkou komplementu (Caisová a kol., 2018). Jelikož terapeutické aktivity jsou spojeny výhradně s touto opsonizací a myši s nádory, ale bez

receptoru iC3b (CR3) nebyly léčitelné, nepředpokládáme vyšší participace MR receptoru (Waldmannová a kol., 2016).

Jak již bylo výše zmíněno TLR se řadí mezi signální PRRs a po navázání ligandu na tento receptor dojde k zahájení signální kaskády, jejímž výsledkem je produkce cytokinů. Pod vlivem uvolněných cytokinů se aktivuje vrozená a získaná imunitní odpověď. Primárně dojde ke stimulaci zánětlivé infiltrace a buňky vrozené imunity tak mohou vstoupit do nádoru. Dříve se jako TLR ligand používal LPS, ale jelikož u něj byly zjištěny velmi silné toxické účinky (u lidí je prakticky nepoužitelný), tak se od jeho užívání upustilo a namísto LPS se dnes používá v MBTA terapii směs **resiquimodu (R-848)**, **poly(I:C)** (polyinosinická-polycitidylická kyselina) a **lipoteichové kyseliny (LTA)** (Janotová a kol., 2014; Caisová a kol., 2016; Waldmannová a kol., 2016; Caisová a kol., 2018). U myši je R-848 ligand vázán na receptor TLR 7 a u lidí na TLR 7 a TLR 8. Poly(I:C) se váže na TLR 3 a tato vazba vede k tvorbě prozánětlivých cytokinů a proteinu 1, jenž je zodpovědný za spuštění tvorby INF tyou I, který hraje zásadní roli při zánětu, imunoregulaci, rozpoznávání nádorových buněk a působí na aktivitu NK buněk a zrání DCs (Cheng a Xu, 2010). LTA se váže na TLR 2 a tato vazba vede k tvorbě prozánětlivých cytokinů TNF- α a IL- $I\beta$ s následnou aktivací komplementu a uvolněním kyslíkových nebo dusíkových radikálů z neutrofilů a makrofágů (Schwandner a kol., 1999).

Dále je MBTA terapie obohacena o agonistickou protilátku **anti-CD40**. Právě díky přidání anti-CD40 se podařilo vyléčit 80 % myši s pankreatickým adenokarcinomem Panc02 (Caisová a kol., 2018).

Tým Dr. Ženky se neustále snaží MBTA terapii zlepšovat, a tak jsem v mé diplomové práci pracovala ještě s antimetabolitem glutaminu **6-diazo-5-oxo-L-norleucinem (DON)**. DON se jako protinádorové léčivo užíval již v polovině 20. století (Coffey a kol., 1956), ale pro velkou gastrointestinální toxicitu se od jeho užívání upustilo. Aby se zabránilo toxicitě, byla vyrobena pro-léčiva DON, jenž se aktivují až v cílové tkáni. Nádorové buňky využívají glutamin jako zdroj energie pro svou proliferaci. V buňkách se glutamin metabolizuje pomocí glutaminázy a glutaminu amidotransferázy a úkolem u DON je právě tyto enzymy, potřebné pro štěpení glutaminu, blokovat (Lemberg a kol., 2018). Užití DON na myším pankreatickém adenokarcinomu vedlo ke snížení schopnosti obnovy nádoru a ke snížení hyaluronanu a kolagenu v nádorovém mikroprostředí, což zapříčinilo zvýšenou infiltraci CD8⁺ T lymfocytů a lepší prostupnost léčiv do nádoru (Sharma a kol., 2020).

1.3.1.1. Mechanismus účinku MBTA terapie

Pomocí BAM kotvy dojde k upevnění mananu do lipidové membrány nádorové buňky. V dalším kroku je manan rozpoznán MBL receptorem a dochází k aktivaci komplementu. TLR agonisté zajišťují příliv imunitních buněk do nádoru. Vzniklá iC3b složka komplementu opsonizuje nádorové buňky a buňky vrozené imunity (NK buňky, makrofágy, neutrofily) rozpoznávají daný komplement svým CR3 receptorem a zahajují likvidaci nádorových buněk svými efektorovými mechanismy. Protilátka anti-CD40 vazbou na APC (DCs, makrofágy) zesiluje jejich aktivaci a takto aktivované APC prezentují nádorové antigeny T lymfocytům v lymfatických uzlinách (Uher a kol., 2019).

Tímto mechanismem je zajištěno zapojení vrozené a získané imunitní odpovědi. Navíc TLR ligandy zvyšují zapojení získané imunity tím, že podporují tvorbu kostimulačních molekul a produkci IL-12, jež vede k navození protinádorového Th1 prostředí (Uher a kol., 2019).

2. CÍLE PRÁCE

1. Řešení otázky zvýšení účinnosti MBTA terapie.
2. Snaha zkombinovat MBTA terapii s dalším účinným terapeutikem.
3. Studium timingu nádorové imunoterapie.
4. Zavedení metod analýzy imunitní paměti a paměťových buněk.
5. Léčba rekurencí a prodloužení životnosti.
6. Studium imunitní paměti při nádorové imunoterapii založené na stimulaci signálních a fagocytárních receptorů buněk vrozené imunity s následným zapojením imunity získané.
7. Možnost použití paměťových buněk z léčených myší jako vakcinace.

3. MATERIÁL A METODY

3.1. Chemikálie

- Anti-mouse CD3 FITC (eBioscience 11-0031-82)
- Anti-mouse CD4 PE (eBioscience 17-0041-82)
- Anti-mouse CD8a PE-Cy7 FITC (eBioscience 25-0081-82)
- Anti-mouse CD44 APC (eBioscience A14713)
- Anti-mouse CD62L (L-Selectin) eFluor450 (eBioscience 48-0621-80)
- BAM₄₀₀₀, Biocompatible anchor for cell membranes, Mw 4000 (NOF Corporation, Japonsko)
- BOFES, *Bovine fetal serum* (Biowest, Francie)
- DMEM, *Dulbecco's modified eagle medium* (Biowest, Francie)
- DON, 6-diazo-5-oxo-L-norleucin (syntetizoval Dr. Majer, ÚOCHB, Praha)
- FCS, *Fetal calf serum* (Biowest, Francie)
- LTA, *Lipoteichoic acid from Bacillus subtilis* (Sigma-Aldrich, USA)
- Manan (Sigma-Aldrich, USA)
- Pan T cell Isolation Kit II (Milteneyi Biotec 130-095-130)
- Poly(I:C), *polyinosinic:polycytidylic acid* (Sigma-Aldrich, USA)
- Resiquimod (R-848) (Tocris, Velká Británie)
- RPMI₁₆₄₀ VWR (USA)
- Trypanová modř, 0,5% vodný roztok (Sigma-Aldrich, USA)

3.2. Laboratorní myši

Pro účely mého experimentu byly použity *wild-type SPF (specific pathogen free)* inbrední samice myšního kmene C57BL/6NRj zakoupené od společnosti Janvier. Myši pro experiment 3.9.1. – 3.9.3. byly chovány odděleně po jedné ve zvěřinci Parazitologického ústavu Biologického centra Akademie věd ČR v Českých Budějovicích ve sterilních plastových boxech, jenž byly uzavřeny kovovou mříží. Myši pro experimenty 3.9.4. – 3.9.7. byly chovány odděleně po jedné ve zvěřinci Katedry medicínské biologie Přírodovědecké fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích v IVC (*individually ventilated cages*) boxech. V obou místnostech s chovy měly myši v boxech podestýlku s dřevěnými hoblinami

a přístup ke sterilní vodě a krmným peletům ad libitum. Na obou těchto pracovištích byla nastavena fotoperioda 12/12 a konstantní teplota 22 °C s relativní vzdušnou vlhkostí 65 %.

3.3. Příprava buněk Panc02

V experimentu byly použity buňky pankreatického adenokarcinomu Panc02. Kultivace buněk probíhala v kultivačních lahvích DMEM obohaceném o 10 % fetální hovězí sérum (FCS) s penicilinem (100 j/ml), streptomycinem (100 µg/ml), amfotericinem B (0,25 µg/ml), merkaptoethanolem (50 µM) a L-glutaminem (2,2 mM). Kultivace probíhala v termostatu při teplotě 37 °C v atmosféře s nasycenými vodními parami s 5 % podílem CO₂. Nádorové buňky byly darovány prof. Lars Ivo Parteckem (Greifswald, Německo).

Poté, co buňky narostly a vytvořily jednovrstvou kulturu, bylo odlito médium a buňky byly 3x propláchnuty PBS a následně byla provedena trypsinizace – k Panc02 bylo přidáno 0,5 ml trypsinizační směsi (0,25 % trypsin, 0,02 % EDTA v PBS) a buňky byly inkubovány 5 minut v termostatu při 37 °C. Trypsinizační proces byl ukončen následným přidáním 50 ml DMEM s 10 % FCS. Buňky byly rozsuspendovány, přeneseny do centrifugačních zkumavek a centrifugovány (10 minut/160 g/4 °C). Po slití supernatantu byl pelet naředěn DMEM do požadovaného objemu. Následně byly buňky obarveny trypanovou modří (odlišení živých buněk od mrtvých), spočítány v Bürkerově komůrce a byla stanovena jejich koncentrace v 1 ml média. Tato koncentrace byla poté naředěna na výslednou koncentraci 4×10^6 buněk v 1 ml média.

3.4. Transplantace buněk Panc02

Myším bylo aplikováno 4×10^5 buněk Panc02 v 0,1 ml DMEM bez FCS injekční stříkačkou subkutánně (s.c.) podle typu experimentu do pravého nebo i do levého předem oholeného boku. Transplantace byla provedena na myších starých osm týdnů. V pokusu s adoptivním transferem bylo devítitýdenním myším aplikováno 1×10^5 buněk Panc02 v 0,1 ml DMEM bez FCS injekční stříkačkou s.c. do pravého předem oholeného boku.

3.5. Příprava terapeutických látek

3.5.1. Manan-BAM

Manan byl redukčně aminován po dobu pěti dnů pomocí kyanoborohydridu sodného v prostředí roztoku octanu amonného při pH 7,5 a konstantní teplotě 50 °C. Výsledný roztok manan-NH₂ byl přes noc dialyzován proti PBS při konstantní teplotě 4 °C s využitím dialyzační membrány MWCO₃₅₀₀ (Serva, Heidelberg, Německo). Následně se NHS skupina BAM sloučeniny navázala na aminovou skupinu mananu během jedné hodiny při pokojové teplotě a při pH 7,3. Reakce byla zastavena přidáním 0,1 M TRIS/HCl (pH 8,0). Nakonec byl roztok za stálého míchání dialyzován přes noc za pomoci dialyzační membrány MWCO₃₅₀₀ proti PBS při teplotě 4 °C. Jako výsledný roztok byl získán 0,2 mM roztok manan-BAM v PBS, jenž byl následně zmražen při teplotě -20 °C.

3.5.2. MBTA

Ze sloučeniny R-848 byl nejdříve pomocí ekvivalentu 3,5 % HCl připraven hydrochlorid, z důvodu zvýšení jeho rozpustnosti. V dalším kroku byl do roztoku R-848.HCl přidán 0,2 mM roztok manan-BAM v PBS + poly(I:C) a LTA. V posledním kroku byla přidána protilátka anti-CD40. Takto byl připraven roztok, který obsahuje 0,5 mg R-848, 0,5 mg poly(I:C), 0,5 mg LTA a 0,4 mg anti-CD40 v 1 ml 0,2 mM roztoku manan-BAM v PBS.

3.6. Měření velikosti nádorů

Nádory byly měřeny ob den ode dne 0 digitálním posuvným měřidlem. Byly naměřeny hodnoty A a B, přičemž hodnota A představovala hodnotu nejdelší části nádoru a hodnota B představovala výšku v nejvyšším bodě nádoru v mm. Objem nádorové masy byl vypočten podle vzorce:

$$V = \frac{\pi}{6} AB^2$$

3.7. Výpočet plochy pod křivkou

Pro výpočet plochy pod křivkou AUC (*area under the curve*) byl použit následující vzorec:

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

Po zjednodušení:

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

Hodnota x byla vypočítána u každé myši pro každý den a tyto hodnoty byly následně sečteny. V dané skupině se takto získalo šest hodnot ploch pod jednotlivými křivkami. Rozdíly mezi těmito soubory šesti čísel se pak vyhodnocovaly statistickou významností viz níže.

3.8. Statistické zhodnocení dat

Ke statistickému zhodnocení naměřených hodnot a následnému vytvoření grafů byly použity programy Microsoft Excel 365 a Statistica 13. Byly vypočítány hodnoty AUC křivek růstu nádorů u jednotlivých myší. Následně použitými testy v programu Statistica byla one-way ANOVA s Tukey post-hoc testem, Studentův T-test a neparametrická ANOVA s Kruskal-Wallis testem. Grafy přežití byly vyhodnoceny Log-Rank testem. Rozptyl hodnot byl v grafech vyjádřen standardní chybou průměru - SEM (*standard error of the mean*).

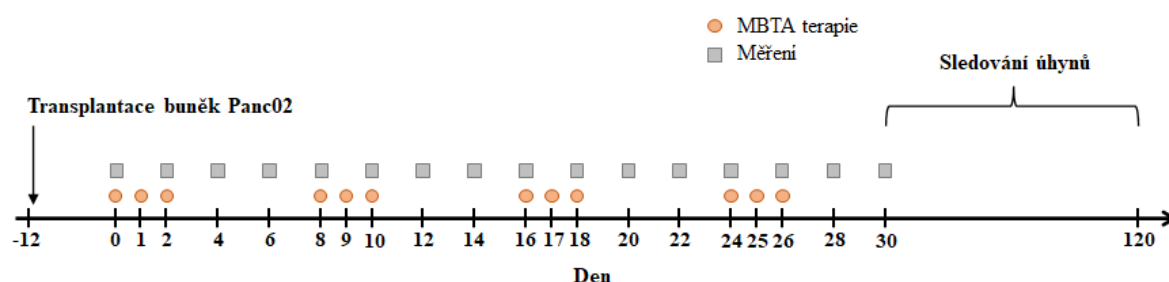
3.9. Experimenty

3.9.1. Terapie metastatického pankreatického adenokarcinomu rozdílným množstvím MBTA

Tento experiment byl proveden na čtyřadvaceti samicích myšího kmene C57BL/6NRj. Ve věku osmi týdnů bylo myším s.c. transplantováno 400 000 buněk Panc02 v 0,1 ml DMEM na pravý i levý bok, kdy pravý nádor představoval primární nádor a levý představoval metastázi. Dvanáctý den od transplantace buněk (den 0) byly myši náhodně rozděleny do čtyř skupin po šesti myších (A-D) a byla zahájena terapie. Do pravého i levého nádoru bylo injikováno MBTA terapeutikum celkem dvanáctkrát ve čtyřech pulsech a měření velikosti nádorů probíhalo každý druhý den až do dne 30. Do dne 120 probíhalo sledování úhynů myší, jež bylo zaznamenáno a graficky vyhodnoceno. V následující tabulce (Tab. II) je zaznamenáno rozdělení myší do skupin, způsob a místo aplikace terapeutika a množství a typ terapeutické látky. Pro lepší přehled byla vytvořena časová osa znázorňující rozpis dnů, kdy bylo podávané terapeutikum a prováděné měření (Obr. 2).

Tab. II: Znázornění rozdělení do skupin, místo a způsob aplikace terapeutika, množství a typ terapeutické látky.

Skupina	Místo a způsob aplikace	Množství terapeutika (μl)	Terapeutikum
A	Pravý nádor, i.t.	50	MBTA
	Levý nádor, i.t.	50	MBTA
B	Pravý nádor, i.t.	25	MBTA
	Levý nádor, i.t.	25	MBTA
C	Pravý nádor, i.t.	50	MBTA
	Levý nádor, i.t.	X	X
D	Pravý nádor, i.t.	50	PBS
	Levý nádor, i.t.	X	X



Obr. 2: Časová osa aplikace MBTA terapeutika a měření velikosti nádorů.

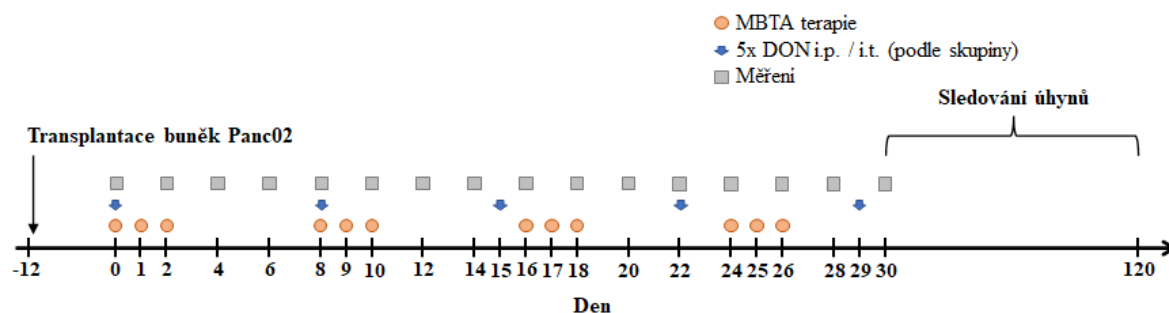
3.9.2. Terapie pankreatického adenokarcinomu kombinací MBTA s DON aplikovaným i.t. a i.p.

