

Univerzita Karlova v Praze

2. lékařská fakulta

Studijní program: Postgraduální doktorské studium v biomedicině

Studijní obor: Experimentální chirurgie



MUDr. Ivo Minárik, FEBU

Dendritické buňky u solidních nádorů urogenitálního systému

Dendritic cells in solid tumors of urogenital system

Disertační práce

Školitel: Doc. MUDr. Ladislav Jarolím, CSc.

Praha, 2014

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 15.5.2014

MUDr. Ivo Minárik, FEBU

Identifikační záznam:

MINÁRIK, Ivo. *Dendritické buňky u solidních nádorů urogenitálního systému. [Dendritic cells in solid tumors of urogenital systém]*. Praha, 2014. 88str. Disertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova v Praze, 2. lékařská fakulta, Urologická klinika UK 2.LF a FN Motol 2014. Školitel Jarolím, Ladislav.

Seznam zkratek:

ADCC	buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách
CCL, CXCL	typy chemokinů
CCR	typ chemokinových receptorů
DC	dendritická buňka
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DTH	delayed type hypersensitivity
DU145	buněčná linie karcinomu prostaty
ELISPOT	enzyme linked immunosorbent spot
FGF	fibroblast growth factor
FoxP3	forkhead box P3, intracelulární protein
GM-CSF	granulocyty a monocyty kolonie stimulující faktor
HIF-1a	hypoxia inducible factor 1a
ICAM	intercellular adhesion molecule
IDO	indolamin-2,3-dioxygenáza
IFN α	interferon α
IFN γ	interferon γ
IL	interleukin
KLH	keyhole limpet hemocyanin
LNCap	buněčná linie karcinomu prostaty
mDC	myeloidní dendritické buňky
MDSC	myeloid derived suppressor cells
MHC	major histocompatibility complex
MICA, MICB	MHC class I polypeptide-related sequence A a B
MIC-1	macrophage inhibitory cytokine 1
MMP	matrix metaloproteináza
moDC	dendritické buňky derivované z monocytů
NCR	natural cytotoxicity receptor
NET	neutrophil extracapsular trap
NK	natural killer
NOX	NADPH oxidáza
PAP	kyselá prostatická fosfatáza
pDC	plasmacytoidní dendritické buňky
PD-L1	programmed death ligand 1
PDGF	platelet derived growth factor
PGE	prostaglandin E
poly I:C	polyinosinic:polycytidylic acid
PRR	pattern recognition receptor
PSA	prostatický specifický antigen
PSMA	prostatický specifický membránový antigen
RNA	ribonukleová kyselina
ROR γ t	receptor related orphan receptor γ t
SCID	severe combined immunodeficiency
TAM	tumor asociované makrofágy
TAN	tumor asociované neutrofilny
TAP	transporter associated with antigen
TCR	receptor T lymfocytů
TGF	transforming growth factor
Th	pomocný T lymfocyt
TIL	tumor infiltrující lymfocyty

TNF	tumor necrosis faktor
TLR	Toll-like receptor
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
Treg	regulační T lymfocyty
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor

Obsah

1	Abstrakt	6
2	Úvod do problematiky	8
2.1	<i>Úvod</i>	8
2.2	<i>Úloha jednotlivých složek imunity v obraně proti nádorům</i>	9
2.2.1	Vývoj názorů na vztah imunitního systému a nádorů	9
2.2.2	Nespecifické složky imunity	13
2.2.3	Dendritické buňky	16
2.2.4	Specifické složky imunity	19
2.3	<i>Význam imunitní reakce v nádoru na prognózu u vybraných tumorů</i>	22
2.3.1	Imunitní reakce u karcinomu prostaty	22
2.3.2	Imunitní reakce u karcinomu ovaria	23
2.3.3	Imunitní reakce u karcinomu ledviny	24
3	Imunoterapie nádorů urogenitálního systému	26
3.1	<i>Imunoterapie dendritickými buňkami u karcinomu prostaty</i>	28
3.2	<i>Imunoterapie dendritickými buňkami u karcinomu ovaria</i>	35
4	Hypotézy a cíle práce	37
4.1	<i>Metodické aspekty přípravy buněčné imunoterapie u karcinomu ovaria a prostaty</i>	37
4.2	<i>Imunoterapie pomocí dendritických buněk u pacientů s karcinomem prostaty</i>	37
4.3	<i>Analýza infiltrátu imunitních buněk u karcinomu ledviny</i>	38
5	Materiál a metodika	39
6	Výsledky a diskuze	40
6.1	<i>Metodické aspekty přípravy buněčné imunoterapie u karcinomu ovaria a prostaty</i>	40
6.1.1	Karcinom ovaria	40
6.1.2	Karcinom prostaty	51
6.2	<i>Imunoterapie pomocí dendritických buněk u pacientů s karcinomem prostaty</i>	56
6.3	<i>Analýza infiltrátu imunitních buněk u karcinomu ledviny</i>	68
7	Závěr	76
8	Poděkování	77
9	Seznam citované literatury	78
10	Seznam řešených grantů a vlastních publikací	86

1 Abstrakt

Léčba nádorových onemocnění za poslední půl století prošla dramatickou změnou. Základem léčby většiny nádorových onemocnění je léčba chirurgická. Alternativou lokální terapie je v některých případech radioterapie. Metastazující nádory jsou onemocněním systémovým a vyžadují proto léčbu chemoterapií, či jinou systémovou léčbu, např. imunoterapii v případě karcinomu ledviny, nebo novější léčbu biologickými preparáty. I tak v mnoha případech jsou tyto možnosti nedostatečné, a je proto nutné mít možnost pacientům nabídnout jinou, nejlépe cílenou léčbu „šitou na míru“. S rozvojem vědy v této oblasti v posledních 15 letech, jež vycházejí z nejnovějších vědeckých poznatků, se objevují klinické studie, které mají za cíl obnovit imunitní reakci vůči nádorovým buňkám a případnou nádorovou tkáň z těla eliminovat. Nicméně pro vývoj účinných imunoterapeutických vakcín je nutné především pochopit interakce jednotlivých nádorů s imunitním systémem. V první části práce se věnuji přípravě vakcíny z dendritických buněk u pacientů s karcinomem ovaria a prostaty. In vitro jsme prokázali schopnost diferenciaci dendritických buněk z periferních mononukleárů pacientů s oběma typy nádoru, schopnost pulzace dendritických buněk apoptotickými nádorovými buňkami, v případě karcinomu ovaria autologními nádorovými buňkami, u karcinomu prostaty buňkami nádorových linií LNCap a DU145. Maturované pulzované dendritické buňky exprimovaly maturační znaky CD83, kostimulační molekuly CD80 a CD86 a produkovaly důležité cytokiny. Takto připravené dendritické buňky indukovaly specifickou T lymfocytární odpověď. V další fázi práce se věnuji praktické přípravě vakcíny z dendritických buněk u pacienta s karcinomem prostaty a její optimalizace v GMP podmínkách. Jako nejvhodnější médium pro kultivaci v GMP podmínkách se ukázalo Cell Gro, maturace dendritických buněk pomocí poly I:C vedla k největší proliferaci specifických T lymfocytů a zároveň k nejnižší proliferaci regulačních T lymfocytů ze zkoušených maturačních činidel. Prakticky jsme pak vyzkoušeli aplikaci a efekt vakcíny u pacienta s metastatickým karcinomem prostaty. V poslední části práce se věnuji studiu nádorového infiltrátu u pacientů s karcinomem ledviny a jeho korelaci se stádiem onemocnění. V pozdních stádiích jsme pozorovali vyšší zastoupení neutrofilů a nižší počet plasmacytoidních dendritických buněk. Zastoupení regulačních T lymfocytů v infiltrátu ani periferní krvi nebyl závislý na stádiu nádorového onemocnění, nicméně pacienti měli oproti zdravým kontrolám počty regulačních T lymfocytů v periferní krvi zvýšené. Tyto výsledky naznačují změnu interakce imunitního systému s nádorovými buňkami v závislosti na stádiu onemocnění, což může v budoucnu ovlivnit vývoj protinádorové imunoterapie a její vhodné načasování.

Klíčová slova: karcinom ovaria, karcinom prostaty, karcinom ledviny, nádorový infiltrát, dendritické buňky, regulační T lymfocyty, neutrofil, imunoterapie, vakcína

In the last 50 years, the treatment of tumors has gone through a dramatic change. Surgery is still the basic treatment for most of the tumors. Alternatively localized tumors can be treated by radiotherapy. Metastatic tumors are systemic diseases and require chemotherapy or other forms of systemic treatment, e.g. immunotherapy in case of renal cancer or other forms of biological treatment. In spite of all new treatment methods which may eventually fail it is necessary to develop brand new approaches to treat cancer patients. In the last 15 years we can observe many clinical studies which focus on recovery of immune reaction against tumor cells and possibly tumor elimination. However, at first it is necessary to understand the interaction of immune system with tumor cells so that effective vaccines are developed. In the first part of this work, I focus on the preparation of dendritic cell vaccine for patients with ovarian and prostate cancer. We show that dendritic cells can be differentiated from peripheral mononuclear cells in both tumors in vitro, we were able to pulse dendritic cells with apoptotic tumor cell, in case of ovarian cancer with autologous tumor cells, in case of prostate cancer with prostate cancer cell lines LNCaP and DU145. Pulsed mature dendritic cells expressed maturation marker CD83, costimulatory molecules CD80 a CD86 and produced significant cytokines. These dendritic cells also induced specific T lymphocyte response. In the next part of the work we focused on practical aspects of preparation of dendritic cell vaccine in the patient with prostate cancer and optimization of preparation in GMP conditions. The best medium for cultivation turned out to be Cell Gro. Maturation of dendritic cell with poly I:C led to the highest proliferation of specific T lymphocytes and at the same time to the lowest proliferation of regulatory T lymphocytes. We administered the vaccine in a patient with metastatic prostate cancer and followed the clinical and immunological response. In the last part of the work we studied the dendritic cells, neutrophils and regulatory T lymphocytes in the blood and tumor infiltrate of patients with clear cell renal carcinoma and correlated the results with clinical stage. We found higher numbers of neutrophils and regulatory T lymphocytes in the peripheral blood of renal cancer patients than in healthy controls. We observed more neutrophils and less plasmacytoid dendritic cells in the tumor infiltrate in the advanced stage patients, however, we found no significant difference in the regulatory T lymphocytes in the tumor microenvironment when stage groups were compared. These results imply possible change in the interaction of immune system with tumor cells with respect to the disease stage which may influence the development of cancer immunotherapy and its appropriate timing.

Key words: ovarian cancer, prostate cancer, renal cancer, tumor infiltrate, dendritic cells, regulatory T lymphocytes, neutrophils, immunotherapy, vaccine

2 Úvod do problematiky

2.1 Úvod

Nádorová onemocnění jsou jednou z nejčastějších onemocnění ve vyšším věku a jsou zodpovědná přibližně za jednu třetinu mortality. Za rostoucí incidencí nádorových onemocnění stojí jednak prodloužení přežití, životní styl, ale také životní prostředí, ve kterém člověk žije. Diagnostika, ale i léčba se v posledních několika dekádách výrazně zdokonalily. Umožnily detekovat časnější stádia onemocnění, kdy je pravděpodobnost kompletního vyléčení nádorového onemocnění vyšší. Vývoj nových protinádorových léčiv umožňuje pacientům nabídnout léčbu, která jim dává šanci na delší přežití, zvýšení kvality života, ale také kompletní vyléčení (např. generalizované germinální nádory varlete). Nicméně stále velká skupina nádorů má v pozdějších stádiích malé šance na dlouhodobé přežití (např. karcinom plic, pankreatu, prostaty, apod.). Základem úspěšné léčby nádorových onemocnění je porozumění, jak nádorová buňka vzniká, jak v lidském těle přežívá, co umožňuje její nekontrolované množení a metastazování.

Již Charles Darwin ve své knize „O původu druhů“ z roku 1859 postuluje teorii o vztahu evoluce a přirozeného výběru ve vývoji živočišných i rostlinných druhů. Základním prvkem evoluce na genetické úrovni jsou mutace DNA, které ve výsledku mohou vést ke změně genomu, a tím umožňují vznik buněk, které následně soutěží s okolními buňkami o přežití. Stejnými principy se však řídí i nádorová buňka, potažmo celé nádorové onemocnění v lidském těle. Prvním krokem ve vývoji nádorového onemocnění je také mutace DNA ať na molekulární, či chromozomální úrovni. Důkazem jsou četné prokázané mutace v buňkách různých nádorů. Jediná mutace však na rozvoj onemocnění nestačí. Vliv prostředí a také další mutace jsou nutné pro rozvoj maligního tumoru a umožňují nádorové buňce se v organismu množit a získat navrch nad zdravými buňkami.

Pokud dojde k mutacím v DNA, má buňka několik mechanismů, kterými dokáže provedenou změnu opravit (reparační mechanismy na úrovni jednoho vlákna DNA nebo dvouvláknové DNA). Pokud však reparační mechanismy selžou, může buňka vstoupit do jednoho z následujících stavů: ireverzibilního stavu klidu tzv. senescence, apoptózy, nebo neregulovaného buněčného bujení tj. vzniká nádor. Pokud však regulační mechanismy na úrovni buňky nejsou dostatečně účinné, existuje v těle další kontrolní mechanismus, který může nádorovou buňku eliminovat: imunitní systém.