Druhý experiment byl proveden na čtyřadvaceti samicích myšího kmene C57BL/6NRj. Ve věku osmi týdnů bylo myším s.c. transplantováno 400 000 buněk Panc02 v 0,1 ml DMEM na pravý i levý bok, kdy pravý nádor představoval primární nádor a levý nádor představoval metastázi. Dvanáctý den od transplantace buněk (den 0) byly myši náhodně rozděleny do čtyř skupin po šesti myších (A-D) a byla zahájena terapie. V následující tabulce (Tab. III) je zaznamenáno rozdělení myši do skupin, způsob a místo aplikace terapeutika a množství a typ terapeutické látky. Do nádorů bylo dle tabulky injikováno MBTA terapeutikum celkem dvanáctkrát ve čtyřech pulzech a terapie MBTA byla doplněna o terapii s DON, který byl injikován celkem pětkrát podle skupiny buď i.t. nebo i.p.. Měření velikosti

nádorů probíhalo každý druhý den až do dne 30. Do dne 120 probíhalo sledování úhynů myší, jenž bylo zaznamenáno a graficky vyhodnoceno. Pro lepší přehled byla vytvořena časová osa (Obr. 3) znázorňující rozpis dnů, kdy bylo podávané terapeutikum a prováděné měření.

Tab. III: Znázornění rozdělení do skupin, místo a způsob aplikace terapeutika, množství a typ terapeutické látky.

Skupina	Místo aplikace a způsob	Množství terapeutika (μl)	Terapeutikum
A	Pravý nádor, i.t.	50	MBTA
	i.p.	100	4 mg DON/ml PBS
B	Pravý nádor, i.t.	50	MBTA
	Levý nádor, i.t.	50	8 mg DON/ml PBS
C	Pravý nádor, i.t.	50	MBTA
	Levý nádor, i.t.	X	X
D	Pravý nádor, i.t.	50	PBS
	Levý nádor, i.t.	X	X



Obr. 3: Časová osa aplikace MBTA v kombinaci s DON a měření velikosti nádorů.

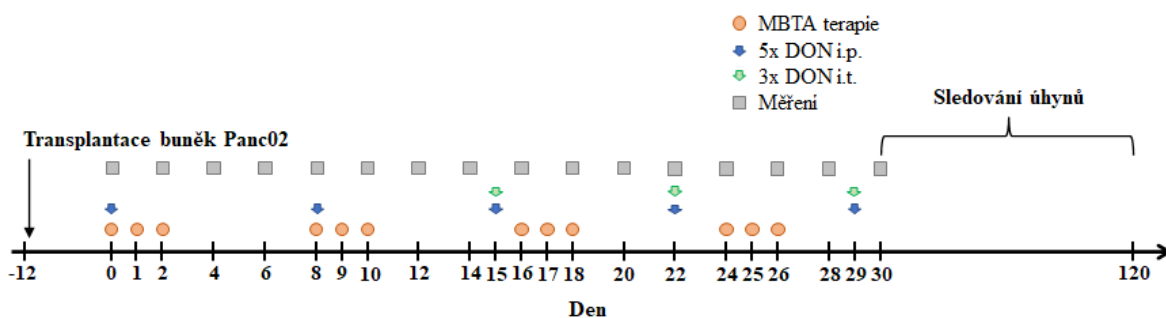
3.9.3. Terapie pankreatického adenokarcinomu MBTA a MBTA v kombinaci s DON v různých aplikačních schématech

Třetí experiment byl proveden na čtyřiaadvaceti samicích myšího kmene C57BL/6NRj. Ve věku osmi týdnů bylo myším s.c. transplantováno 400 000 buněk Panc02 v 0,1 ml DMEM na pravý i levý bok, kdy pravý nádor představoval primární nádor a levý představoval metastázi. Dvanáctý den od transplantace buněk (den 0) byly myši náhodně rozděleny do čtyř skupin po šesti myších (A-D) a byla zahájena terapie. V následující tabulce (Tab. IV) je

zaznamenáno rozdělení myší do skupin, způsob a místo aplikace terapeutika a množství a typ terapeutické látky. Do nádorů bylo dle tabulky injikováno MBTA terapeutikum celkem dvanáctkrát ve čtyřech pulsech a ve skupině B a C byla terapie MBTA ještě doplněna o DON, který byl injikován u skupiny B třikrát a u skupiny C pětkrát. Měření velikosti nádorů probíhalo každý druhý den až do dne 30. Do dne 120 probíhalo sledování úhynů myší, jenž bylo zaznamenáno a graficky vyhodnoceno. Pro lepší přehled byla vytvořena časová osa (Obr. 4) znázorňující rozpis dnů, kdy bylo podávané terapeutikum a prováděné měření.

Tab. IV: Znázornění rozdělení do skupin, místo a způsob aplikace terapeutika, počet dávek, množství a typ terapeutické látky.

Skupina	Místo aplikace a způsob	Počet dávek	Množství terapeutika (μl)	Terapeutikum
A	Pravý nádor, i.t.	12	25	MBTA
	Levý nádor, i.t.	12	25	MBTA
B	Pravý nádor, i.t.	12	25	MBTA
	Pravý nádor, i.t.	3	25	8 mg DON/ml MBTA
	Levý nádor, i.t.	12	25	MBTA
	Levý nádor, i.t.	3	25	8 mg DON/ml MBTA
C	Pravý nádor, i.t.	12	25	MBTA
	Levý nádor, i.t.	12	25	MBTA
	i.p.	5	100	4 mg DON/ml MBTA
D	Pravý nádor, i.t.	12	50	PBS
	Levý nádor, i.t.	X	X	X



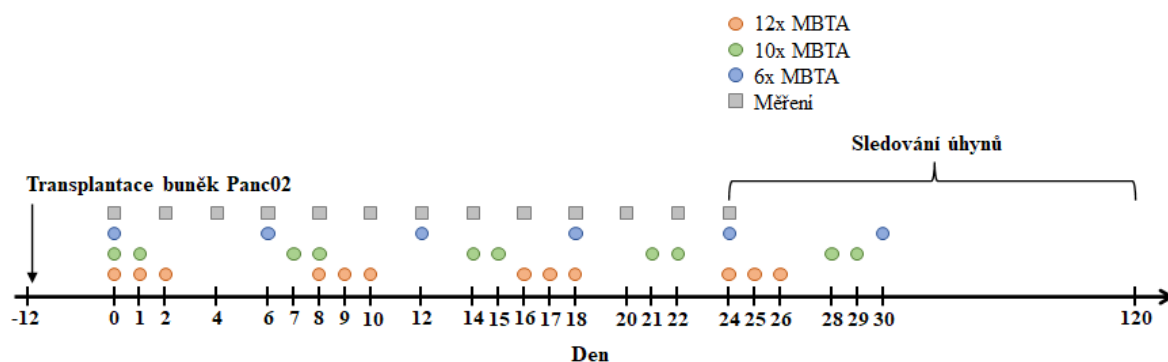
Obr. 4: Časová osa aplikace MBTA terapeutika v kombinaci s DON, možnosti dávkování a jeho časování a měření velikosti nádorů.

3.9.4. Srovnání různých režimů aplikace MBTA při terapii pankreatického adenokarcinomu

Čtvrtý experiment byl proveden na čtyřiceti samicích myšího kmene C57BL/6NRj. Ve věku osmi týdnů bylo myším s.c. transplantováno 400 000 buněk Panc02 v 0,1 ml DMEM na pravý bok. Dvanáctý den od transplantace buněk (den 0) byly myši náhodně rozděleny do čtyř skupin po osmi (A, B, C, D) a byla zahájena terapie. Do skupiny CO bylo zařazeno osm myší, jejichž nádory dvanáctý den byly moc malé nebo moc velké. V následující tabulce (Tab. V) je zaznamenáno rozdělení myší do skupin a způsob aplikace, počet podaných dávek, množství a typ terapeutika. Do nádorů bylo dle tabulky injikováno MBTA terapeutikum v rozdílných pulsech. CO skupina byla léčena na základě velikost nádoru. Měření velikosti nádorů probíhalo každý druhý den až do dne 24. Do dne 120 probíhalo sledování úhynů myší, jenž bylo zaznamenáno a graficky vyhodnoceno. Pro lepší přehled byla vytvořena časová osa (Obr. 5) znázorňující rozpis dnů, kdy bylo podáváné terapeutikum a prováděné měření.

Tab. V: Znázornění rozdělení myší do skupin, způsob aplikace, počet dávek, množství a typ terapeutické látky.

Skupina	Způsob aplikace	Počet dávek	Množství	Terapeutikum
A	i.t.	12	50 μ l	MBTA
B	i.t.	10	50 μ l	MBTA
C	i.t.	6	50 μ l	MBTA
CO	i.t.	6	1 μ l / 2 mm ³	MBTA
D	i.t.	12	50 μ l	PBS



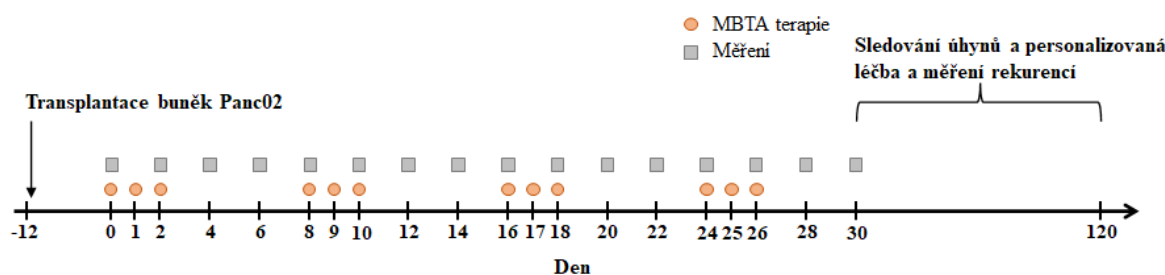
Obr. 5: Časová osa aplikace MBTA v rozdílných režimech a měření velikosti nádorů.

3.9.5. Terapie rekurencí a prodloužení přežití

Pátý experiment byl proveden na devětatřiceti samicích myšího kmene C57BL/6NRj. Ve věku osmi týdnů bylo myším s.c. transplantováno 400 000 buněk Panc02 v 0,1 ml DMEM na pravý bok. Dvanáctý den od transplantace buněk (den 0) byly myši náhodně rozděleny do dvou skupin (A, B) a byla zahájena terapie. Do skupiny A bylo zařazeno třicet jedna myši a skupina B čítala osm myši. V následující tabulce (Tab. VI) je zaznamenáno rozdělení myši do skupin, způsob aplikace, množství a typ terapeutika. Do nádorů bylo dle tabulky injikováno MBTA terapeutikum celkem dvanáctkrát ve čtyřech pulzech. Měření velikosti nádorů probíhalo každý druhý den až do dne 30. Pro lepší přehled byla vytvořena časová osa (Obr. 6) znázorňující rozpis dnů, kdy bylo podávané terapeutikum a prováděné měření. V den 64 byly myši zkontrolovány a u myši, u nichž nádory perzistovaly nebo se znovu objevily byla zahájena v den 71 léčba personalizovaným způsobem MBTA terapií, jak je zobrazeno ve výsledcích.

Tab. VI: Znázornění rozdělení myši do skupin, způsob aplikace, množství a typ terapeutické látky.

Skupina	Způsob aplikace	Množství	Terapeutikum
A	i.t.	50 μ l	MBTA
B	i.t.	50 μ l	PBS



Obr. 6: Časová osa aplikace MBTA terapeutika a měření velikosti nádorů.

3.9.6. Analýza subpopulací paměťových imunitních buněk ve splenocytech myši léčených MBTA terapií

V šestém experimentu bylo analyzované množství paměťových buněk ve splenocytech pěti léčených myši MBTA terapií ze skupiny A z experimentu 3.9.5 a pěti kontrolních myši, které byly na začátku pokusu dány stranou a nebyl na nich prováděn žádný experiment.

Analýza subpopulací probíhala po čtyřech měsících od poslední aplikace MBTA terapeutika myším ze skupiny A. Pro tento experiment byly použity myši, u nichž nebyla pozorována perzistence podkožního nádoru nebo výskyt rekurence. Stanovení subpopulací paměťových buněk probíhalo na průtokovém cytometru FACS NovoCyte (Agilent, USA). Zjišťovány byly subpopulace paměťových buněk T lymfocytů CD4⁺ a CD8⁺, které na svém povrchu nesou specifické markery.

3.9.6.1. Odběr a zpracování splenocytů

Ze skupiny A bylo vybráno pět myší a pět kontrolních myší, které byly na začátku pokusu dány stranou. Tyto myši byly usmrceny cervikální dislokací. Následně byla z každé myši vyjmuta slezina a vložena do vychlazeného RPMI média. Slezina byla z RPMI média přenesena kapátkem na sterilní sítko a sterilními nástroji byla rozstříhávána na malé kousky a jemně rozsuspendována do petriho misky za stálého promývání RPMI médiem, aby nedošlo k vyschnutí buněk. Získané splenocyty byly přeneseny do předem připravené zkumavky a centrifugovány (5 minut/1000 rpm/4 °C). Po centrifugaci následovalo slití supernatantu a buňky byly rozsuspendovány v 1 ml lyzačního pufru (0,84 % NH₄Cl), který byl předem inkubován v termostatu při teplotě 37 °C, čímž bylo docíleno lýze erytrocytů. Po 2 minutách byla lýza erytrocytů zastavená přidáním 10 ml RPMI média a objem v jednotlivých zkumavkách byl změřen. Do vedle připravených 1 ml Eppendorf zkumavek bylo přidáno v poměru 10 μ l buněk:45 μ l RPMI média:45 μ l trypanové modři a následně byly buňky počítány v Bürkerově komůrce.

3.9.6.2. Příprava splenocytů pro analýzu na průtokovém cytometru (FACS)

Buňky byly rozděleny po 0,5 milionu buněk do FACS zkumavek. Objem byl doplněn do 3 ml FACS Flow (FF) roztokem (PBS/1 % BOFES) a následovala centrifugace (5 minut/1000 rpm/4 °C). Supernatant byl slit a bylo přidáno 1 ml FF a opět centrifugováno (5 minut/1000 rpm/4 °C). Supernatant byl opět slit a do jednotlivých zkumavek byly přidány fluorescenčně značené protilátky v příslušném ředění (Tab. VII). Jedna zkumavka neobsahovala žádné fluorescenčně značené protilátky a měla úlohu nebarvené kontroly. Zkumavky byly zvortexovány a inkubovány 20 minut v lednici ve tmě. Do zkumavek bylo napipetováno 2 ml FF a centrifugováno (5 minut/1000 rpm/4 °C). Supernatant byl slit a objem ve zkumavkách byl doplněn do 300 μ l pomocí FF a následovalo měření na průtokovém cytometru.

Tab. VII: Fluorescenčně značené protilátky použité pro analýzu subpopulací T lymfocytů a jejich ředění.

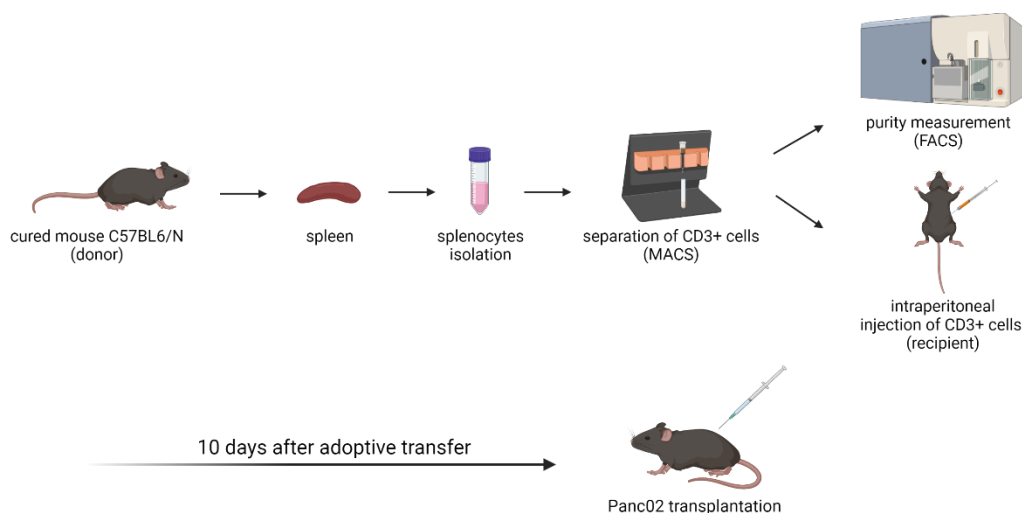
Protilátka	Lymfocyty, které jsou značeny	Ředění
Anti-mouse CD3 FITZ	CD3+	100x
Anti-mouse CD4 PE	CD4+	200x
Anti-mouse CD8a PE-Cy7	CD8+	400x
Anti-mouse CD44 APC	Tem, Tcm	50x
Anti-mouse CD62L (L-selectin) e FLuor	Naivní, Tcm	50x

3.9.6.3. Analýza paměťových buněk pomocí FACS

Měření bylo provedeno v softwaru Novoxpress (verze 1.4.1.) a bylo zaznamenáno 30 000 událostí.