Tradiční možnosti terapie nádorů opírající se o léčbu chirurgickou, radioterapii a chemoterapii jsou v posledních 10 letech v některých indikacích vytlačovány novými tzv. biologickými léčivy ovlivňujícími imunitní systém, či nitrobuněčnou signalizaci. Tato léčiva mohou být necílená např. IFN α nebo IL-2 používaný u karcinomu ledviny ev. melanomu. Užití těchto léků bývá zatíženo nežádoucími celkovými příznaky, které mohou vést k předčasnému ukončení léčby. Druhou skupinou jsou léky,

kteře jsou cílené na konkrétní molekuly ovlivňující růst nádorových buněk, či na mechanismy intracelulárního přenosu signálu (např. tyrozin kinázy - sunitinib, mTOR inhibitory - temsirolimus apod.). Velkého rozvoje se dočkaly také cílené protilátky např. bevacizumab (anti VEGF) u karcinomu ledviny a kolorektálního karcinomu, transtuzumab (anti ErbB2) u karcinomu prsu a další. Nejnovější preparáty se však snaží přiblížit fyziologické formě eliminace nádorových buněk (např. Sipuleucel T u karcinomu prostaty). Abychom dokázali takovéto účinné léky produkovat, musíme podrobně poznat chování nádorových buněk, jejich mikroprostředí a interakce s imunitním systémem a okolními tkáněmi. V této práci se zaměřuji na složení buněk imunitního systému v karcinomu ledviny a dále optimalizaci vývoje vakcíny z dendritických buněk (hlavní antigen prezentující buňky v lidském těle) u karcinomu prostaty a ovariálního karcinomu.

2.2 Úloha jednotlivých složek imunity v obraně proti nádorům

2.2.1 Vývoj názorů na vztah imunitního systému a nádorů

2.2.1.1 *Teorie „Immunosurveillance“*

První zmínky o možném vlivu imunitního systému na nádory formuloval v roce 1909 Paul Ehrlich (Ehrlich, P, 1909). Svou teorii nemohl dokázat, a proto také téměř dalších 50 let trvalo, než v roce 1957 Macfarlane Burnet and Lewis Thomas veřejně formulovali hypotézu tzv. „immunosurveillance“ (Burnet, FM, 1970, Burnet, M, 1964, Thomas, L, 1959). Své závěry opírali o teorii nádorových antigenů, která vycházela z průkazů, kdy myši mohly být imunizovány proti syngenním transplantátům různých nádorů (Klein, G, 1966, Old, LJ, 1964). V následujících letech však tato teorie byla dočasně zavržena na základě pozorování Stutmana, který sledoval vliv karcinogenu methylcholanthrenu (MCA) na počet a dobu do vývoje nádoru u CBA/H kmene myší a jejich wild-type protějšku (Janikashvili, N, 2011). Neprokázal rozdíl mezi těmito dvěma skupinami. V té době však nebyly k dispozici genově upravené myší modely, které by dokázaly vyloučit adaptivní imunitní odpověď. CBA/H kmen představoval imunodeficientní myši, které vykazovaly mírnou produkci $\alpha\beta$ -T lymfocytů, a tím alespoň částečně zachovalou adaptivní imunitní odpověď. Navíc chyběly poznatky o dalších složkách imunity, jako jsou NK buňky a $\gamma\delta$ -T lymfocyty, které také přispívají k eliminaci nádorových buněk. Nicméně výsledky pozorování byly tak přesvědčivé a podpořeny výsledky z jiných pracovišť (Barreira da Silva, R, 2011), že na delší dobu byl koncept „immunosurveillance“ zavržen.

Renesanci tento koncept zažil až v 90. letech minulého století, kdy se prokázal vliv deplece IFN- γ pomocí neutralizačních protilátek na vývoj imunogenního fibrosarkomu u myší (Dighe, AS, 1994).

Současně také byl prokázán protektivní vliv IFN- γ na transplantované, chemicky indukované i spontánní tumory. Dalším důležitým důkazem byl objev, že myši, kterým chybí gen pro perforin (pfp^{-/-}), jsou více náchylné ke tvorbě tumorů. Perforin je důležitou součástí cytolytických granul cytotoxických T-lymfocytů a NK buněk. Tyto myši po vystavení vlivu MCA tvoří signifikantně více tumorů (van den Broek, ME, 1996).

Teorie „immunosurveillance“ byla dále podpořena pozorováními na myších, kterým chybí gen RAG-2 (RAG-2^{-/-}). Tyto myši nemají možnost rekombinace antigenních receptorů na T, B i NKT buňkách. Tímto mechanismem jsou vyloučeny možnosti adaptivní imunity, a tím jejich vliv na eliminaci nádorových buněk. Tyto inbrední myší kmeny tvořily spontánní sarkomy časněji a ve vyšší frekvenci než jejich wild-type protějšky (Shankaran, V, 2001). Jiná měření na inbredních myších kmenech prokázaly vliv deplece konkrétních skupin buněk např. NK buněk, $\alpha\beta$ -T lymfocytů, $\gamma\delta$ -T lymfocytů (Girardi, M, 2001).

U lidí je teorie „immunosurveillance“ podpořena analýzou registrů transplantovaných pacientů. U takto imunosuprimovaných lidí je vyšší incidence jednak virově indukovaných nádorů (EB virus, human papillomavirus, apod.), tak také spontánních nádorů (Penn, I, 1995, Penn, I, 1999).

Někteří autoři se také zaměřili na studování tumor infiltrujících lymfocytů v nádorech a jejich vliv na prognózu pacienta. V těchto případech, jako jsou nádory prsu (Rilke, F, 1991), střeva (Draube, A, 2011), prostaty (Epstein, NA, 1976), vaječníků (Deligdisch, L, 1982), rekta nebo melanomu (Clemente, CG, 1996), množství infiltrátu pozitivně korelovalo s prognózou pacienta. Tím podpořili myšlenku úlohy imunitního systému v prevenci či eliminaci nádorů.

2.2.1.2 Vliv imunitního systému na vývoj nádorů

Můžeme si položit otázku: „Proč vznikají tumory u zdravých lidí s normálním imunitním systémem?“ Příčina tkví v selektivním tlaku imunitního systému na nádorové buňky, jenž vede k dalšímu růstu buněk, které imunitní systém nerozezná. Tuto teorii podporují studie většinou aplikované na myších. Příkladem je růst nádorů kultivovaných v imunodeficientních myších (RAG-2^{-/-}) nebo jejich imunokompetentních protějšcích. Tyto nádory poté byly transplantovány opět do RAG-2^{-/-} myší, či jedinců s normální imunitou. Nádory kultivované na imunokompetentním pozadí rostly stejně rychle u RAG-2^{-/-} i wild-type jedinců. Naopak nádory kultivované v imunodeficientním pozadí byly z velké části rejekovány u wild-type jedinců, kdežto u imunodeficientních myší rostly ve všech případech (Shankaran, V, 2001). Jiná studie podporuje stejné závěry. Sarkomy ze SCID myší byly častěji rejekovány než sarkomy z wild-type jedinců, pokud byly transplantovány wild-type jedincům (Engel, AM, 1997). Shrnutí dohromady, nádorové buňky jsou vystaveny vlivu imunitního systému, což vede

ke snížení jejich imunogenicity, či získávají schopnost potlačit lokální imunitní odpověď. Za změny je odpovědná genetická nestabilita nádorových buněk, které tím mají možnost se rychleji adaptovat na přežití. Dochází ke genetickým změnám nádorových antigenů, mutacím genů kódujících molekuly MHC nebo komponenty receptoru pro IFN- γ (Lengauer, C, 1998). Tento proces je nejdůležitější právě v prvopočátcích nádorového bujení, v jeho mikroskopické velikosti, kdy se rozhoduje, zda nádorová buňka přežije. Nicméně je současně zodpovědný za další schopnosti nádorů, např. metastazování.

2.2.1.3 *Immunoediting*

Role imunitního systému ve vývoji nádorového onemocnění není jen supresivní, ale také dokáže pozitivně podpořit rozvoj nádorů, proto termín „immunosurveillance“ nedostatečně popisuje komplexní interakci mezi imunitním systémem a nádorem. Nově se setkáváme s termínem „immunoediting“, který právě ve své podstatě zahrnuje vícero role imunitního systému ve vývoji tumorů (Dunn, GP, 2002). Principem immunoeditingu jsou 3 základní fáze (tři „E“): eliminace, ekvilibrium (rovnováha), escape (únik). Fáze eliminace odpovídá dříve zmíněnému termínu „immunosurveillance“, tj. zničení nádorových buněk v jejich prvopočátku.

Ve fázi rovnováhy imunitní systém nedokáže nádorovou buňku eliminovat, buňka přežívá, ale je ve stádiu klidu. Jedná se pravděpodobně o nejdelší ze tří fází. Prvními důkazy podporující existenci fáze rovnováhy byly studie, ve kterých wild-type myším byla pod kůži aplikována nízká dávka MCA. U malého počtu myší došlo k časnému rozvoji kožního tumoru. Pokud se zbylé části myší aplikovaly protilátky proti CD4+, CD8+ T-lymfocytům, proti IFN- γ nebo IL-12, došlo k růstu kožních nádorů i u této skupiny myší. Na druhou stranu, pokud se myším aplikovaly protilátky, které ruší funkci NK buněk, tj. buněk nespecifické imunity zodpovědných za eliminaci nádorů, nedošlo k rozvoji kožních nádorů (Koebel, CM, 2007). Na základě těchto experimentů můžeme vyvodit, že za fázi rovnováhy je zodpovědná specifická část imunity. Zajímavé jsou také výsledky experimentů, které se zaměřily na imunogenicitu nádorových buněk v rovnováze. Nádory, které vznikly po eliminaci buněk specifické imunity protilátkami, jsou vesměs vysoce imunogenní, proto po jejich transplantaci do jiných imunokompetentních wild-type myší došlo k jejich zničení. Naopak zřídka spontánní nádory u myší, které dostaly kontrolní protilátky, po jejich transplantaci imunokompetentním wild-type myším rostly progresivně. V souhrnu lze říct, že nádorové buňky ve stádiu rovnováhy jsou vysoce imunogenní, kdežto ty, které spontánně rostly dále, mají imunogenicitu výrazně omezenou, tj. prošly editací (Koebel, CM, 2007).

Stádium úniku je charakterizováno ztrátou schopnosti imunitního systému eliminovat nebo kontrolovat nádorové buňky. Dochází k množení buněk, které nakonec vede k manifestaci nádoru.

Rychle dělící se nádorové buňky jsou náchylné k četným genetickým i epigenetickým změnám a tím získávají schopnost se přizpůsobit prostředí. Dochází k selekci buněk, které mají největší šanci na přežití. Mechanismy, jak uniknout imunitnímu systému jsou různé. Nádory mohou indukovat imunologickou toleranci. Mohou také ztratit schopnost prezentovat antigeny na svém povrchu (ztráta MCH-I molekul, TAP1, apod.), ztratit reaktivitu na interferony. Nespecifické imunitní reakci mohou uniknout ztrátou ligandu NKG2D nebo supresí produkce prozánětlivých molekul, což vede k poruše maturace dendritických buněk. Eliminaci imunitními buňkami mohou také zabránit zvýšenou produkcí antiapoptotických molekul (FLIP, BCL-XL) nebo produkcí inaktivních forem receptorů pro indukci apoptózy (TRAIL, DR5, Fas). Nádorové buňky mohou kontaktně ovlivňovat funkci efektorových buněk imunitního systému, např. produkci PD-L1, HLA-G, HLA-D, a tím utlumit cytotoxickou reakci T-lymfocytů či přímo indukovat jejich apoptózu. Exprese HLA-G a HLA-E může indukovat toleranci antigen prezentujícími buňkami nebo potlačit efekt NK buněk. Nádorové buňky mají schopnost tlumit imunitní reakci i parakrinním či endokrinním mechanismem. Secernují do okolí solubilní ligandy pro NK buňky nebo T-lymfocyty. Dokážou produkovat steroly, které inhibují expresi CCR7 na povrchu dendritických buněk, a tím znemožňují migraci DC do lymfatických uzlin, které jsou hlavním místem prezentace antigenů efektorovým T-lymfocytům. Produkují VEGF, který jednak tlumí DC, ale také umožňuje angiogenezi. Uvolňují další cytokiny např. TGF β , který přímo inhibuje funkci DC, T-lymfocytů a NK buněk. Další cytokin, IL-10, také inhibuje DC a vede ke změně z Th1 na Th2 reakci, která je méně účinná vůči nádorovým buňkám. Regulační T-lymfocyty se často hromadí v nádorech, kde potlačují efektorové T-lymfocyty. Cytokiny produkované nádorem vedou k lokální expanzi tzv. MDSC (myeloid derived suppressor cells), které vícerými mechanismy dále inhibují lokální imunitní reakci. Toto je jen malý výčet možností, jak se nádorová buňka brání imunitní reakci. Výsledné onemocnění je tak výsledkem interakcí mezi eliminačními schopnostmi imunitního systému a supresivními schopnostmi nádorových buněk.

Důkazem editace imunitním systémem u lidí jsou pozorování spontánní regrese některých tumorů např. melanomů (Zorn, E, 1999), či solitárních plicních metastáz karcinomu ledviny. Také množství a kvalita tumor infiltrujících lymfocytů mají vliv u některých nádorů na prognózu dalšího vývoje onemocnění, tím dokazují úlohu imunitního systému v rozvoji nádorů. Zajímavým prognostickým faktorem u mnoha nádorů, který také poukazuje na editaci imunitním systémem, je tzv. mikrosatelitní nestabilita. Jedná se o specifický typ genové nestability, kdy defekty tzv. DNA mismatch repairu vedou k duplikaci či delecí krátkých opakovaných sekvencí (mikrosatelitů). Tumory s vysokým počtem mikrosatelitů produkují nové antigeny, a tím indukují lokální imunitní reakci, která poté úspěšně eliminuje nádor (Buckowitz, A, 2005). Na stádium rovnováhy můžeme usuzovat i z několika dalších klinických zkušeností. U mnoha nádorů se mohou objevit metastázy s velkým

odstupem od eliminace primárního nádoru. Příkladem jsou tumory prostaty (Weckermann, D, 2001), ledviny, prsu apod. Toto stádium označujeme na minimální reziduální nemoc, kterou nejsme schopni detekovat, ale má signifikantní klinickou hodnotu, proto zodpovídá za pozdější tvorbu metastáz. Důkazem role imunitního systému v udržování rovnováhy ve stádiu minimální reziduální nemoci jsou imunosuprimovaní pacienti s anamnézou nádorového onemocnění, u kterých po mnoha letech nádorové onemocnění relabovalo v souvislosti s imunosupresí (Callaway, MP, 1989). Podobným příkladem jsou transplantovaní pacienti, u kterých se manifestoval spící nádor dárce, který však žádný pozorovatelný nádor neměl (Myron Kauffman, H, 2002). Příkladem, na kterém lze přímo pozorovat imunitní reakci ve stádiu rovnováhy, je tzv. monoklonální gamapatie nejistého významu. V kostní dřeni můžeme pozorovat silnou T buněčnou reakci proti premaligním buňkám, avšak u mnohotného myelomu již tato reakce chybí (Dhodapkar, MV, 2003).