3.9.7. Adoptivní transfer T lymfocytů a vliv na uchycení buněk Panc02

V sedmém experimentu byl hlavním cílem přenos imunitní paměti naivním myším s následnou transplantací Panc02, čímž byla ověřena schopnost paměti T lymfocytů z vyléčených myší vůči Panc02. Do tohoto experimentu byly použity buňky ze splenocytů léčených myší ze skupiny A z experimentu 3.9.5.. Analýza CD3+ T lymfocytů probíhala po čtyřech měsících od poslední aplikace MBTA terapeutika myším. U části myší ze skupiny A byl pozorován výskyt ulcerózní dermatitidy. Aby nedošlo ke zkreslení výsledků, byly do tohoto pokusu vybrány myši bez projevu ulcerózní dermatitidy a myši, u nichž nebyla pozorována perzistence podkožního nádoru nebo výskyt rekurence. K získání co nejčistšího vzorku pro transplantaci byla použita negativní magnetická separace za použití magnetických kuliček Pan T cell Isolation kitu II. Tento kit obsahuje směs kuliček konjugovaných s monoklonálními protilátkami specifickými pro všechny buněčné populace kromě CD3+ T lymfocytů. Stanovení čistoty buněk probíhalo na průtokovém cytometru FACS NovoCyte (Agilent, USA). Postup je znázorněn na obrázku (Obr. 7).



Obr. 7: Jednotlivé kroky vedoucí k adoptivnímu transferu buněk.

3.9.7.1. Odběr a zpracování splenocytů

Ze skupiny A byly vybrány tři myši bez výskytu ulcerózní dermatitidy či perzistujícího nádoru a tyto myši byly následně usmrceny cervikální dislokací. Dále byla z každé myši vyjmuta slezina a vložena do vychlazeného RPMI média. Slezina byla z RPMI média přenesena kapátkem na sterilní sítko, rozstříhána na malé kousky a jemně rozsuspendována do petriho misky za stálého promývání RPMI médiem, aby nedošlo k vyschnutí buněk. Získané splenocyty byly přeneseny do předem připravené zkumavky a centrifugovány (5 minut/1000 rpm/4 °C). Po centrifugaci následovalo slítí supernatantu a buňky byly rozsuspendovány v 1 ml lyzačního pufru (0,84 % NH_4Cl), který byl vytemperován na 37 °C, čímž bylo docíleno lýze erytrocytů. Po 2 minutách byla lýza erytrocytů zastavena přidáním 10 ml RPMI média. Do vedle připravených 1 ml Eppendorf zkumavek bylo přidáno v poměru 10 μl buněk:45 μl RPMI média:45 μl trypanové modři a následně byly buňky počítány v Bürkerově komůrce. Zbytek buněk ve zkumavkách byl centrifugován (5 minut/ 1000 rpm/4 °C).

3.9.7.2. Negativní magnetická separace (MACS)

Buňky byly rozsuspendovány v MACS pufru (100 ml PBS + 2mM EDTA + 2 % BOFES) v poměru 40 μl MACS na každých 10^7 buněk a následně byla přidána směs protilátek s navázaným biotinem (*Biotin-Antibody cocktail*) v poměru 10 μl na každých 10^7 buněk. Směs byla promíchána a inkubována 5 minut v lednici. Po inkubaci byl přidán opět MACS pufr, tentokrát v poměru 30 μl na každých 10^7 buněk a magnetické kuličky s navázanou protilátkou

proti biotinu (*Anti-Biotin MicroBeads*) v poměru 20 μ l na každých 10^7 buněk. Směs byla promíchána a inkubována 10 minut v lednici. Následně byla umístěna kolonka pro magnetickou separaci do magnetického stojanu a kolonka byla promyta 3 ml MACS pufru. Po inkubaci byly vzorky vyndány z lednice a objem byl MACS pufrem doplněn na 500 μ l. Následně byly jednotlivé vzorky přeneseny na kolonky a jelikož se jednalo o negativní selekci, tak CD3⁺ buňky procházely kolonkou do připravené 15 ml zkumavky. Každá kolonka byla ještě propláchnuta 3 ml MACS pufru. Takto vyseparované CD3⁺ lymfocyty byly obarveny trypanovou modří a spočítány v Bürkerově komůrce.

3.9.7.3. Příprava buněk pro analýzu na FACS

Aby byla zjištěna úspěšnost a čistota provedené MACS, byla nutná příprava buněk na průtokovou cytometrii. Získané buňky byly rozděleny po 0,5 milionu do FACS zkumavek. Objem byl doplněn do 3 ml FF roztokem a následovala centrifugace (5 minut/1000 rpm/4 °C). Supernatant byl slit a byl přidán 1 ml FF a opět bylo centrifugováno (5 minut/1000 rpm/4 °C). Supernatant byl opět slit a do jednotlivých zkumavek byla přidána fluorescenčně značená protilátka v příslušném ředění pro detekci CD3⁺ lymfocytů (Anti-mouse CD3 FITZ, ředění 100x). Jedna zkumavka neobsahovala žádné fluorescenčně značené protilátky a měla úlohu nebarvené kontroly. Zkumavky byly zvortexovány a inkubovány 20 minut v lednici ve tmě. Do zkumavek bylo přidáno 2 ml FF a centrifugováno (5 minut/1000 rpm/4 °C). Supernatant byl slit a výsledný objem byl doplněn do 300 μ l FF a následovalo měření na průtokovém cytometru. Poté co jsme zjistili čistotu v jednotlivých slezinách byly vzorky slity pro získání co největšího množství buněk a bylo provedeno opět přeměření čistoty.

3.9.7.4. Stanovení čistoty buněk pomocí FACS

Měření bylo provedeno v softwaru Novoxpress (verze 1.4.1.) a bylo zaznamenáno 30 000 událostí.

3.9.7.5. Adoptivní transfer vyizolovaných T lymfocytů

Poté co byla stanovena čistota CD3⁺ T lymfocytů jednotlivých vzorků pomocí průtokového cytometru byly tyto tři vzorky smíchány dohromady, byla opět změřena čistota vyizolovaných CD3⁺ T lymfocytů smíchaného vzorku a buňky byly spočítány v Bürkerově komůrce (10 μ l buněk:45 μ l RPMI média:45 μ l trypanové modři). Následně byla připravena suspenze 10 milionu buněk/ml RPMI bez séra pro injekci do recipientů. Dvacet naivních

samic myšího kmene C57BL/6NRj bylo rozděleno po pěti do čtyř skupin A, B, C, D a ve věku devíti týdnů jim byly i.p. transplantovány izolované subpopulace T lymfocytů v rozdílném množství dle tabulky (Tab. VIII).

Tab. VIII: Znázornění rozdělení myší do jednotlivých skupin a množství injikovaných CD3+ T lymfocytů.

Skupina	Množství buněk
A	4 miliony/myš
B	2 miliony/myš
C	1 milion/myš
D	X

3.9.7.6. Transplantace Panc02

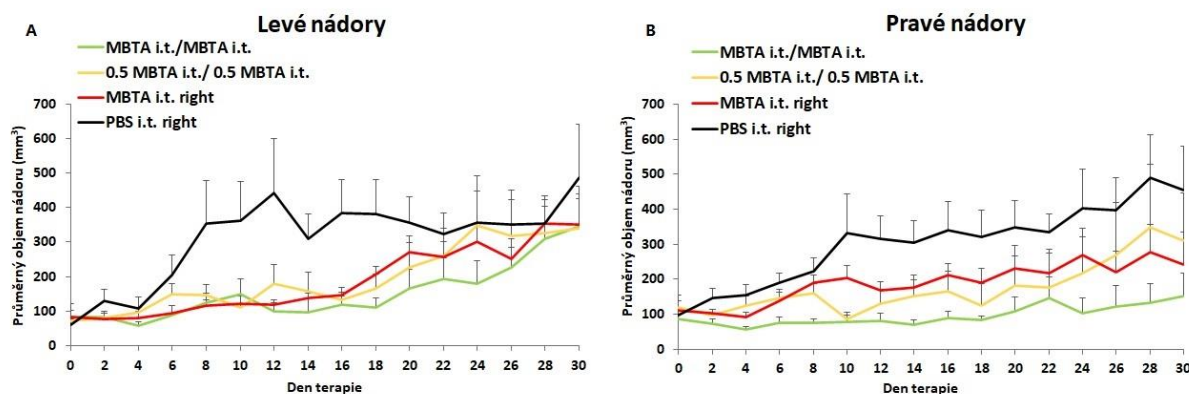
Deset dní po adoptivním transferu vyizolovaných CD3+ lymfocytů bylo všem myším s.c. transplantováno 100 000 buněk Panc02 v 0,1 ml DMEM na pravý bok a byl pozorován růst nádorů.

4. VÝSLEDKY

4.1. Terapie metastatického pankreatického adenokarcinomu rozdílným množstvím MBTA

Cílem tohoto experimentu bylo zjistit nejúčinnější množství MBTA terapeutika na léčbu pravého nádoru a metastázi.

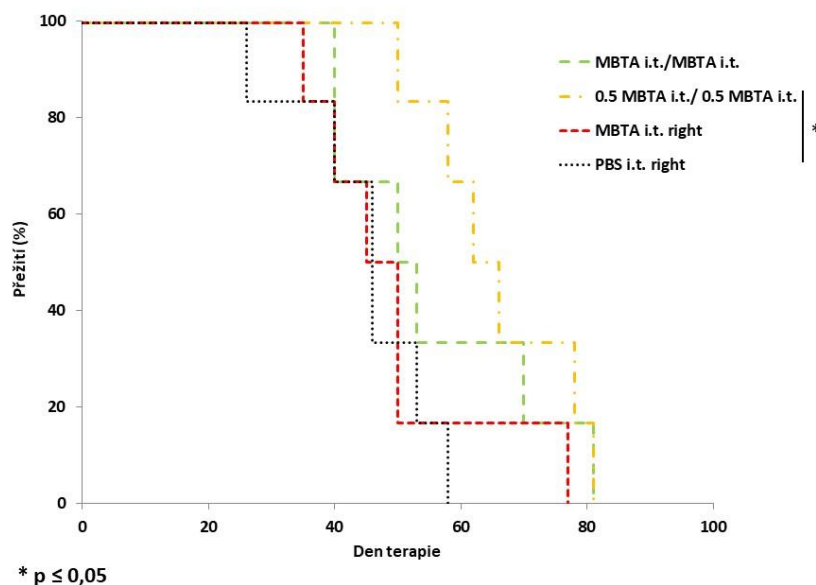
Graf A (Obr. 8-A) znázorňuje velikost levých nádorů jednotlivých skupin ve dnech, kdy probíhalo jejich měření a graf B (Obr. 8-B) zobrazuje velikost pravých nádorů jednotlivých skupin ve dnech, kdy probíhalo měření. Skupina léčená celou dávkou MBTA terapie i.t. do pravého nádoru, tedy 50 μ l, vykazovala oproti skupinám léčeným poloviční dávkou, tedy 25 μ l, nepatrně lepší výsledky. Statistická významnost (hodnota p) levého a pravého nádoru byla vyhodnocena pomocí testu one-way ANOVA a následoval Tukey post-hoc test. Rozdíly mezi skupinami nebyly statisticky významné.



Obr. 8: Vliv rozdílného množství MBTA terapie na léčbu pankreatického adenokarcinomu a jeho metastáz.

Poté, co byla terapie dokončena, byla pozorována doba přežití jednotlivých myší ve skupinách. Zjištěné hodnoty byly zaznamenány do grafu (Obr. 9). Skupina léčená poloviční dávkou MBTA terapie vykazovala delší přežití než kontrolní skupina (PBS). Vyléčit se nepodařilo žádnou myš, ale nejdéle (81 dní) přežily myši ze skupiny léčené pomocí plné dávky 50 μ l a poloviční dávky 25 μ l MBTA do pravého i levého nádoru i.t.. Statistická významnost (hodnota p) byla vyhodnocena pomocí Log-Rank testu.

Podání poloviční dávky MBTA vykazovalo statistickou významnost oproti kontrolní skupině. Lze tedy zhodnotit, že podání poloviční dávky MBTA je o něco účinnější než podání plné dávky MBTA.



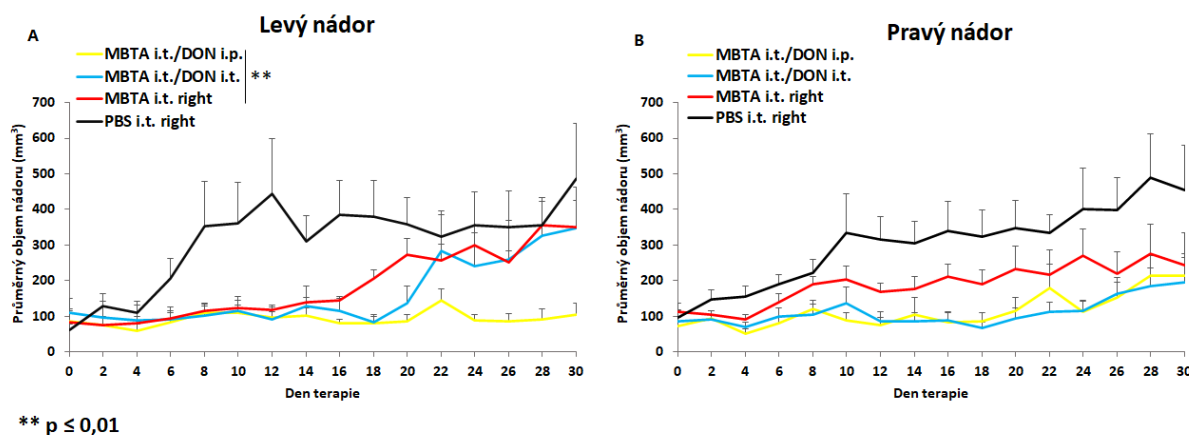
Obr. 9: Vliv podání rozdílného množství MBTA terapeutika na délku přežití myši.

4.2. Terapie pankreatického adenokarcinomu kombinací MBTA s DON aplikovaným i.t. a i.p.

Cílem tohoto experimentu bylo zjistit, jaký vliv na léčbu nádoru, metastáze a dobu přežití má podání MBTA v kombinaci s DON i.t. nebo i.p..

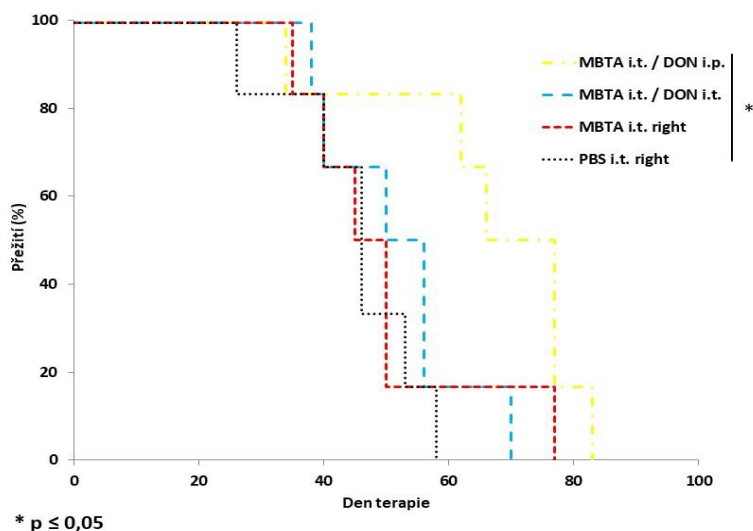
Graf A (Obr. 10-A) znázorňuje velikost levých nádorů jednotlivých skupin ve dnech, kdy probíhalo jejich měření a graf B (Obr. 10-B) zobrazuje velikost pravých nádorů jednotlivých skupin ve dnech, kdy probíhalo měření. Při léčbě pravého nádoru nebyly pozorovány žádné statistické významnosti ve velikost nádoru při použití MBTA v kombinaci s DON i.t. nebo i.p. či při použití pouze MBTA. Léčba levého nádoru, představujícího metastázi, ukazuje lepší účinnost při použití MBTA v kombinaci DON i.p. oproti použití pouze MBTA terapie, což bylo také dokázáno statistickou významností. Léčba pravého nádoru neprokázala žádný výrazný vliv na redukci nádorového růstu rozdílnými dávkami terapeutika. Statistická významnost (hodnota p) pravého nádoru byla vyhodnocena pomocí testu one-way ANOVA a následoval Tukey post-hoc test. Jelikož data levého nádoru neměla

normální rozdělení, byla statistická významnost levého nádoru provedena neparametrickou ANOVA- Kruskal-Wallis testem.