Vývoj nádoru je komplexní děj, který zahrnuje jednak změny na úrovni buňky, tak také interakce mezi nádorovou buňkou a imunitním systémem. Imunitní systém má schopnost eliminovat nádorové buňky již v prvopočátku, nicméně i tak mohou některé nádorové buňky tuto reakci přežít a dále se množit. Pokud má imunitní systém dostatečnou sílu, může ještě nádorové buňky udržet v rovnováze, nicméně takovéto buňky v těle přežívají a jsou základem pozdější manifestace nádorového onemocnění. V posledních 10-15 letech můžeme pozorovat nové metody léčby nádorů, které inkorporují podporu imunitního systému v eliminaci nádorových buněk. Cílem těchto postupů je buď kompletní eliminace, nebo alespoň uvedení nádorových buněk do stádia rovnováhy. V tomto směru jsem se ve spolupráci s pracovníky Ústavu imunologie UK 2.LF a FN Motol zaměřil na studium imunitní reakce v nádorech ledviny a na vývoj vakcíny u karcinomu prostaty a ovaria.

2.2.2 Nespecifické složky imunity

2.2.2.1 Neutrofilly

Neutrofilly představují nejpočetnější skupinu leukocytů v cirkulující krvi (50-70%). Tvoří se z prekurzorů v kostní dřeni pod vlivem G-CSF, jehož produkce se zvyšuje v závislosti na IL-17A, který je produkován Th17 buňkami. Tato buněčná populace se diferencuje z naivních CD4+ T buněk pod vlivem IL-23 produkovaným makrofágy a dendritickými buňkami, obzvláště v době zánětu. Neutrofilly produkují několik typů granul – azurofilní granula obsahující myeloperoxidázu, defenziny, specifická granula obsahující laktoferrin a terciální granula obsahující matrix metaloproteinázu 9 (MMP9, gelatináza B). Tyto molekuly plní svou funkci v době zánětu, kdy neutrofilly fagocytují cizorodé organismy a uvolňují do fagozomů či extracelulárně myeloperoxidázu, čímž dochází k tvorbě reaktivních kyslíkových radikálů, dále plejádu aktivních molekul – katepsiny, lysozym, defenziny, či

laktoferrin, jejichž úkolem je cizí mikroorganismus eliminovat. Nedávno objeveným mechanismem eliminace jsou tzv. NET (neutrophil extracellular traps). Jedná se o shluk DNA elementů s navázanými molekulami katepsinu, laktoferrinu, myeloperoxidázy ev. elastázy, které jsou vypuštěny do extracelulárního prostoru v okolí neutrofilů. V těchto shlucích jsou pak zachyceny a usmrceny mikroorganismy.

Neutrofilové bezpochyby hrají důležitou úlohu v imunitní reakci proti nádorům. Spolu s NK buňkami a makrofágy představují značnou část buněčné populace tumor infiltrujících buněk, která je závislá na stádiu nádoru. Influx neutrofilů do nádorů je pod vlivem chemokinů produkovaných nádorovými buňkami (např. CXCL6, IL-8, G-CSF, GM-CSF) (Gijssbers, K, 2005), samotnými neutrofilami (CXCL1,2,6, CCL3), tumor infiltrujícími lymfocyty nebo makrofágy (IL-8, CCL3) (Fridlender, ZG, 2012). Zvýšené množství neutrofilů v některých nádorech se ukázalo jako nepříznivý prognostický faktor přežití pacientů s metastatickým a lokalizovaným onemocněním (Donskov, F, 2006, Jensen, HK, 2009). Na druhou stranu v některých nádorech je vyšší influx neutrofilů spojen s lepší prognózou (Caruso, RA, 2002). Tuto diskrepanci můžeme vysvětlit 2 typy neutrofilů, které byly v nádorech prokázány (TAN - tumor asociované neutrofilové). N1 TAN mají antitumorózní efekt, produkují TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-12, podporují influx dalších buněk imunitního systému produkcí chemokinů, prezentují antigen T lymfocytům, a tím podporují eliminaci nádorové buňky. Na druhou stranu N2 TAN mají protumorózní efekt, dozrávají v prostředí s TGF β , produkují MMP9, která usnadňuje proces metastazování (Opdenakker, G, 2004) a současně dochází k uvolňování VEGF a FGF-2 z extracelulárního prostoru, dále produkují arginázu rozkládající arginin potřebný ke správné funkci T-lymfocytů (Piccard, H, 2012). Neutrofilové také přispívají k extravazaci cirkulujících nádorových buněk a tím usnadňují zakládání vzdálených metastáz. Zprostředkovávají adhezi k endotelovým buňkám přes β 2 integrin v rámci interakce s ICAM1 exprimovaným na povrchu endotelových buněk. Současně však cirkulující nádorové buňky také produkují ICAM1, přes který se navážou na neutrofilové (Liang, S, 2005). Jiným způsobem, kterým nádorové buňky využívají neutrofilové k zakládání vzdálených metastáz, jsou dříve zmíněné NET, kdy nádorové buňky jsou zachyceny v síti extracelulárně vypuštěné DNA (Cools-Lartigue, J, 2013). Těchto poznatků lze v budoucnu využít pro zlepšení účinnosti imunoterapeutických metod.

2.2.2.2 Makrofágy

Makrofágy představují heterogenní populaci buněk, které se diferencují z krevních monocytů. Hrají úlohu v regulaci adaptivní imunitní odpovědi, účastní se procesů hojení ran a eliminaci infekčních agens. V prostředí akutního zánětu vyvolané např. přítomností bakterií dochází ke klasické aktivaci

makrofágů (M1 makrofágy), jež se vyznačují vysokou produkcí IL-12 a IL-23 a současně nízkou produkcí IL-10, produkují reaktivní kyslíkové radikály a exprimují ve větším množství MHC-II. V důsledku těchto pochodů dochází k diferenciaci Th1 lymfocytů, které svou produkcí IFN- γ podporují makrofágy v eliminaci cizorodého agens nebo tumoru. Opačným pólem jsou alternativně aktivované makrofágy za přítomnosti IL-4 nebo IL-13 produkované při Th2 imunitní odpovědi, např. při eliminaci parazitů, makrofágy aktivované imunokomplexy s TLR ligandy nebo IL-10, TGF β či glukokortikoidy. Vyznačují se sníženou produkcí IL-12, IL-23 a zvýšenou produkcí IL-10, mají sníženou schopnost prezentovat antigen, působí protizánětlivě, podporují angiogenezi a hojení ran. V nádorech se vyskytují makrofágy (TAM – tumor asociované makrofágy), které svými fenotypy jsou blízké M2 makrofágům. Jejich koncentrace v nádorech je způsobena produkcí chemokinů nádorovými buňkami např. CCL2, či jinými cytokiny VEGF, PDGF a M-CSF. Kumulují se více v oblastech s hypoxií, dochází k vyšší expresi HIF-1 α (Talks, KL, 2000), a tím k podpoře angiogeneze přes VEGF a uvolněným FGF z extracelulární matrix. Produkují různé typy MMP (např. MMP9 (Giraud, E, 2004)), které přispívají k remodelaci extracelulární matrix a usnadňují podobně jako neutrofilů invazi nádorových buněk do stromatu. TAM také svou produkcí IL-10 a TGF β společně s MDSC potlačují lokální imunitní reakci v nádorové tkáni (preferenci Th2 odpovědi, potlačení NK buněk, podpora diferenciaci regulačních T lymfocytů).

2.2.2.3 MDSC

Jedná se heterogenní skupinu nezralých myeloidních buněk, které jsou zvýšeny u všech pacientů s nádory. Jak již dříve bylo zmíněno, dělí se na 2 skupiny – monocytární a granulocytární. MDSC potlačují imunitní odpověď několika mechanismy: a) produkují reaktivní kyslíkové i dusíkové radikály, které způsobují disociaci ζ řetězce z receptorů T lymfocytů (Ezernitchi, AV, 2006), přerušují signalizaci přes IL-2 receptor, zabraňují rozeznání komplexu peptid/MHC-I, b) produkují arginázu, c) brání migraci T lymfocytů do uzlin produkcí ADAM 17, který vede ke snížení exprese L-selektinu na T-lymfocytech, d) svou produkcí IL-10, TGF β preferují influx a lokální diferenciaci regulačních T lymfocytů (Serafini, P, 2008). MDSC také přes IL-10 ovlivňují TAM směrem k M2 diferenciaci a svými působky se vzájemně potencují. MDSC přispívají k dysfunkci dendritických buněk v nádoru přes IL-10: omezují migraci dendritických buněk, jejich dozrávání, jejich produkci IL-12.

2.2.2.4 NK buňky

NK buňky patří mezi buňky nespecifické imunity, které mají schopnost rozlišovat stresem postižené buňky např. nádorové buňky, infikované buňky, chemickým nebo fyzikálním stresem ovlivněné

buňky. Svůj cytopatický efekt uplatňují díky uvolněným perforinům a granzymům, jež poškozují cílovou buňku. Produkují také IFN- γ , který také potencuje účinnost klasicky aktivovaných M1 makrofágů v eliminaci fagocytovaných buněk. NK buňky exprimují na svém povrchu receptory, které můžeme rozdělit do 2 základních skupin: inhibiční a aktivační (Moretta, L, 2005). Aktivita NK buněk závisí tom, který ze stimulů v danou chvíli převažuje. Základním ligandem pro inhibiční receptory (Freud, AG, 2014) (např. komplex CD94/NKG2A) jsou molekuly MHC-I třídy exprimované na každé zdravé buňce v těle. U některých virových, či nádorových onemocnění dochází ke snížení exprese MHC-I, jakožto jeden z mechanismů úniku detekce cytotoxickými T lymfocyty. V těchto případech dojde ke snížení inhibice a NK buňky se stanou v danou chvíli buňkami efektorovými. Současně stresem postižené buňky exprimují na svém povrchu vyšší množství ligandů pro aktivační receptory a tím je aktivační proces NK buňky dále potencován. Nejlépe prozkoumaným aktivačním receptorem je NKG2D, jehož ligandy jsou MICA (MHC class I polypeptide-related sequence A) a MICB, jejichž exprese se zvyšuje např. na povrchu buněk, jejichž DNA byla poškozena (Vivier, E, 2012). Jinými aktivačními receptory, které hrají úlohu v rozeznání nádorové buňky, jsou tzv. NCR (natural cytotoxicity receptor). Mezi tyto receptory se řadí NKp30, jehož ligandem je B7-H6 exprimovaný na povrchu některých nádorových buněk (Vivier, E, 2012). Jiným aktivačním receptorem je také Fc γ RIIIA, který má se váže na Fc fragmenty imunoglobulinu G na opsonizovaných buňkách a zprostředkovává tzv. ADCC (cytotoxicitu závislou na protilátkách). Tohoto fenoménu se využívá při protinádorové imunoterapii pomocí aplikovaných protilátek.

2.2.3 Dendritické buňky

2.2.3.1 *Obecná charakteristika dendritických buněk*

Dendritické buňky jsou profesionální antigen prezentující buňky v lidském těle. Spojují nespecifickou imunitní reakci s adaptivní reakcí. Jejich hlavním úkolem je zpracovat antigeny v lidském těle a prezentovat je buňkám specifické imunitní reakce. Způsob, jakým dendritické buňky prezentují antigeny na svém povrchu, vede buď eliminaci antigenu, nebo k jeho toleranci. Naivní CD8+ T lymfocyty interagují s komplexy MHC-I + peptid a naivní CD4+ T lymfocyty reagují s MHC-II + peptid na povrchu DC.

Dendritické buňky během svého života prochází několika stádii. Nezralé DC jsou charakterizovány vysokou fagocytární aktivitou. Pokud však dostanou současně další signály cestou tzv. PRR (tzv. pattern recognition receptor), dendritické buňky dozrávají. Dendritické buňky mění svůj tvar charakterizovaný výběžky, získávají schopnost cestovat do lymfoidních orgánů. Během maturace je schopnost fagocytózy výrazně omezena, komplexy MHC-II + peptid jsou reorganizovány a přemístěny

na povrch buňky. Současně dochází k vyšší expresi kostimulačních molekul jako CD40, CD58, CD80 a CD86, jež jsou nevyhnutelnou součástí interakce DC a T-lymfocytů. V jejich přítomnosti a příznivém složení okolních cytokinů jsou specifické lymfocyty aktivovány. V případě absence kostimulačních molekul, či nepříznivém složení cytokinů (např. IL-10, či TGF- β) dochází k delecí specifických T-lymfocytů nebo indukci regulačních T-lymfocytů.