Obr. 10: Vliv rozdílného podání MBTA v kombinaci s DON podávaném i.t. a i.p. na léčbu pankreatického adenokarcinomu a jeho metastáze.

Poté, co byla terapie dokončena, byla pozorována doba přežití jednotlivých myší ve skupinách. Zjištěné hodnoty byly zaznamenány do grafu (Obr. 11). Skupina léčená MBTA v kombinaci s DON i.p. vykazovala významně delší přežití než kontrolní skupina (PBS). Vyléčit se nepodařilo žádnou myš, ale nejdéle (83 dní) přežily myši ze skupiny MBTA v kombinaci s DON i.p.. Statistická významnost (hodnota p) byla vyhodnocena pomocí Log-Rank testu.



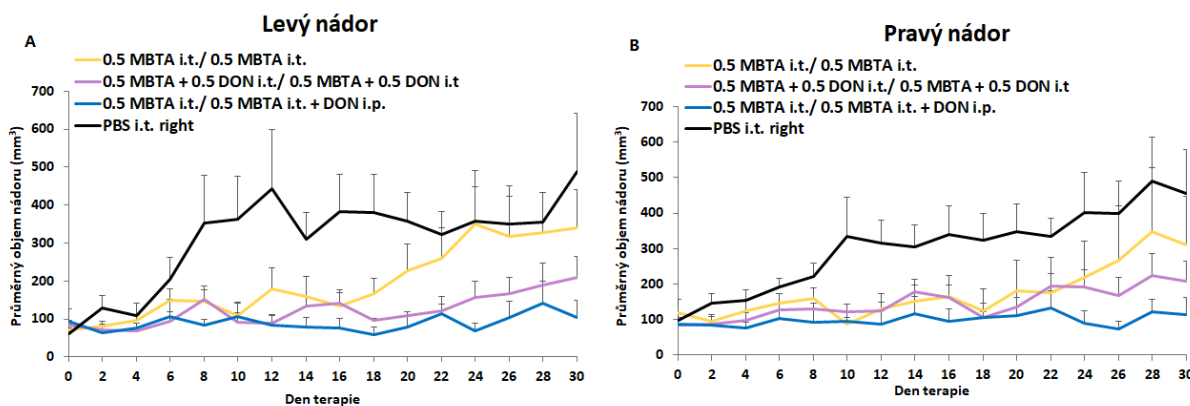
Obr. 11: Vliv rozdílného podání MBTA v kombinaci s DON na délku přežití myší.

Celkově lze zhodnotit, že MBTA terapie v kombinaci s DON i.p. má lepší vliv na růst nádoru a délku přežití než zbylé kombinace.

4.3. Terapie pankreatického adenokarcinomu MBTA a MBTA v kombinaci s DON v různých aplikačních schématech

Cílem tohoto experimentu bylo zjistit, jaký vliv na léčbu nádoru, metastáze a dobu přežití má podání MBTA v kombinaci s DON v různých aplikačních schématech.

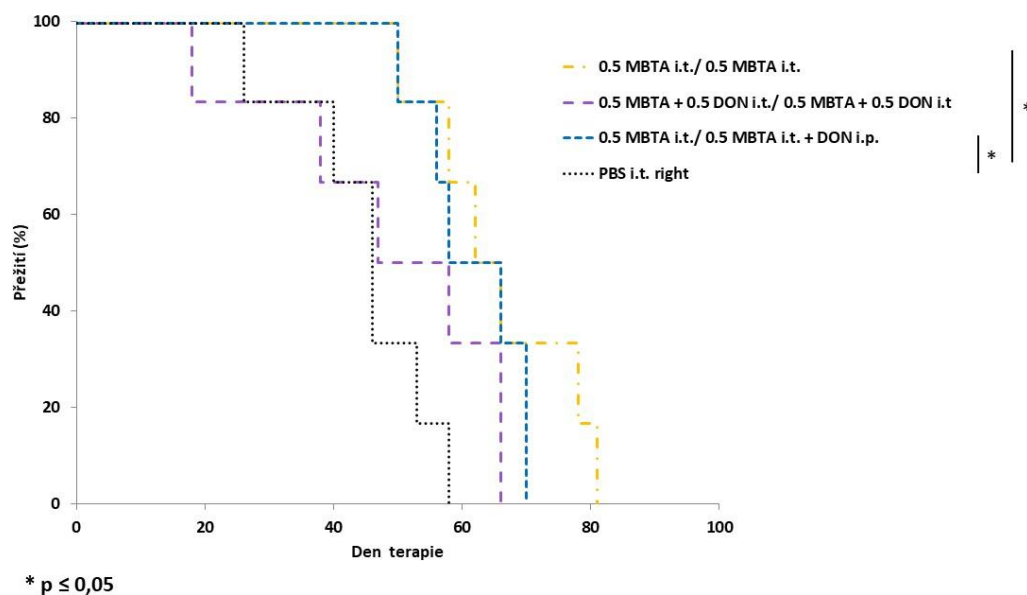
Graf A (Obr. 12-A) znázorňuje velikost levých nádorů jednotlivých skupin ve dnech, kdy probíhalo jejich měření. Graf B (Obr. 12-B) zobrazuje velikost pravých nádorů jednotlivých skupin ve dnech, kdy probíhalo měření. Růst pravého a levého nádoru při léčbě MBTA v kombinaci s DON byl redukován, nicméně tento účinek nebyl statisticky významný. Statistická významnost (hodnota p) pravého nádoru byla vyhodnocena pomocí testu one-way ANOVA a následoval Tukey post-hoc test. Jelikož data levého nádoru neměla normální rozdělení, byla statistická významnost levého nádoru provedena pomocí neparametrického testu ANOVA-Kruskal-Wallis testem.



Obr. 12: Vliv podání MBTA v kombinaci s DON v různých aplikačních schématech na léčbu pankreatického adenokarcinomu a jeho metastáz ve srovnání se standardní MBTA terapií.

Poté, co byla terapie dokončena, byla pozorována doba přežití jednotlivých myší ve skupinách. Zjištěné hodnoty byly zaznamenány do grafu (Obr. 13). Skupina léčená pouze 25 μ l MBTA do obou nádorů vykazovala delší přežití než kontrolní skupina (PBS) a též oproti skupinám léčených kombinací s DON. Vyléčit se nepodařilo žádnou myš, ale nejdéle (81 dní) přežily myši ze skupiny léčené pouze MBTA do obou nádorů. Statistická významnost (hodnota p) byla vyhodnocena pomocí Log-Rank testu.

Celkově lze konstatovat, že použití MBTA v kombinaci s DON i.p. mělo nejlepší vliv na snížení růstu nádoru. Na prodloužení přežití mělo nejlepší vliv podání pouze MBTA (25 μ l) terapeutika.

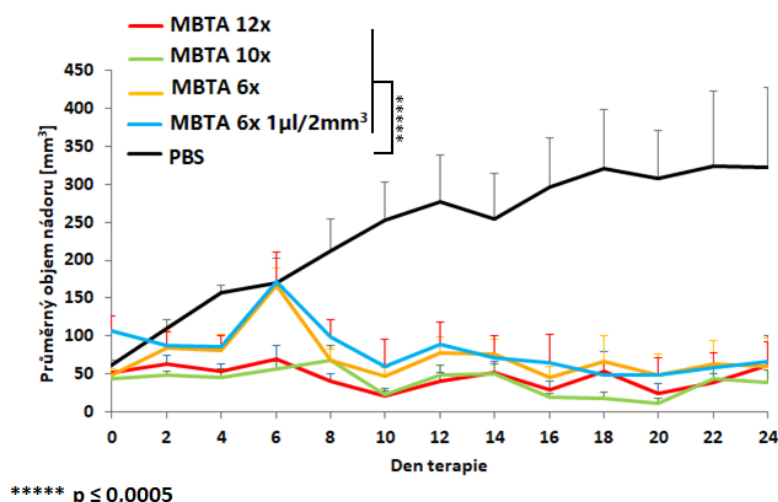


Obr. 13: Vliv podání MBTA v kombinaci s DON v různých aplikačních schématech na délku přežití ve srovnání se standardní MBTA terapií.

4.4. Srovnání různých režimů aplikace MBTA při terapii pankreatického adenokarcinomu

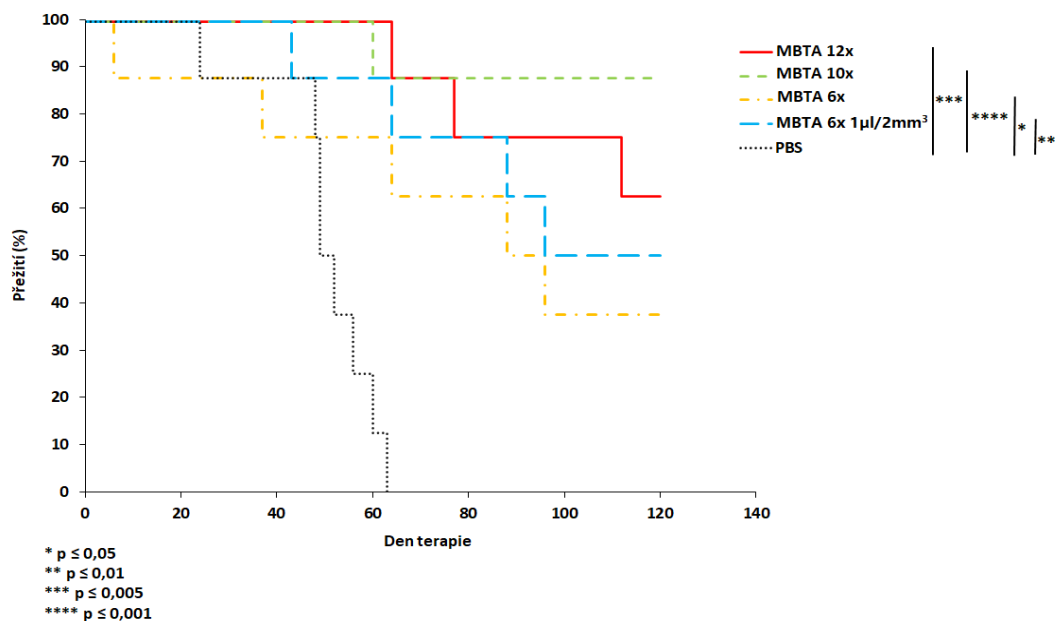
Cílem tohoto experimentu bylo zjistit, jaký vliv na léčbu nádoru a dobu přežití má použití různých aplikačních schémat MBTA terapie.

Graf 14 (Obr. 14) znázorňuje velikost nádorů jednotlivých skupin ve dnech, kdy probíhalo jejich měření. Ve skupinách léčených MBTA imunoterapií lze pozorovat, že nádorový růst byl výrazně menší než u kontrolní skupiny, které bylo aplikováno PBS. Statistická významnost (hodnota p) byla vyhodnocena pomocí testu one-way ANOVA a následoval Tukey post-hoc test.



Obr. 14: Vliv podání MBTA v různých režimech aplikace na léčbu pankreatického adenokarcinomu.

Poté, co byla terapie dokončena, byla pozorována doba přežití jednotlivých myší ve skupinách. Zjištěné hodnoty byly zaznamenány do grafu (Obr. 15). Lze vidět, že skupiny léčené MBTA terapie v různých režimech aplikace mají oproti kontrole, léčené PBS, delší dobu přežití. Ze skupiny léčené MBTA 12x přežily déle jak 120 dní celkem 4 myši, ze skupiny léčené MBTA 10x přežily déle jak 120 dní celkem 7 myší, ze skupiny léčené MBTA 6x přežily déle jak 120 dní celkem 3 myši a ze skupiny léčené MBTA 6x podle velikosti nádoru přežily déle jak 120 dní celkem 4 myši. Podle grafu lze vyhodnotit, že nejlepší vliv na délku přežití mělo podání MBTA 10x. Statistická významnost (hodnota p) byla vyhodnocena pomocí Log-Rank testu.



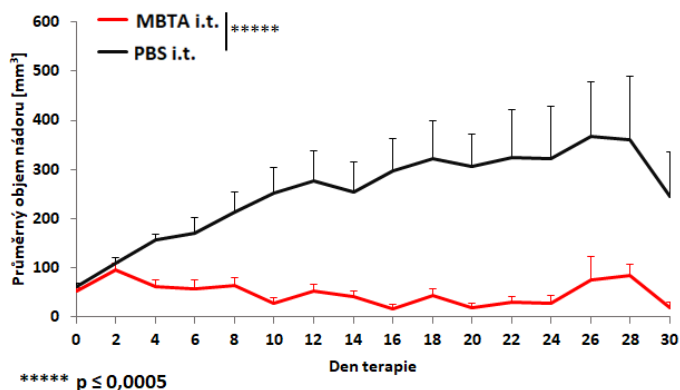
Obr. 15: Vliv podání MBTA v různých režimech aplikace na délku přežití.

Celkově lze tedy zhodnotit, že nebyl pozorovaný vliv na růst nádoru při různém režimu aplikace MBTA, avšak na přežití mělo nejlepší vliv podání MBTA v pěti intervalech po dvou (87,5% přežití) oproti standardní dávce MBTA 12x (62,5%).

4.5. Terapie rekurencí a prodloužení přežití

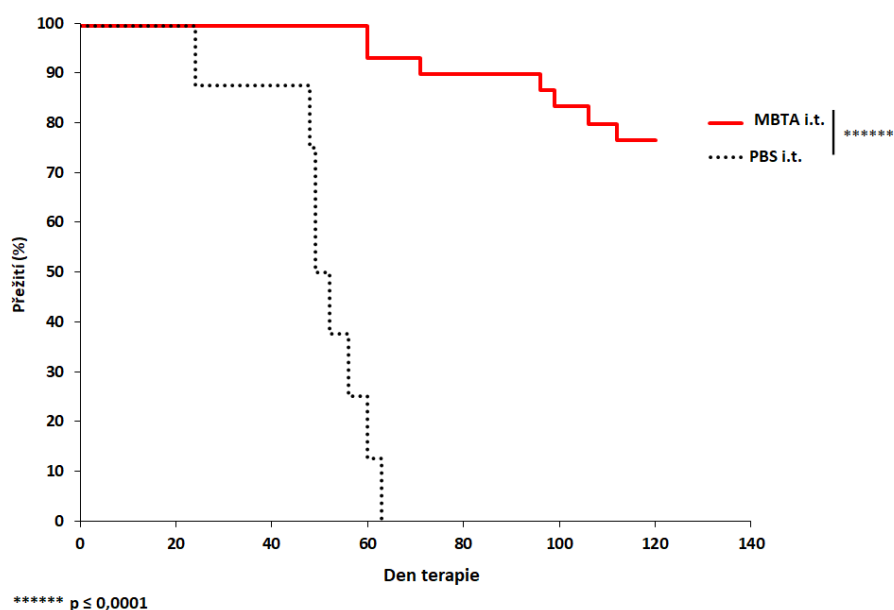
Cílem tohoto experimentu bylo zjistit jaký vliv na délku přežití má personalizovaná léčba rekurencí u myší.

Graf 16 (Obr. 16) znázorňuje velikost nádorů skupiny léčené standardním počtem dávek MBTA oproti kontrolní skupině léčené PBS ve dnech, kdy probíhalo jejich měření. Ve skupině léčené standardním počtem dávek MBTA lze pozorovat vliv terapie na růst nádoru oproti kontrolní skupině. Statistická významnost (hodnota p) byla vyhodnocena pomocí Studentova T-testu.



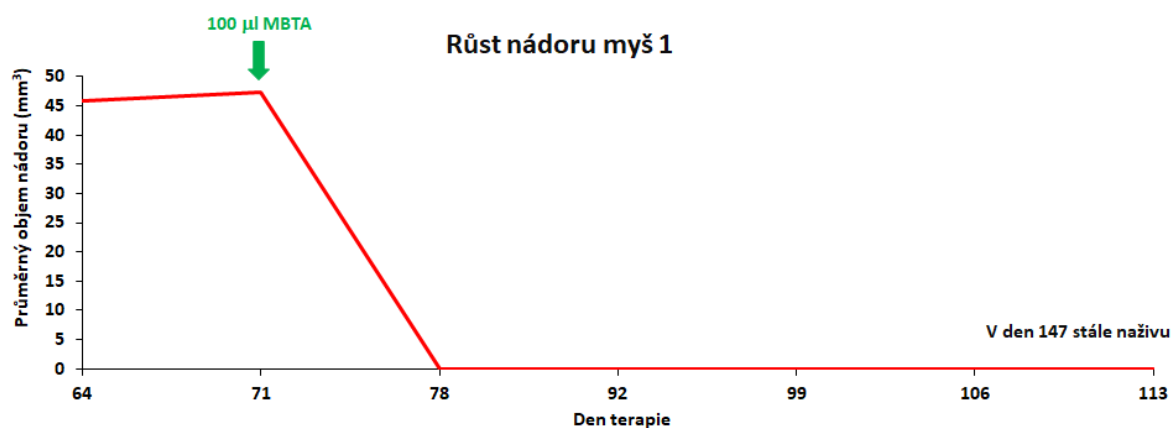
Obr. 16: Vliv podání standardní dávky MBTA na léčbu pankreatického adenokarcinomu.