Vzhledem k rozličnosti chemického složení antigenů existují také různé podtypy dendritických buněk, které na příslušné antigenní podněty odpovídají. V lidském těle můžeme rozdělit dendritické buňky na dvě základní skupiny: *myeloidní dendritické buňky* (mDC) a *plasmacytoidní dendritické buňky* (pDC). Myeloidní DC jsou charakterizovány vysokou expresí CD11c, kdežto plasmacytoidní DC tuto molekulu neexprimují. Obě skupiny se odlišují expresí podtypů PRR, pod které patří např. TLR (Toll-like receptory), a tím také stimuly, na které reagují. Plasmacytoidní dendritické buňky jsou podobné plasmatickým buňkám svou cytoplasmou (odtud jméno). Exprimují BDCA-2 a BDCA-4 molekuly (Dzionek, A, 2000). Reagují převážně na virové podněty produkcí interferonů typu I, a tím zodpovídají za imunitu proti virovým agens (Colonna, M, 2004). Myeloidní dendritické buňky exprimují ve vysokém počtu molekuly MHC-II a CD11c, po maturaci také exprimují molekulu CD83. Podle dalších molekul se dají rozdělit na podtypy BDCA-1 (CD1c), BDCA-3 a CD16. Podtyp CD1c+ mDC jsou nejpotentnějšími antigen prezentujícími buňkami ze všech 3 podtypů (MacDonald, KP, 2002), a proto jsou také nejvíce prostudovány. Zvláštní skupinou dendritických buněk, které se v klidovém stavu organismu nevyskytují, jsou tzv. z monocytů derivované dendritické buňky (moDC). Tyto buňky vznikají in vivo z monocytů v podmínkách zánětu. Současně se také nejčastěji používají in vitro k výrobě vakcín. K jejich diferenciaci in vitro se používají GM-CSF a IL-4. Od nezralých myeloidních DC se liší vyšší expresí MHC-II a kostimulačních molekul v klidovém stádiu, jinou schopností aktivovat T-lymfocyty a také jinak odpovídají na některé fyziologické podněty (Jefford, M, 2003).

K indukci imunitní odpovědi na cizorodý antigen potřebuje dendritická buňka dostat ještě další podnět k tomu, aby na svém povrchu vystavila kostimulační molekuly. Tento stimul dávají dendritické buňce tzv. PAMP (pathogen associated molecular pattern) přes receptory zvané PRR. Byly popsány 2 základní skupiny PRR – lektiny typu C a Toll-like receptory (TLR), které byly podrobněji prostudovány. U člověka bylo dosud popsáno 10 TLR. TLR-10 má neznámou funkci, u dalších 9 byla funkce podrobněji zjištěna. V základě můžeme TLR rozdělit na 2 skupiny – intracelulární v endosomech (TLR-3,7,8,9) a TLR na povrchu buňky (TLR-1,2,4,5,6). Obecně lze říct, že intracelulární TLR detekují komponenty nukleových kyselin např. RNA (TLR-3,7,8) nebo CpG DNA (TLR-9) z virů či bakterií. TLR na povrchu DC detekují fragmenty buněčné stěny bakterií nebo virů (TLR-4 – lipopolysacharid, TLR-5 – flagelin, TLR-2 – peptidoglykan). Stimuly přes různé TLR vedou k různé odpovědi přes MyD88 cestu nebo TRIF (Hovanessian, AG, 2007). Jednotlivé podskupiny dendritických buněk se liší expresí TLR na

svém povrchu, a tím se také liší svou funkcí u různých patologických stavů. Myeloidní DC v krvi a moDC exprimují podobné spektrum TLR, tj. všechny kromě TLR-9. MoDC exprimují více TLR-4, ale neprodukují TLR-10. Plasmacytoidní DC jsou charakterizovány produkcí intracelulárních TLR – TLR-9 a TLR-7. Reagují na virovou RNA a CpG DNA vysokou produkcí IFN typu 1, nebo IL-6 a TNF- α , maturují, mění svůj tvar v typicky dendritický a také zvyšují expresi kostimulačních molekul.

Poznatek nutnosti koaktivace DC přes PRR se využívá v produkci vakcín proti nádorovým onemocněním. Zpočátku, když nebyly známy stádia vývoje dendritické buňky, se používaly nezralé DC, které však mohly mít za následek indukci tolerance vůči antigenu, kterým byly stimulovány. V dnešní době se používají in vitro jednotlivé ligandy pro TLR k produkci zralých DC, které mají schopnost cestovat do lymfatických uzlin a tam indukovat imunitní reakci.

2.2.3.2 Dendritické buňky v prostředí nádoru

V současnosti je známo, že mikroprostředí nádoru hraje významnou úlohu v udržení růstu nádoru i v jeho schopnosti uniknout eliminaci imunitními buňkami. Mechanismů úniku je celá řada (viz str.12). Víme, že imunitní buňky se v nádorech shromažďují a jejich fenotyp je prognostickým faktorem mnoha nádorů (Mahmoud, SM, 2011). V nádorovém mikroprostředí můžeme nalézt celou řadu buněk, které vedou k toleranci nádorové buňky nebo supresi imunitní reakce vůči nádoru. Jednou skupinou jsou makrofágy. V prostředí s M-CSF, TNF- α , TGF- β a IL-10 mění makrofágy svou funkci, napomáhají supresi Th1 a cytotoxické T-lymfocytární odpovědi, eliminují apoptotické nádorové buňky, produkují VEGF, čímž napomáhají neovaskularizaci (Geissmann, F, 2010). Tumor infiltrující neutrofilové také mohou mít různé fenotypy. Buď se účastní eliminace nádorových buněk (N1 neutrofilové), nebo naopak pod vlivem TGF- β se mění jejich fenotyp (N2 neutrofilové). Napomáhají proteolýzou intercelulární matrix, lokální imunopresí, urychlují angiogenezi (Gregory, AD, 2011). Další skupinou buněk umožňující růst nádoru jsou tzv. MDSC (myeloid derived suppressor cells). Jedná se o heterogenní skupinu buněk, které můžeme pozorovat v periferní krvi a nádorech. Dělí se na 2 základní skupiny: monocytární a granulocytární. Obě skupiny výrazně infiltrují nádorovou tkáň, kde tvoří 30-70% všech leukocytů. Supresivního účinku dosahují produkcí arginázy, NO nebo reaktivních kyslíkových radikálů (Nagaraj, S, 2010). Také dendritické buňky infiltrují nádorovou tkáň. Představují vysoce heterogenní skupinu buněk, která může obsahovat myeloidní DC, plasmacytoidní DC, ale také dendritické buňky se změněnou funkcí pod vlivem okolních cytokinů např. IL-10, TGF- β , VEGF nebo PGE2. Tyto buňky mohou snížit expresi MHC-II, kostimulačních molekul CD80, CD86, CD40 vedoucí k anergii T lymfocytů nebo indukci regulačních T-lymfocytů (Flavell, RA, 2010). Tyto buňky také

produkují jiné spektrum cytokinů např. IL-10, TGF- β nebo indolamin-2,3-dioxygenázu (IDO), které zpětnou vazbou ovlivňují další buňky imunitního systému.