Poté, co byla terapie dokončena, byla pozorována doba přežití jednotlivých myší ve skupinách. Zjištěné hodnoty byly zaznamenány do grafu (Obr. 17). Bylo pozorováno výrazné prodloužení délky přežití u myší léčených standardním počtem dávek MBTA ve srovnání s kontrolou léčenou PBS. Statistická významnost (hodnota p) byla vyhodnocena pomocí Log-Rank testu.

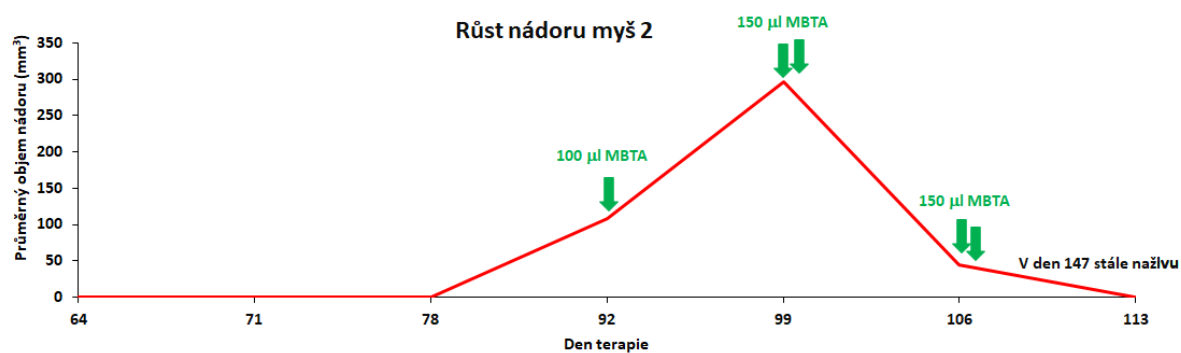


Obr. 17: Vliv podání standardní dávky MBTA na délku přežití.

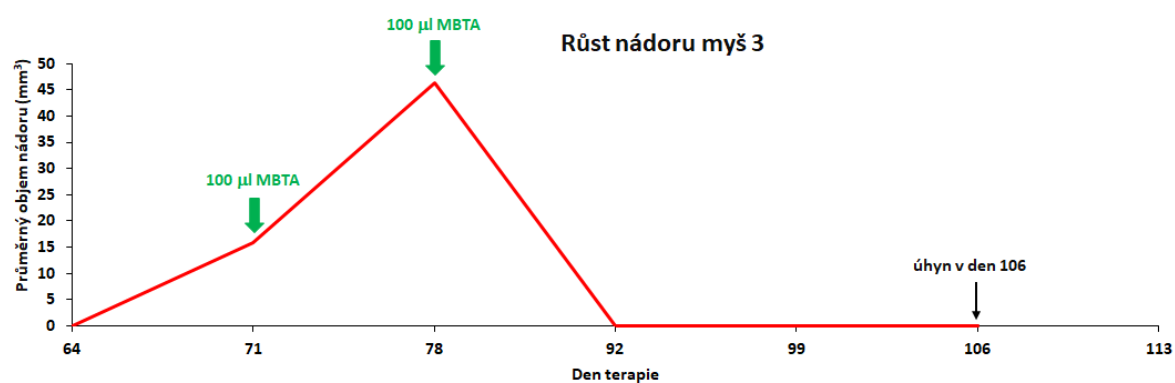
Obrázky 18, 19, 20, 21 znázorňují myši, u kterých v den 64 byla pozorována perzistence podkožních nádorů či jejich rekurence a v den 71 byla zahájena personalizovaná terapie. Tyto myši nejsou zahrnuty do Obr. 16.



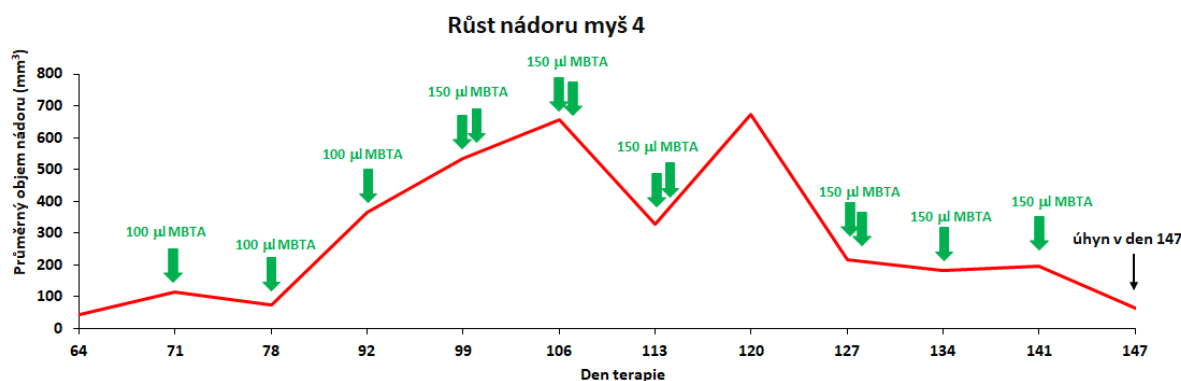
Obr. 18: Vliv podání personalizované dávky MBTA na růst nádoru a prodloužení přežití myši 1.



Obr. 19: Vliv podání personalizované dávky MBTA na růst nádoru a prodloužení přežití myši 2.



Obr. 20: Vliv podání personalizované dávky MBTA na růst nádoru a prodloužení přežití myši 3.



Obr. 21: Vliv podání personalizované dávky MBTA na růst nádoru a prodloužení přežití myši 4.

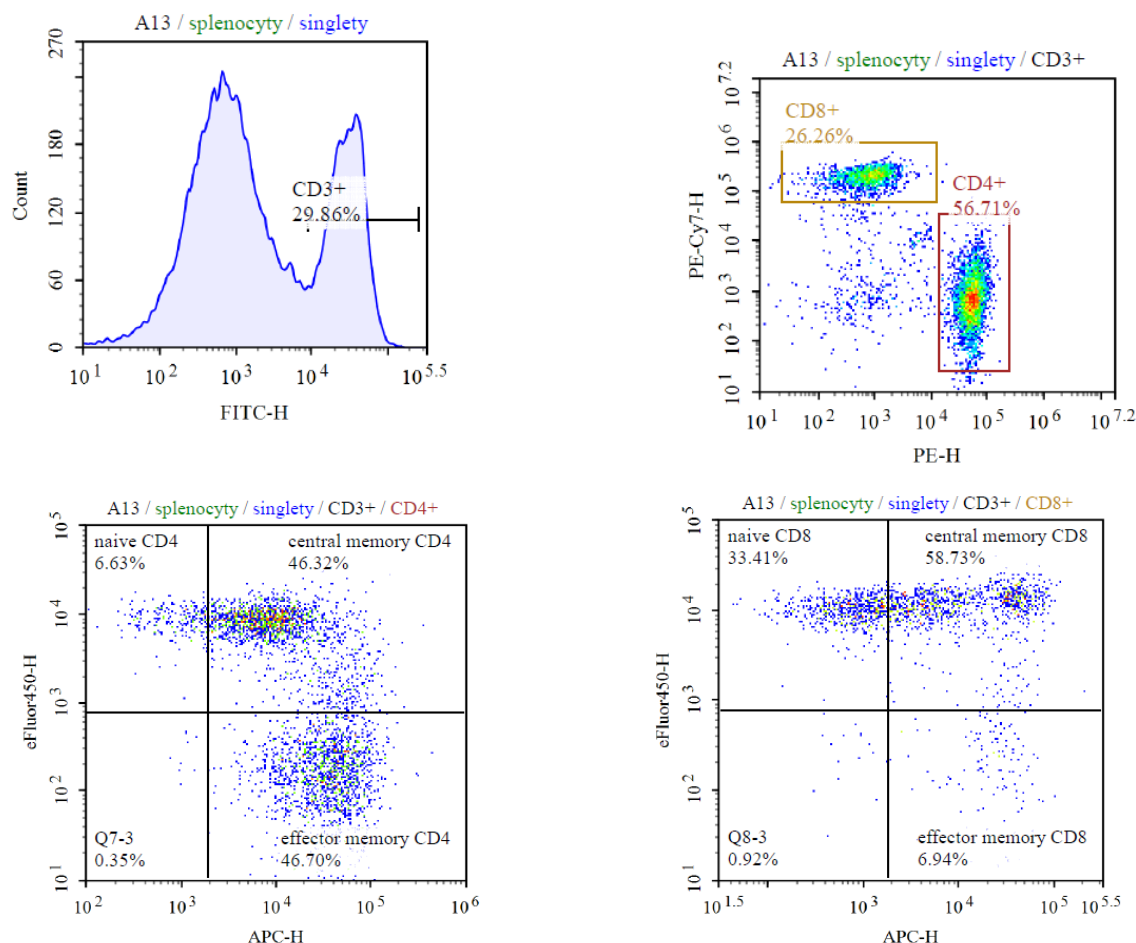
Celkově lze tedy zhodnotit pozitivní vliv dodatečné personalizované léčby na redukci růstu nádorů a prodloužení přežití myši. Účinek dodatečné imunoterapie na nádorové rekurence a prodloužení přežití byl individuální, v některých případech stačila jedna aplikace, jindy bylo třeba použít větší sérii aplikací MBTA.

4.6. Analýza subpopulací paměťových imunitních buněk ve splenocytech myši léčených MBTA terapií

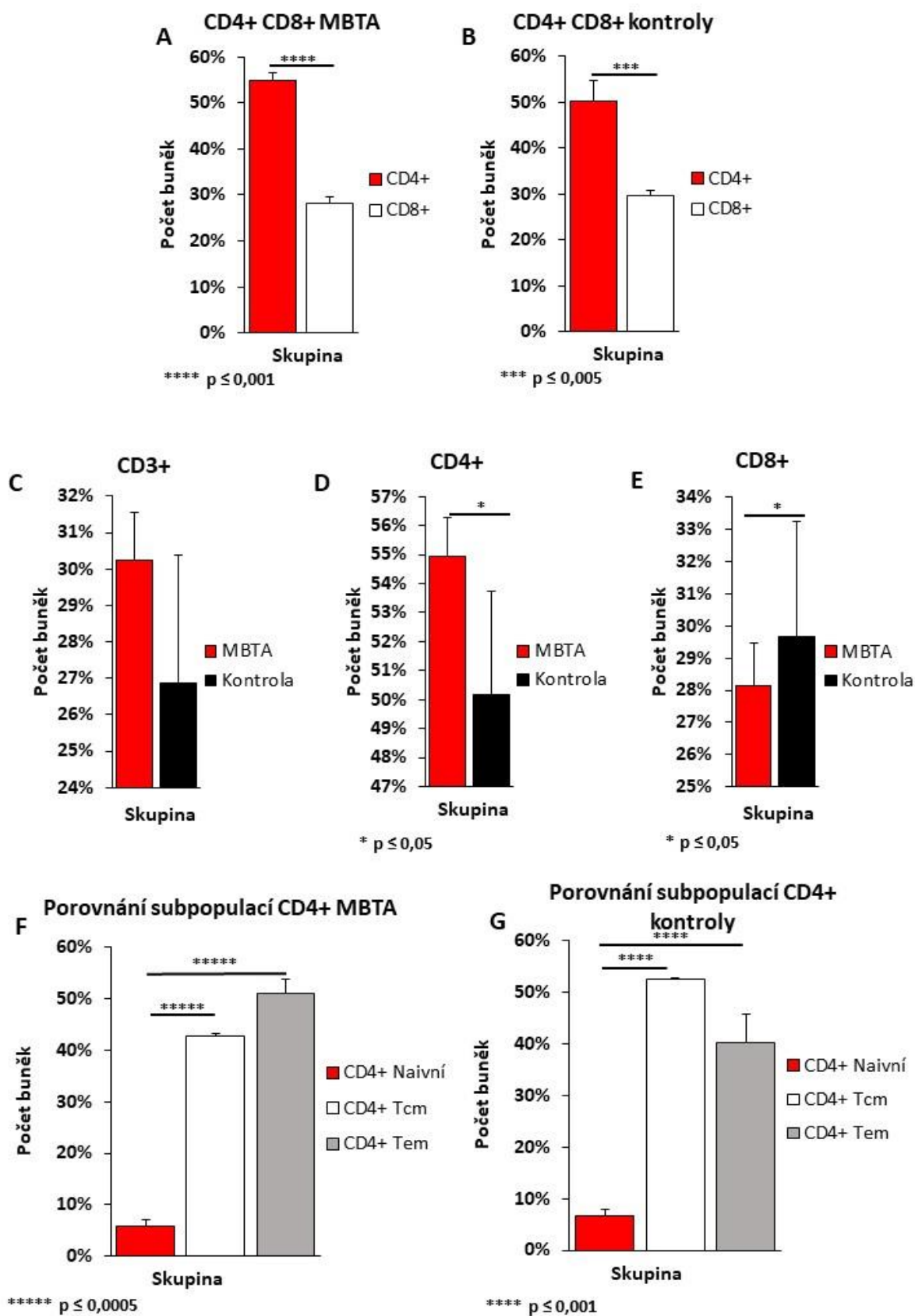
Cílem tohoto experimentu byla analýza subpopulací paměťových buněk ve splenocytech u myši, kterým byl vyléčen pankreatický adenokarcinom (Panc02) standardní MBTA terapií. Gatování buněčných populací je zobrazeno na obrázku 22 (Obr. 22). Sledován byl poměr mezi CD4⁺ a CD8⁺ T lymfocyty u léčených myši standardní MBTA imunoterapií (Obr. 23-A) a u zdravých, neléčených kontrolních myši (Obr. 23-B). Dále byl sledován poměr jednotlivých T lymfocytů mezi léčenými myšmi MBTA a kontrolami u CD3⁺ (Obr. 23-C), CD4⁺ (Obr. 23-D) a CD8⁺ (Obr. 23-E) buněčných populací. Dalšími sledovanými parametry byl poměr mezi jednotlivými subpopulacemi CD4⁺ (Obr. 23-F) a CD8⁺ (Obr. 24-H) T lymfocytů u léčených myši MBTA terapií a poměr mezi jednotlivými subpopulacemi CD4⁺ (Obr. 23-G) a CD8⁺ (Obr. 24-I) T lymfocytů u zdravých, kontrolních myši. Nakonec byly porovnány poměry jednotlivých subpopulací paměťových T lymfocytů mezi léčenými myšmi a kontrolními myšmi u naivních CD4⁺ T lymfocytů (Obr. 24-J), CD4⁺ T_{cm} lymfocytů (Obr. 24-K), CD4⁺ T_{em} lymfocytů (Obr. 24-L), naivních CD8⁺ T lymfocytů (Obr. 24-M), CD8⁺ T_{cm} lymfocytů (Obr. 24-N) a CD8⁺ T_{em} lymfocytů (Obr. 24-O).

Celkově lze shrnout, že u léčených myši MBTA terapií bylo vyšší množství CD4⁺ T lymfocytů, a naopak nižší množství CD8⁺ T lymfocytů oproti kontrolám. Ze subpopulací T

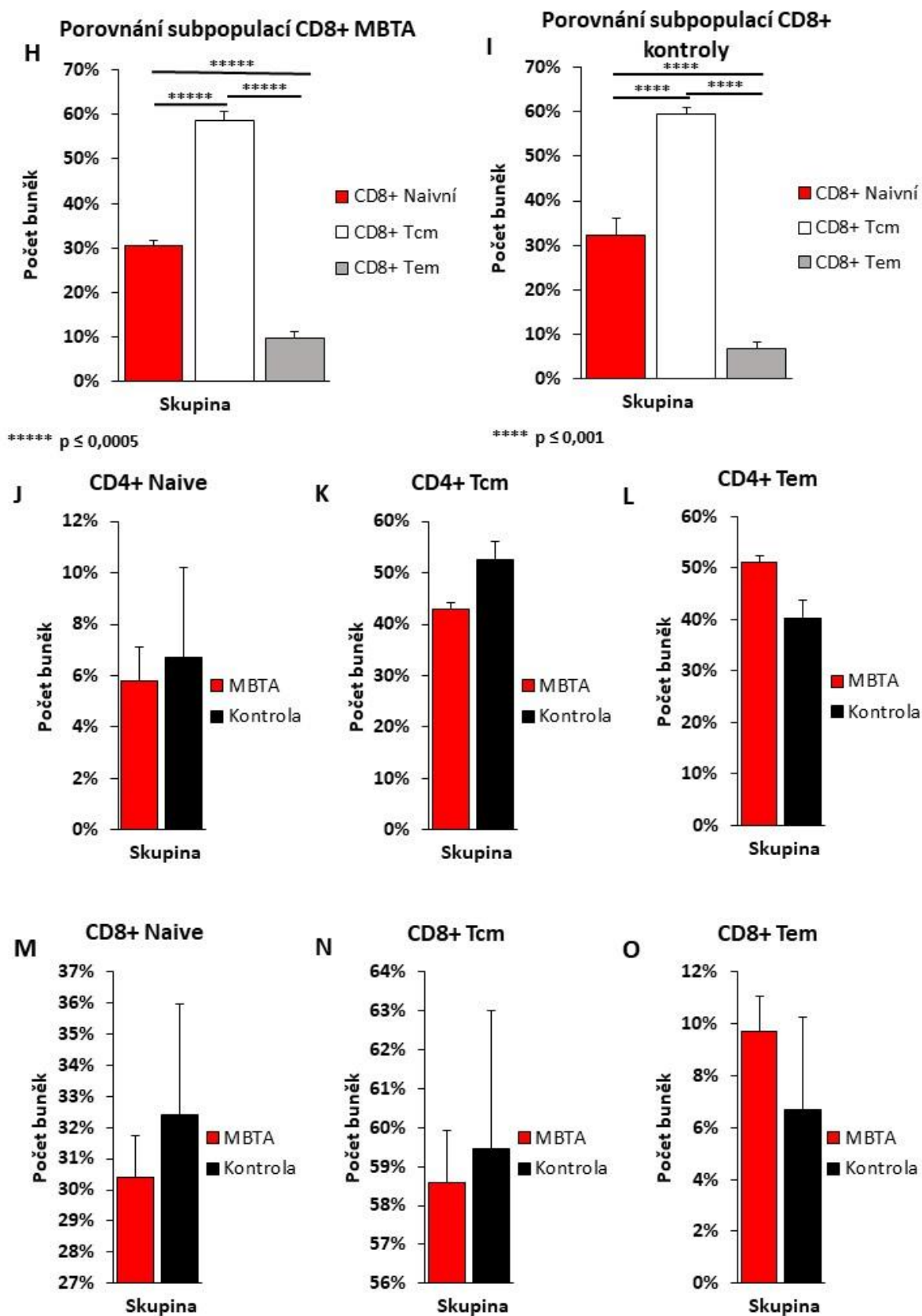
lymfocytů bylo detekované vyšší množství Tem CD4+ a CD8+ lymfocytů u léčených myší než u kontrol. U zdravých kontrol byl výskyt naivních CD4+ a CD8+ a Tcm CD4+ a CD8+ vyšší než u léčených myší. Statistická významnost (hodnota p) byla vyhodnocena v grafech, kde byly porovnávány dvě skupiny Studentovým T-testem a u více skupin one-way ANOVA a následoval Tukey post-hoc test .



Obr. 22.: Zobrazení gatovací strategie u myši vyléčené MBTA terapií.



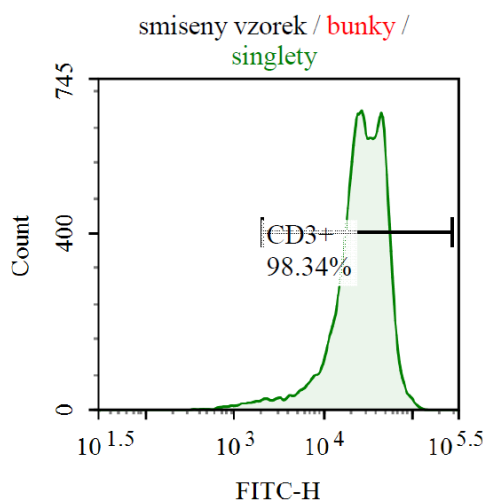
Obr. 23: Porovnání buněk T lymfocytů u myši léčených standardní MBTA imunoterapií a u zdravých, neléčených kontrolních myši.



Obr. 24: Porovnání buněk T lymfocytů u myši léčených standardní MBTA imunoterapií a u zdravých, neléčených kontrolních myši.

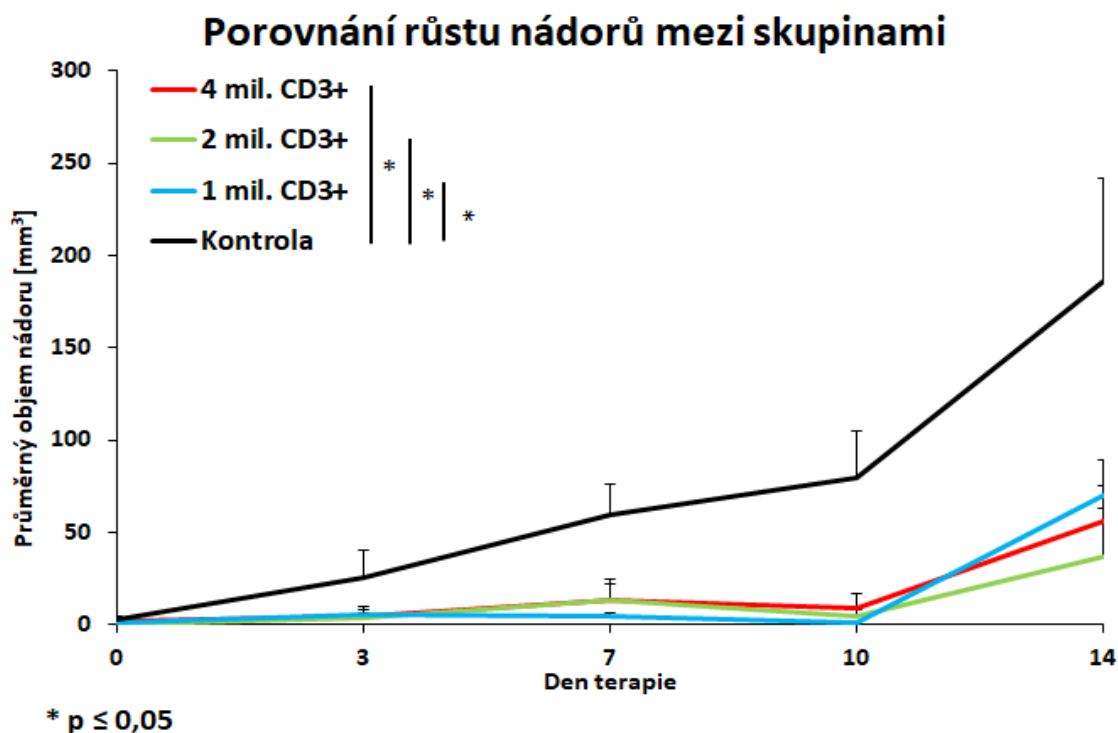
4.7. Adoptivní transfer T lymfocytů a vliv na uchycení buněk Panc02

Cílem tohoto experimentu byla primární kvantifikace síly imunitní paměti u myši, kterým byl vyléčen pankreatický adenokarcinom (Panc02) standardní MBTA terapií. Nejprve bylo nutné zjistit čistotu vyizolovaných T lymfocytů z vyléčených myši (Obr. 25) a jelikož hodnota čistoty byla vyšší než 90 %, byly tyto buňky transplantovány naivním myším, kterým bylo po deseti dnech transplantováno 100 000 Panc02 s.c..



Obr. 25: Stanovení čistoty vzorku.

Porovnání účinku paměťových buněk na růst nádorů u jednotlivých skupin, kterým bylo aplikované rozdílné množství CD3+ T lymfocytů, je zobrazeno v grafu 26 (Obr. 26). Statistická významnost nám ukázala, že vliv na odolnost vůči uchycení Panc02 mají všechny skupiny, kterým byly podávány vyizolované CD3+ T lymfocyty, podobný. Statistická významnost (hodnota p) byla vyhodnocena pomocí testu one-way ANOVA a následoval Tukey post-hoc test.



Obr. 26: Vliv podání rozdílného množství vyizolovaných CD3⁺ T lymfocytů na uchycení Panc02 buněk a rychlost růstu nádorů.

Celkově tedy můžeme zhodnotit, že adoptivní transfer CD3⁺ T lymfocytů má pozitivní vliv na snížení uchycení Panc02 a na snížení rychlosti růstu nádorů oproti nádorům u myši z kontrolní skupiny.

5. DISKUSE

Cílem této práce bylo zjistit nejvhodnější kombinaci a nejvhodnější aplikační schéma MBTA imunoterapie při léčbě pankreatického adenokarcinomu. Po úspěšném vyléčení myši byla další část této práce zaměřena na analýzu subpopulací paměťových T lymfocytů a jejich vliv na snížení uchycení a růst pankreatického adenokarcinomu. Naivním myším byly nejdříve transplantovány CD3⁺ T lymfocyty a po deseti dnech byly transplantovány s.c. Panc02 buňky.

První experiment nám poukázal na to, že podání poloviční dávky MBTA oproti klasickému množství 50 μ l MBTA/nádor, které tým Dr. Ženky používal běžně, nemá vliv na změnu růstu nádorů v případě bilaterálního modelu. Snížené množství dávky MBTA se ovšem ukázalo paradoxně jako lepší varianta při prodloužení přežití. Použití klasické dávky MBTA pravděpodobně způsobilo předávkování myši v tomto pokusu, neboť se jednalo o bilaterální model a celkové množství MBTA dosáhlo 100 μ l MBTA/myš. Vysvětlení lepšího terapeutického efektu poloviční dávky je pravděpodobně možné hledat ve snížení vedlejších účinků terapie.

Bylo dosaženo celkově horších výsledků v porovnání s dřívějšími experimenty (Uher a kol., 2021). Vysvětlení spatřujeme v tom, že v tomto experimentu byly použity nádorové buňky hned po první pasáži, tedy dříve než jindy. Pozorovali jsme rychlejší a agresivnější růst nádorů. Panc02 buňky se během pasážování mění, postupně přestávají adherovat a stávají se méně agresivní. Aby byly *in vivo* experimenty mezi sebou dobře srovnatelné, je tedy zřejmě nutné používat buňky, které po rozmrazení prodělají stejný počet pasáží. Ukazuje se, že nejvhodnější jsou tři pasáže.

Inhibitor glutaminového metabolismu (DON) se vyznačuje inhibicí enzymů potřebných při metabolismu glutaminu. Výzkumy prokázaly určité rozdíly v glukózovém a glutaminovém metabolismu aktivovaných imunitních buněk a nádorových buněk a bylo zjištěno, že ovlivnění aktivovaných buněk imunitního systému není tak výrazné jako ovlivnění právě nádorových buněk (Leone a kol., 2019). Jelikož byl prokázán toxický účinek DON na gastrointestinální trakt a z toho důvodu byl druhý a třetí experiment zaměřen na způsob podání a rozdílná aplikační schémata tohoto dodatečného terapeutika. Experimenty ukázaly, že i.t. aplikace DON je paradoxně horší než aplikace systémová, intraperitoneální. Vysvětlení je možno spatřovat v negativním vlivu vysoké koncentrace DON na nádorový infiltrát imunitních buněk, ale toto tvrzení bude vyžadovat potvrzení. V každém případě je dobré, že

lze DON aplikovat systémově, protože jeho i.t. aplikace do metastáz by nemusela být vždy realizovatelná.

Přídavek DON přinesl efekt, ale ne až tak dokonalý, aby se zbytek práce zaměřil na kombinaci MBTA/DON. Proto se další pozornost zaměřila na analýzu MBTA a studium imunitní odpovědi a paměťových buněk.

Čtvrtý experiment sledoval otázku jiného timingu aplikace MBTA terapeutika a možnosti snížení celkového počtu injekcí. V experimentu bylo prokázáno, že rozdílná časová schémata podání MBTA nemají vliv na snížení nádorového růstu. Nejlepší vliv na délku přežití mělo podání MBTA v pěti pulsech po dvou dávkách. Toto zjištění tedy umožňuje snížení počtu injekcí terapeutika, což je vždy pro pacienta výhodou.

Další experiment studoval možné prodloužení přežití u myši s nádorovou rekurencí. Jelikož je to jev při našich experimentech poměrně vzácný, tak jsme záměrně použili větší soubor myši. Zjistili jsme, že pokud dojde k výskytu rekurence u myši, tak je možné danou myš vyléčit i jedinou injekcí, někdy je ale třeba použít více injekcí. Mgr. Uher, se kterým jsme celou záležitost konzultovali a který používá MBTA imunoterapii u jiného modelu (pheochromocytom/myš), má stejnou zkušenost. Na základě našeho experimentu lze konstatovat, že personalizovaným podáním MBTA imunoterapeutika lze v případě nádorových rekurencí docílit výrazného prodloužení přežití myši a též pozitivně ovlivnit snížení růstu nádoru.

Tým Dr. Ženky má bohaté zkušenosti s tím, že vyléčené myši jsou odolné vůči retransplantaci Panc02 a abychom lépe porozuměli tomu, jaké buňky mají vliv na vznik rezistence vůči transplantovaným Panc02, byl šestý experiment zaměřen na analýzu subpopulací paměťových T lymfocytů. Z našeho experimentu byl prokázán vyšší výskyt CD4⁺ T lymfocytů, a naopak snížený výskyt CD8⁺ T lymfocytů u námi léčených myši, než u kontrolní skupiny z čehož vyplývá, že i poměr mezi CD4⁺ a CD8⁺ byl vyšší u léčených myši než u kontrol. Mnohé publikace ukazují, že sledování poměru CD4:CD8 lymfocytů přispívá k imunologickému hodnocení léčených pacientů v dlouhodobém sledování a mohou být použity pro monitorování jak imunitní dysfunkce, tak velikosti virové nálože. Navíc snížený poměr mezi CD4⁺ a CD8⁺ lymfocyty byl pozorován u pacientů trpících akutním virovým onemocněním (AIDS pacienti), při odhojování transplantátů a u hemofiliků (Lu a kol., 2015). Lze tedy předpokládat, že pokud by se izolovaly splenocyty myši, kterým by byly

aplikovány Panc02 buňky a které nebyly léčené, poměr mezi CD4:CD8 by byl nižší než u našich zdravých, neléčených kontrol. Bylo by tedy dobré zaměřit se v dalším pokusu na analýzu CD4+ a CD8+ lymfocytů u neléčených myší s Panc02 a porovnat hodnoty těchto buněk s léčenými myšmi.

Dále jsme se v šestém experimentu zaměřili zejména na analýzu subpopulací paměťových T lymfocytů, kde byl zjištěn vyšší výskyt Tem CD4+ i CD8+ T lymfocytů. Celkově vzato výzkumy ukazují, že paměť T lymfocytů se zlepšuje v průběhu času na bázi buněk a zdá se, že trvá nejméně 1 rok, než se plně ustanoví stabilní paměť T lymfocytů (Kaeche a kol., 2002; Wherry a kol., 2003). Rozdílné výsledky týkající se relativních příspěvků Tem a Tcm lymfocytů lze částečně vysvětlit dobou po infekci, kdy jsou buňky analyzovány. V časných dobách po infekci dominují Tem lymfocyty, ale později po infekci dominují již Tcm lymfocyty, které silněji odpovídají na infekci a poskytují trvalejší imunitu (Roberts a kol., 2005). Jelikož sleziny byly odebírány 4 měsíce po ukončení léčby zdá se pravděpodobné, že to byla krátká doba, aby došlo k rozvinutí Tcm lymfocytů. Z tohoto důvodu by měl být další pokus zaměřený na analýzu paměťových buněk v průběhu času po léčbě.

Sedmý experiment ukázal, že jsme schopni adoptivním transferem CD3+ T lymfocytů naivním myším zajistit odolnost vůči později transplantovaným Panc02 buňkám a snížit rychlost růstu nádorů. Pozorovali jsme, že paradoxně všechny skupiny, kterým byly injikovány CD3+ T lymfocyty v různém množství, vykazovali pozitivní vliv na snížení rychlosti růstu nádoru a odolnost vůči uchycení Panc02 a mezi skupinami tedy nebyly pozorovány žádné významné rozdíly. Abychom mohli s jistotou prohlásit jaké množství aplikovaných CD3+ T lymfocytů je nejúčinnější, bylo by nutné provést pozorování po delší dobu. S jistotou ale můžeme konstatovat, že u kontrol byly pozorovány výrazně větší nárůsty nádorové masy než u myší s adoptivním transferem, tudíž se zdá adoptivní transfer jako úspěšný. Nicméně jsme pozorovali, že transplantace 1 a 2 milionů CD3+ T lymfocytů vedla k tomu, že v příslušných skupinách se nádory neuchytily u jedné z pěti myší, kdežto u skupiny, kde bylo transplantováno nejvíce CD3+ buněk se nádory ujaly paradoxně všude. Navíc jedna myš, které bylo transplantováno 2 miliony buněk, měla od začátku měření přítomný jen malý nádor, jehož velikost se během našeho měření neměnila a je možné, že časem dojde k jeho odhojení, jelikož tento jev tým Dr. Ženky již u malých nádorů pozoroval. Možné vysvětlení, proč bylo podání 1 a 2 milionu buněk CD3+ účinnější než podání 4 milionů buněk může být v tom, že i adoptivním transferem dochází k určitému zásahu do imunity organismu a přijetí

většího množství cizorodých CD3⁺ buněk recipientem ho může paradoxně oslabit, a to i přesto, že se jedná o syngenní transplantát. V každém případě bude pozorovaný jev vyžadovat další ověření a studium.

Jelikož se u některých myší objevila po léčbě MBTA terapií ulcerózní dermatitida, byla provedena analýza splenocytů. Tyto výsledky sice zcela nezapadaly do konceptu analýzy paměťových buněk, ale jelikož výskyt ulcerózní dermatitidy negativně ovlivňoval vyhodnocování výsledků, považovali jsme jako důležité zjistit, jaké buňky převažují u takto nemocných myší. Pitvou byla u takto nemocných myší pozorována hepatosplenomegalie. Pomocí průtokové cytometrie jsme zjistili, že se nejedná o jednu převládající skupinu buněk, ale že se ve splenocytech nachází směs buněk, ve které jsou zahrnuty žírné buňky, NK buňky, monocyty a makrofágy. Bylo také zjištěno, že se na výskytu ulcerózní dermatitidy nepodílejí B lymfocyty. Výskyt ulcerózní dermatitidy je velmi často pozorován u starších samic C57BL/6 (Biase a kol., 2019). Jelikož jsme se v našem pokusu přesvědčili o negativním ovlivnění výsledků (u takto nemocných myší byla naměřená čistota CD3⁺ T lymfocytů pouhých 37 %, což bylo o 60 % méně než u vyléčených myší bez dermatitidy), bylo by řešením na pokus zkusit požívat samce C57BL/6, kteří nejsou na výskyt ulcerózní dermatitidy tak citliví, aby při dalších pokusech nedocházelo ke zbytečným komplikacím. V předchozích experimentech prováděných stejným způsobem docházelo k výskytu ulcerózní dermatitidy jen sporadicky. Větší výskyt tohoto jevu u tohoto experimentu nedokážeme zatím spolehlivě vysvětlit. Nicméně bylo nutné postižené myši z pokusu vyloučit a nemohli jsme pokračovat v původně zamýšlených analýzách, jako je např. analýza subpopulací paměťových buněk.

V této práci bylo zjištěno, že MBTA imunoterapií jsme schopni dosáhnout výrazného terapeutického úspěchu při léčbě pankreatického adenokarcinomu, dokonce i v případě výskytu metastáz. Byl také zjištěn pozitivní vliv na prodloužení přežití myší, u kterých došlo k opětovnému výskytu nádoru, zahájením dodatečné personalizované léčby. Nakonec jsme potvrdili, že u myší po léčbě MBTA terapií dochází k výskytu vyššího množství paměťových T_H1 buněk, které vznikají jako první z paměťových buněk. Adoptivním transferem CD3⁺ T lymfocytů jsme schopni navodit odolnost vůči později transplantovaným Panc02.

6. ZÁVĚR

- Aplikace polovičních dávek MBTA imunoterapeutika (25 μ l) do nádorů pankreatického adenokarcinomu (bilaterální model) neovlivnila redukci nádorového růstu, ale byl paradoxně pozorován pozitivní vliv na prodloužení přežití.
- Na témže modelu byl prokázán synergický účinek MBTA a inhibitoru glutaminového metabolismu (DON). Zajímavým poznatkem bylo to, že se ukazuje jako vhodnější i.p. použití DON, než jeho i.t. aplikace.
- Různá aplikační schémata v aplikaci MBTA imunoterapeutika nevykazovala vliv na redukci nádorového růstu oproti aplikaci standardní MBTA terapii aplikované dvanáctkrát ve čtyřech pulsech, avšak nejlepšího přežití bylo dosaženo při aplikaci MBTA celkem 10x v pěti pulsech (87,5%).
- Personalizovanou léčbou bylo při výskytu rekurencí docíleno redukce nádorového růstu a prodloužení přežití.
- Po léčbě nádoru MBTA terapií byl ve slezině detekován vyšší výskyt CD4⁺ T lymfocytů než u kontrolních myší, zatímco na druhou stranu u kontrolních myší byl vyšší výskyt CD8⁺ T lymfocytů než u léčených myší. Ve slezině vyléčených myší byl detekován vyšší výskyt Tem jak CD4⁺, tak CD8⁺ lymfocytů.
- Adoptivním transferem bylo docíleno snížené rychlosti růstu nádoru a odolnosti vůči uchycení Panc02. Transplantace 1 a 2 milionů CD3⁺ T lymfocytů vedla k tomu, že v příslušných skupinách se nádory neuchytily u jedné z pěti myší neuchytily.
- Ulcerózní dermatitida vyvolává hepatosplenomegalii a ovlivňuje buněčný profil splenocytů. To se projevilo tak, že při separaci CD3⁺ T lymfocytů nebylo možné pomocí MACS účinně oddělit nadbytek žírných buněk, monocytů a makrofágů.

7. SEZNAM ZKRATEK

ADCC - *Antibody dependent cell cytotoxicity*

ADP - *Antibody dependent phagocytosis*

Ag - antigen

AIDS - *Acquired immune deficiency syndrome*

AUC – plocha pod křivkou (*area under the curve*)

BAM – biokompatibilní kotvy pro membránu (*biocompatible anchor for cell membrane*)

BCR - *B cell receptor*

BOFES - *Bovine fetal serum*

CCR - *chemokine receptor*

CD - *cluster of differentiation*

CDC - *Complement Dependent Cytotoxicity*

CDP - *Complement Dependent Phagocytosis*

CRP - *C-reactive protein*

CSF- *colony-stimulating factor*

CTL - *cytotoxic T-lymphocyte*

CTLA - *cytotoxic T-lymphocyte antigen-4*

DAMPs - *damage associated molecular patterns*

DCs - *dendritic cells*

DMEM - *Dulbecco's modified eagle medium*

DON - 6-diazo-5-oxo-L-noreucine

EDTA – ethylendiamintetranová kyselina

FACS – průtoková cytometrie (*fluorescent activated cell sorting*)

FCS - *Fetal calf serum*

FF - *Facs Flow*

i.p. - intraperitoneální aplikace

i.t. - intratumorální aplikace

Ig - Imunoglobulin

IL - interleukin

INF - interferon

IVC - *individually ventilated cages*

KLRG - *killer cell lectin-like receptor G*

LAG - *lymphocyte activation gene*

LPS - lipopolysacharid

LTA - lipoteichová kyselina (*lipoteichoic acid*)

MACS – magnetická separace (*magnetic activated cell sorting*)

MBL - lektin vázající manózu (*mannan-binding lectin*)

MBTA – imunoterapeutikum složené z R-848, poly(I:C), LTA, man-BAM a anti-CD40

MDSCs - *myeloid-derived supressor cells*

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

MR – manózový receptor (*mannose receptor*)

NHS - N-Hydroxysukcinimid

NK – přirozený zabíječ (*natural killer*)

NOD - *nukleotide-binding oligomerization domain*

PAMPs - *pathogen associated molecular patterns*

PBS - fosfáty pufrovaný fyziologický roztok (*phosphate buffered saline*)

PD-L1 - *programmed death-1 ligand*

poly(I:C) - polyinosinická-polycitidylická kyselina (*polyinosinic: polycytidylic acid*)

PRRs - receptory rozpoznávající molekulové vzory (*pattern recognition receptors*)

R-848 - resiquimod

s.c. - subkutánní aplikace

SAP - *serum amyloid protein*

SEM - standardní chyba průměru (*standard error of the mean*)

SPF - *specific pathogen free*

TAA – antigeny asociované s nádory (*tumor associated antigens*)

TAM - *tumour associated macrophages*

TAN - *tumor associated neutrophils*

Tc - cytotoxický T lymfocyt

Tcm – paměťový cytotoxický T lymfocyt

Tem - efektorový T lymfocyt

Tfh - folikulární T pomocný lymfocyt

TGF - *transforming growth factor*

Th – pomocný T lymfocyt

TIM - *T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing*

TLR - *Toll-like receptors*

TNF - tumor nekrotizující faktor (*tumor necrosis factor*)

Tregs - regulační T lymfocyty (*regulatory T-cells*)

TSA - antigeny specifické pro nádory (*tumor-specific antigens*)

Tscm - paměťové T buňky kmenových buněk (*T cells of stem memory*)

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

8. LITERATURA

Abbas A. K., Lichtman A. H. H., Pillai S. (2012). *Cellular and Molecular Immunology* (7th ed.). Philadelphia: Elsevier/Saunders.

Adam Z. a Vorlíček J. (2005). Paliativní medicína. 2. vydání, *Praha: Grada-Publishing*. 480s.

Akkaya M., Kwak K. a Pierce S. K. (2020). B cell memory: building two walls of protection against pathogens. *Nature Reviews Immunology*. 20:229–238.

Akondy R. S., Fitch M., Edupuganti S., Yang S., Kissick H. T., Li K. W. a kol. (2017). Origin and differentiation of human memory CD8 T cells after vaccination. *Nature*. 552:362–367.

Alexakis N., Halloran C., Raraty M., Ghaneh P., Sutton R. a Neoptolemos J. P. (2004). Current standard of surgery for pancreatic cancer. *BJS*. 91:1410–1427.

Ahlers J. D., Belyakov I. M. (2010). Memories that last forever: strategies for optimizing vaccine T-cell memory. *Blood*. 115:1678–1689.

Badovinac V. P., Messingham K. A., Griffith T. S., Harty J. T. (2006). TRAIL deficiency delays, but does not prevent, erosion in the quality of “helpless” memory CD8 T cells. *The Journal of Immunology*. 177:999–1006.

Berenzon D., Schwenk R. J., Letellier L., Guebre-Xabier M., Williams J. a U. Krzych (2003). Protracted protection to *Plasmodium berghei* malaria is linked to functionally and phenotypically heterogeneous liver memory CD8⁺ T cells. *Journal of Immunology*. 171:2024–2034.

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

Bevan M. J. (2004). Helping the CD8(+) T-cell response. *Nature Reviews Immunology*. 4:595–602.

- Biase De D., Esposito F., Martino De M., Pirozzi C., Luciano A., Palma G. a kol.** (2019). Characterization of inflammatory infiltrate of ulcerative dermatitis in C57BL/6NCrl-Tg(HMGA1P6)1Pg mice. *Laboratory Animals*. 53(5):447-458.
- Bonilla F. A., Oettgen H. C.** (2010). Adaptive immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 125:S33-40.
- Borges de Silva H., Fonseca R., Alvarez J. M. a Lima M. R. D.** (2015). IFN γ priming effects on the maintenance of effector memory CD4⁺ T cells and phagocyte function: evidence from infectious disease. *Journal of Immunology Research*. 3:1–8.
- Bortnick A. a Allman D.** (2013) What is and what should always have been: long-lived plasma cells induced by T cell-independent antigens. *Journal of Immunology*. 190:5913–5918.
- Bosetti C., Rosato V., Li D., Silverman D., Petersen G. M., Bracci P. M. a kol.** (2014). Diabetes, antidiabetic medications, and pancreatic cancer risk: an analysis from the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium. *Annals of Oncology*. 25(10):2065-2072.
- Busch D. H., Fräßle S. P., Sommermeyer D., Buchholz V. R. a Riddell S. R.** (2016). Role of memory T cell subsets for adoptive immunotherapy. *Seminars in Immunology*. 28:28–34.
- Caisová V., Vieru A., Kumžáková Z., Glaserová S., Husníková H., Vácová N. a kol.** (2016). Innate immunity based cancer immunotherapy: B16-F10 murine melanoma model. *BMC Cancer*, 16(1), 940.
- Caisová V., Uher O., Nedbalová P., Jochmanová I., Kvardová K., Masáková K. a kol.** (2018). Effective cancer immunotherapy based on combination of TLR agonists with stimulation of phagocytosis. *International Immunopharmacology*. 59(6):86-96.
- Cerwenka A. a Lanier L. L.** (2016). Natural killer cell memory in infection, inflammation and cancer. *Nature Reviews Immunology*. 16:112–123.
- Clark R., Kupper T.** (2005). Old meets new: the interaction between innate and adaptive immunity. *Journal of Investigative Dermatology*. 125(4):629-637.

- Coffey G.L., Ehrlich J., Fisher M.W., Hillegas A.B., Kohberger D.L., Machamer H.E. a kol.** (1956). 6-Diazo-5-oxoL-norleucine, a new tumor-inhibitory substance. I. *Biologic studies*. Antibiot Chemother (Northfield). 6(8):487–97.
- 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.
- Cui G., Staron M. M., Gray S. M., Ho P.-Ch., Amezquita R. A., Wu J. a kol.** (2015). IL-7-Induced Glycerol Transport and TAG Synthesis Promotes Memory CD8+ T Cell Longevity. *Cell*. 161(4):750-61.
- Dahl M. R., Thiel S., Matsushita M., Fujita T., Willis A. C., Christensen T. a kol.** (2001). MASP-3 and Its Association with Distinct Complexes of the Mannan-Binding Lectin Complement Activation Pathway. *Immunity*. 15(1):127-135.
- Delves P. J., Roitt I. M.** (2000). The imenne system. First of two parts. *The New England Journal of Medicine*. 343(1):37-49.
- Delves P. J., Martin S. J., Burton D. R., Roitt I. M.** (2012). Roitt's Essential Immunology. Chichester: John Wiley & Sons.
- De Souza A., Khawaja K. I., Masud F., Saif M. W.** (2016). Metformin and pancreatic cancer: Is there a role? *Cancer Chemotherapy Pharmacology*. 77:235–242.
- Dörner T., Radbruch T.** (2007). Antibodies and B cell memory in viral immunity. *Immunity*. 27(3):384-92.
- Ducieux M., Cuhna A. S., Caramella C., Hollebecque A., Burtin P., Goéré D. a kol.** (2015). Cancer of the pancreas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*. 26(5):v56-v68.
- Dunn G. P., Bruce A. T., Ikeda H., Old L. J., Schreiber R.D.** (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature Immunology*. 3(11):991-998.
- Durandy A., Taubenheim N., Peron S. a Fischer A.** (2007). Pathophysiology of B-cell intrinsic immunoglobulin class switch recombination deficiencies. *Advances in Immunology*. 94:275–306.

- Dutton R. W., Bradley L. M. a Swain S. L.** (1998). T cell memory. *Annual Review of Immunology*. 16:201–223.
- Faint J. M., Annels N. E., Curnow S. J., Shields P., Pilling D., Hislop A. D. a kol.** (2001). Memory T cells constitute a subset of the human CD8+CD45RA+ pool with distinct phenotypic and migratory characteristics. *The Journal of Immunology*. 167:212–220.
- Farrell J. J., Elsaleh H., Garcia M., Lai R., Ammar A., Regine W. F. a kol.** (2009). Human Equilibrative Nucleoside Transporter 1 Levels Predict Response to Gemcitabine in Patients With Pancreatic Cancer. *Gastroenterology*. 136(1):187-195.
- Feurerer M., Rocha M., Bai L., Umansky V., Solomayer E. F., Bastert G. A kol.** (2001). Enrichment of memory T cells and other profound immunological changes in the bone marrow from untreated breast cancer patients. *International Journal of Cancer*. 92:96–105.
- Flynn J. K. a Gorrry P. R.** (2014). Stem memory T cells (TSCM) – their role in cancer and HIV immunotherapies. *Clinical and Translational Immunology*. 3:1–7.
- Gabrilovich D., Abe M., Onishi C., Taketani T., Purevsuren J., Yamaguchi S. a kol.** (2004). Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects: „N1“ versus „N2“ TAN. *Nature Reviews Immunology*. 4(12):941-952.
- Gardiner C. M. a Mills K. H. G.** (2016). The cells that mediate innate immune memory and their functional significance in inflammatory and infectious disease. *Seminars in Immunology*. 28:343–350.
- Gasper D. J., Tejera M. M., Suresh M.** (2014). CD4 T-cell generation and maintenance. *Critical Reviews in Immunology*. 34:121–146.
- Gattinoni L., Lugli E., Ji Y., Pos Z., Paulos Ch. M., Quigley M. F. a kol.** (2011). A human memory T cell subset with stem cell-like properties. *Nature Medicine*. 17:1290–1297.
- Geginat J., Sallusto F., Lanzavecchia A.** (2001). Cytokine-driven proliferation and differentiation of human naive, central memory, and effector memory CD4(+) T cells. *Journal of Experimental Medicine*. 194:1711–1719.

Geiger R., Rieckmann J. C., Wolf T., Basso C., Feng Y., Fuhrer T. a kol. (2016). L-Arginine modulates T cell metabolism and enhances survival and anti-tumor activity. *Cell*. 167(829–842):e813.

Geiger T. L. a Sun J. C. (2016). Development and maturation of natural killer cells. *Current Opinion in Immunology*. 39:82–89.

Golubovskaya V., Wu L. (2016). Different subsets of T cells, memory, effector functions and CAR-T immunotherapy. *Cancers*. 8:36.

Gravitz L. (2013). Cancer immunotherapy. *Nature*. 504(7480):S1.

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

Harris N. L., Watt V., Ronchese F. a Gros G. (2002). Differential T cell function and fate in lymph node and nonlymphoid tissues. *Journal of Experimental Medicine*. 195:317–326.

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

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

Hengel, R.L., V. Thaker, M.V. Pavlick, J.A. Metcalf, G. Dennis Jr., J. Yang a kol. (2003). Cutting edge: L-selectin (CD62L) expression distinguishes small resting memory CD4⁺ T cells that preferentially respond to recall antigen. *The Journal of Immunology*. 170:28–32.

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

Hořejší V., Bartůňková J., Brdička T., Špíšek R. (2013). *Základy imunologie* (5. vydání). Praha:Triton.

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

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

Chaplin D. D. (2010). Overview of the Immune Response. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 125(2):S3–23.

Cheng Y. S., Xu F. (2010). Anticancer function of polyinosinic-polycytidylic acid. *Cancer Biology & Therapy*. 10(12):1219-1223.

Italiani P., Boraschi D., Kaibara N. (2014). From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. *Frontiers in Immunology*. 5(1):1-22.

Jack D. L., Read R. C., Tenner A. J., Frosch M., Turner M. W., Klein N. J. (2001). Mannose-Binding Lectin Regulates the Inflammatory Response of Human Professional Phagocytes to *Neisseria meningitidis* Serogroup B. *The Journal of Infectious Diseases*. 184(9):1152-1162.

Jenkins M. K. a Johnson J. G. (1993). Molecules involved in T-cell costimulation. *Current Opinion in Immunology*. 5(3):361-367.

Janotová, T., Jalovecká, M., Auerová, M., Švecová, I., Bruzlová, P., Maierová, V. a kol. (2014). The Use of Anchored Agonists of Phagocytic Receptors for Cancer Immunotherapy: B16-F10 Murine Melanoma Model. *Plos One*. 9(1).

Kaech S. M., Hemby S., Kershv E. a Ahmed R. (2002). Molecular and functional profiling of memory CD8 T cell differentiation. *Cell*. 111:837–851.

Kamisawa T., Wood L. D., Itoi T., Takaori K. (2016). Pancreatic cancer. *The Lancet*. 388(6):73-85.

Kato K., Itoh C., Yasukouchi T., Nagamune T. (2004). Rapid Protein Anchoring into the Membranes of Mammalian Cells Using Oleyl Chain and Poly (ethylene glycol) Derivatives. *Biotechnology Progress*. 20(3):897-904.

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

Kretschmer K., Apostolou I., Jaeckel E., Khazaie K., von Boehmer H. (2006). Making regulatory T cells with defined antigen specificity: role in autoimmunity and cancer. *Immunological Reviews*. 212(1):163-169.

- Kurosaki T., Kometani K., Ise W.** (2015). Memory B cells. *Nature Reviews Immunology*. 15:149–159.
- Lanzavecchia A. a Sallusto F.** (2001). Regulation of T cell immunity by dendritic cells. *Cell*. 106:263–266.
- Lemberg K. M., Vornov J. J., Rais R., Slusher B. S.** (2018). We're Not “DON” Yet: Optimal Dosing and Prodrug Delivery of 6-Diazo-5-oxo-L-norleucine. *Molecular Cancer Therapeutics*. 17(9):1824-1832.
- Leone R. D., Zhao L., Englert J. M., Sun I.-M., Oh M. -H., Sun I.-H. a kol.** (2019). Glutamine blockade induces divergent metabolic programs to overcome tumor immune evasion. *Science*. 366(6468):1013-1021.
- Linsley P. S., Ledbetter J. A.** (1993). The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen. *Annual Review of Immunology*. 11:191-212.
- Liu Q. J. a Gao B.** (2008). Manipulation of MHC-I/TCR interaction for immune therapy. *Cellular and Molecular Immunology*. 5(3):171-82.
- Lu W., Mehraj V., Vyboh K., Cao W., Li T., Routy J.** (2015). CD4:CD8 ratio as a frontier marker for clinical outcome, immune dysfunction and viral reservoir size in virologically suppressed HIV-positive patients. *Journal of the International AIDS Society*. 18(1):20052.
- Luchini C., Capelli P., Scarpa A.** (2016). Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Its Variants. *Surgical Pathology Clinics*. 9:547–560.
- Luo G., Long J., Zhang B., Liu C., Xu J., Ni Q., Yu X.** (2012). Stroma and pancreatic ductal adenocarcinoma: An interaction loop. *Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - Reviews on Cancer*. 1826(1):170-178.
- MacLeod M. K. L., Kappler J. W., Marrack P.** (2010). Memory CD4 T cells: generation, reactivation and re-assignment. *Immunology*. 130:10–15.
- Mahnke Y. D., Schwendemann J., Beckhove P., Schirmacher V.** (2005). Maintenance of long-term tumour-specific T-cell memory by residual dormant tumour cells. *Immunology*. 115:325–336.

- Marabelle A., Kohrt H., Caux C., Levy R.** (2014). Intratumoral Immunization: A New Paradigm for Cancer Therapy. *Clinical Cancer Research*. 20(7):1747-1756.
- Martin M. D., Kim M. T., Shan Q., Sompallae R., Xue H.-H., Harty J. T. a kol.** (2015). Phenotypic and functional alterations in circulating memory CD8 T cells with time after primary infection. *PLOS Pathogens*. 11:e1005219.
- Martinez-Pomares L.** (2012). The mannose receptor. *Journal of Leukocyte Biology*. 92(6):1177-1186.
- Medzhitov R., Janeway C. A.** (2000). Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunological Reviews*. 173(1):89-97.
- Miller K. D., Siegel R. L., Lin C. C., Mariotto A. B., Kramer J. L., Rowland J. H. a kol.** (2016). Cancer treatment and survivorship statistics. *A Cancer Journal for Clinicians*. 66:271–289.
- Min-Oo G., Kamimura Y., Hendricks D. W., Nabekura T., Lanier L. L.** (2013). Natural killer cells: walking three paths down memory lane. *Trends in Immunology*. 34:251–258.
- Motz G. T., Santoro S. P., Wang L. P., Garrabrant T., Lastra R. R., Hagemann I. S. a kol.** (2014). Tumor Endothelium FasL Establishes a Selective Immune Barrier Promoting Tolerance in Tumors. *Nature Medicine*. 20(6):607-615.
- Neth O. W., Bajaj-Elliott M., Turner M. W., Klein N. J.** (2005). Susceptibility to infection in patients with neutropenia: The role of innate immune system. *British Journal of Haematology*. 129(6):713-722.
- Neville A. M., Mackay A. M., Westwood J., Turberville C., Laurence J. R.** (1975). Human tumour-associated and tumour-specific antigens: some concepts in relation to clinical oncology. *Journal of Clinical Pathology*. 6:102-112.
- Niedźwiedzka-Rystwej P., Herberg M., Deptuła W.** (2012). Biology and role of NK cells selected data. *Central European Journal of Immunology*. 37:399–404.
- Niedźwiedzka-Rystwej P., Tokarz-Deptuła B., Deptuła W.** (2013). Charakterystyka subpopulacji limfocytów T. *Postepy higieny i medycyny doswiadczalnej*. 67:371–379.

- O’Leary J. G., Goodarzi M., Drayton D. L., von Andrian U. H.** (2006). T cell- and B cell-independent adaptive immunity mediated by natural killer cells. *Nature Immunology*. 7:507–516.
- Parker K. H., Beury D. W., Ostrand-Rosenberg S.** (2015). Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Immunotherapy of Cancer*. 95-139.
- Parkin J., Cohen B., Ostrand-Rosenberg S., Li F., Zhang H., Villa A. a kol.** (2001). An overview of the immune system. *The Lancet*. 357(9270):1777-1789.
- Peng H. a Tian Z.** (2017). Natural Killer Cell Memory: Progress and Implications. *Frontiers in Immunology*. 8:1143.
- Perez-Gracia J. L., Labiano S., Rodriguez-Ruiz M. E., Sanmamed M. F., Melero I., Ryska M. a kol.** (2014). Orchestrating immune check-point blockade for cancer immunotherapy in combinations. *Cancer Epidemiology*. 38(1):28-34.
- Pitt J. M., Vetizou M., Waldschmitt N., Kroemer G., Chamaillard M., Boneca I. G. a kol.** (2016). Fine-tuning cancer immunotherapy: optimizing the gut microbiome. *Cancer Research*. 76:4602–4607.
- Qingjun L., Zhongjie S. a Ligong Ch.** (2020). Memory T cells: strategies for optimizing tumor immunotherapy. *Protein Cell*. 11(8):549–564.
- Raimondi S., Maisonneuve P. a Lowenfels A. B.** (2009). Epidemiology of pancreatic cancer: an overview. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 6(12):699-708.
- Ratajczak W., Niedźwiedzka-Rystwej P., Tokarz-Deptuła B., Deptuła W.** (2018). *Central European Journal of Immunology*. 43(2):194–203.
- Raval R. R., Sharabi A. B., Walker A. J., Drake C. G., Sharma P.** (2014). Tumor immunology and cancer immunotherapy: summary of the 2013 SITC primer. *Journal for Immunotherapy of Cancer*. 2(1):1-11.
- Rejthar A., Vojtěšek B.** (2002). *Obecná patologie nádorového růstu*. Praha: Grada.
- Roberts A. D., Ely K. H., Woodland D. L.** (2005). Differential contributions of central and effector memory T cells to recall responses. *Journal of Experimental Medicine*. 202:123–133.

- Rölle A., Pollmann J., Cerwenka A.** (2013). Memory of infections: an emerging role for natural killer cells. *PLOS Pathogens*. 9:e1003548.
- Rosado M. M., Scarsella M., Pandolfi E., Cascioli S., Giorda E., Chionne P. a kol.** (2011). Switched memory B cells maintain specific memory independent of serum antibodies: The hepatitis B example. *European Journal of Immunology*. 41:1800–1808.
- Sage A. P. a Mallat Z.** (2014). Multiple potential roles for B cells in atherosclerosis. *Annals of Medicine*. 46:297–303.
- Sallusto F., Geginat J., Lanzavecchia A.** (2004). Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annual Review of Immunology*. 22:745–763.
- Sanabria Mateos R., Conlon K. C.** (2016). Pancreatic cancer. *Surgery (Oxford)*. 34(6):282-291.
- Sell S.** (2004). Stem cell origin of cancer and differentiation therapy. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 51(1):1-28.
- Sharma N. S., Gupta V. K., Garrido V. T., Hadad R., Durden B. C., Kesh K. a kol.** (2020). Targeting tumor-intrinsic hexosamine biosynthesis sensitizes pancreatic cancer to anti-PD1 therapy. *Journal Of Clinical Investigation*. 130(1):451-465.
- Shinnakasu R. a Kurosaki T.** (2018). Regulation of memory B and plasma cell differentiation. *Current Opinion in Immunology*. 45:126–131.
- Schwandner R., Dziarski 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(25):17406-17409.
- Sica A., Larghi P., Mancino A., Rubino L., Porta C., Totaro M. G. a kol.** (2008). Macrophage polarization in tumour progression: Phenotype, Function and the Role of Lymphokines in Regulating their Development. *Seminars in Cancer Biology*. 18(5):349-355.
- Smith-Garvin J. E., Koretzky G. A., Jordan M. S.** (2009). T Cell Activation. *Annual Review of Immunology*. 27:591–619.

Sun J. C., Beike J. N., Lanier L. L. (2009). Adaptive immune features of natural killer cells. *Nature*. 457:557–561.

Sun J. C., Lopez-Verges S., Kim C. C., DeRisi J. L. a Lanier L. L. (2011). NK cells and immune „memory”. *The Journal of Immunology*. 186:1891–1897.

Sun J. C., Williams M. A., Bevan M. J. (2004). CD4⁺ T cells are required for the maintenance, not programming, of memory CD8⁺ T cells after acute infection. *Nature Immunology*. 5:927–933.

Tangye S. G., Tarlinton D. M. (2009). Memory B cells: effectors of long-lived immune responses. *European Journal of Immunology*. 39:2065–2075.

Toyama H., Okada S., Hatano M., Takahashi Y., Takeda N., Ichii H. a kol. (2002). Memory B cells without somatic hypermutation are generated from Bcl6-deficient B cells. *Immunity*. 17(3):329-39.

Uher O., Caisova V., Hansen P., Kopecky J., Chmelar J., Zhuang Z. a kol. (2019). Coley's immunotherapy revived: Innate immunity as a link in priming cancer cells for an attack by adaptive immunity. *Seminars in Oncology*. 46(4-5):385-392.

Uher O., Caisova V., Padoukova L., Kvardova K., Masakova K., Lencova R. a kol. (2021). Mannan-BAM, TLR ligands, and anti-CD40 immunotherapy in established murine pancreatic adenocarcinoma: understanding therapeutic potentials and limitations. *Cancer Immunology and Immunotherapy*. 70(1):1-10.

Unsoeld H. a Pircher H. (2005). Complex memory T-cell phenotypes revealed by coexpression of CD62L and CCR7. *Journal of Virology*. 79:4510–4513.

Valbon S. F., Condotta S. A., Richer M. J. (2016). Regulation of effector and memory CD8⁺ T cell function by inflammatory cytokines. *Cytokine*. 82:16–23.

Vesely M. D., Kershaw M. H., Schreiber R. D., Smyth M. J. (2011). Natural Innate and Adaptive Immunity to Cancer. *Annual Review of Immunology*. 29(1):235-271.

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

- Vinay D. S., Ryan E. P., Pawelec G., Talib W. H., Stagg J., Elkord E. a kol.** (2015). Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. *Seminars in Cancer Biology*. 35(4):185-198.
- Vincent A., Herman J., Schlick R., Hruban R. H., Goggins M.** (2011). Pancreatic cancer. *The Lancet*. 378(9791):607-620.
- Vivier E., Raulet D. H., Moretta A., Caligiuri M. A., Zitvogel L., Lanier L. L. a kol.** (2011). Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science*. 331:44–49.
- Vivier E., Tomasello E., Baratin M., Walzer T. a Ugolini S.** (2008). Functions of natural killer cells. *Nature Immunology*. 9:503–510.
- Vorlíček J., Abrahámová J., Vorlíčková H. a kol.** (2016). Klinická Onkologie pro sestry. Praha: Grada.
- Waldmannová E., Caisová V., Fáberová J., Sváčková P., Kovářová M., Sváčková D. a kol.** (2016). The use of Zymosan A and bacteria anchored to tumor cells for effective cancer immunotherapy: B16-F10 murine melanoma model. *International Immunopharmacology*. 39(2):295-306.
- Wherry E. J., Teichgraber V., Becker T. C., Masopust D., Kaeck S. M., Antia R. a kol.** (2003). Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets. *Nature Immunology*. 3:225–234.
- Williams M. A. a Bevan M. J.** (2007). Effector and memory CTL differentiation. *Annual Review of Immunology*. 25:171–192.
- Woodland D. L.** (2003). Cell-mediated immunity to respiratory virus infections. *Current Opinion in Immunology*. 15:430–435.
- Yamagiwa S., Gray J. D., Hashimoto S., Horwitz D. A.** (2001). A role for TGF- β in the generation and expansion of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells from human peripheral blood. *The Journal of Immunology*. 166(12):7282-7289.
- Yang J., Brook M. O., Carvalho-Gaspar M., Zhang J., Ramon H. E., Sayegh M. H. a kol.** (2007). Allograft rejection mediated by memory T cells is resistant to regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 104:19954–19959.

Youngblood B., Hale J. S., Kissick H. T., Ahn E., Xu X., Wieland A., Araki K. a kol. (2017). Effector CD8 T cells dedifferentiate into long-lived memory cells. *Nature*. 552:404.

Zhang Q. a Lakkis F. G. (2015). Memory T cell migration. *Frontiers in Immunology*. 6:504.

Zitvogel L., Tesniere A., Kroemer G. (2006). Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nature Reviews Immunology*. 6(10):715-727.