2.2.4 Specifické složky imunity

2.2.4.1 T lymfocyty

Specifická imunita v lidském těle je charakteristická zaměřením imunitní reakce proti danému antigenu, schopností paměti a rychlé odpovědi na opakovanou expozici antigenu, ale také vysokou diverzitou rozeznávaných molekul. Specifickou imunitní reakci v lidském těle dělíme na dvě základní skupiny: humorální a buněčná. Hlavní úlohou humorální imunity, za kterou odpovídají B lymfocyty a plasmatické buňky, je produkce imunoglobulinů se specifitou k danému antigenu. Imunoglobuliny antigen buď neutralizují (např. v případě toxinů), opsonizují (antigen je např. součástí povrchu bakterie) s následnou fagocytózou makrofágy nebo odpovídají za tzv. buněčnou cytotoxicitu závislou na protilátkách (ADCC – antibody dependent cell-mediated cytotoxicity), při které jsou buňky s exprimovaným antigenem lyzovány NK buňkami nebo monocyty, které na svém povrchu exprimují Fc γ R111A receptor. Buněčná imunita však hraje centrální úlohu v iniciaci specifické imunitní reakce (T helpery) v součinnosti s antigen prezentujícími buňkami, v eliminaci buněk postižených intracelulárními mikroby (CD8+ cytotoxické T lymfocyty, Th1 buňky pomocí uvolněného IFN- γ zvyšují účinnost fagocytózy u makrofágů), v eliminaci parazitů (Th2 buňky) a některých extracelulárních mikrobů, hub (Th17 buňky). Na druhou stranu musí být tento typ imunitní odpovědi regulován a to na úrovni centrální (v centrálních lymfoidních orgánech eliminací klonů reagujících proti vlastním antigenům apoptózou, diferenciací v regulační T lymfocyty), tak na úrovni periferní (anergie, regulační T lymfocyty, apoptóza).

Protinádorová imunita má však svá specifika. Nádorové buňky během svého života vzhledem ke své genové nestabilitě produkují velké množství defektních proteinů, kterou jsou imunitním systémem rozeznány, avšak mikroprostředí nádorů vede k defektní imunitní odpovědi, která v důsledku může nádorový růst podpořit. Hlavními efektorovými buňkami jsou cytotoxické CD8+ T lymfocyty, které rozeznávají komplex peptid/MHC I. Jejich finální diferenciací z naivních lymfocytů probíhá v lymfatických uzlinách při interakci s antigen prezentujícími buňkami, které prezentují antigen ve spojení s MHC I. Takto již diferencované cytotoxické T lymfocyty následně cestují krevním oběhem do nádoru, kde interagují s nádorovými buňkami, ve kterých vyvolávají apoptózu. Nádorové mikroprostředí však tomuto průběhu imunitní reakce nenahrává. Přítomnost vyššího množství TGF β produkovaného nádorovými buňkami, makrofágy a MDSC inhibuje v cytotoxických T lymfocytech produkci granzymu A i B, IFN γ , FasL i signalizaci přes TCR (Thomas, DA, 2005). TGF β také indukuje

expresi FoxP3 v cytotoxických T lymfocytech, čímž se stávají regulačními ve své funkci (Chaput, N, 2009).

Antigen prezentující buňky exprimují také komplex antigen/MHC II, mají schopnost aktivace naivních pomocných T lymfocytů, které se za příslušných podmínek (produkce IL-12 dendritickými buňkami) diferencují v Th1 lymfocyty. Tyto buňky jsou poté uvolněny do oběhu a organizují se v nádorech. Produkují např. TNF a IFN- γ . Tento interferon zvyšuje expresi MHC I na nádorových buňkách, současně aktivuje makrofágy klasickou cestou. Společně s cytotoxickými T lymfocyty pak Th1 buňky přispívají k eliminaci nádorových buněk. Tento scénář lze však považovat za ideální a odpovídá fázi dříve zmíněné immunosurveillance, či immunoediting, kdy je nádor s imunitním systémem v rovnováze a je klinicky němý. Postupem času jsou však vyselektovány nádorové buňky, které jsou schopny se imunitnímu systému ubránit. Takové buňky produkují např. TGF β , IL-10 potlačující imunitní reakci. Uvolňují také chemokiny, které přitahují leukocyty do nádoru, které však působí prorůstově a usnadňují proces invaze a zakládání metastáz (N2 neutrofilů, M2 makrofágy, MDSC). TGF β má také přímý vliv na diferenciaci Th buněk (Maeda, H, 1996), které se preferenčně diferencují směrem k Th2 buňkám a za pomoci IL-4, IL-13 i IL-10 podporují expanzi M2 makrofágů. Pod vlivem TGF β , nezralých dendritických buněk a M2 makrofágů se část infiltrujících CD4+ T lymfocytů diferencuje v regulační T lymfocyty (tzv. indukované Treg) (Beyer, M, 2006), které v součinnosti s přirozenými regulačními T lymfocyty (nTreg – CD4+ CD25+ FoxP3+) inhibují lokální imunitní reakci v nádoru. Regulační T lymfocyty exprimují na povrchu CD39 a CD73, jež jsou ektonukleotidázy, které konvertují ATP na AMP nebo adenosin (Maeda, H, 1996). Regulační T lymfocyty produkují také PDE2, který společně s AMP a adenosinem mají silný imunopresivní účinek na ostatní efektorové T lymfocyty.

Zvláštní skupinou pomocných T lymfocytů v nádorech jsou nedávno identifikované Th17 lymfocyty. Jedná se o samostatný typ pomocných T lymfocytů, které se účastní imunitní reakce proti některým extracelulárním bakteriím, houbám, či prvokům. Za fyziologických podmínek zodpovídají za bariérovou imunitu ve sliznicích. Produkují IL-17, ale také IL-2, GM-CSF, TNF nebo IFN γ (Kryczek, I, 2009). Ve vývoji Th17 hrají důležitou úlohu IL-1 β a IL-23, jejichž zdrojem v nádorovém mikroprostředí jsou hlavně makrofágy. Jejich efekt na eliminaci nádorových buněk je nepřímý. IL-17 indukuje v nádorových buňkách sekreci prozánětlivých chemokinů CXCL9 a CXCL10 (Kryczek, I, 2009), které přitahují do nádoru efektorové T lymfocyty. Th17 buňky produkují také CCL20, který do nádoru přitahuje dendritické buňky, které efektivně stimulují cytotoxické T-lymfocyty v nádorech. Nicméně se zdá, že v některých nádorech mohou mít Th17 buňky pronádorový efekt a jejich zvýšené množství koreluje s horším přežitím (Sfanos, KS, 2008). Na druhou stranu počet Th17 buněk v některých nádorech nepřímo úměrně koreluje s regulačními T lymfocyty (Kryczek, I, 2009) a jejich počet

pozitivně koreluje s přežitím (Miyahara, Y, 2008). V některých nádorech byly prokázány IL-17+FoxP3+ T lymfocyty, které exprimují CD25 a ROR γ t (receptor related orphan receptor- γ t – specifický pro Th17 buňky). Tato populace buněk má supresivní účinek (Beriou, G, 2009, Voo, KS, 2009) na imunitní protinádorovou reakci.

2.2.4.2 B lymfocyty

B lymfocyty v lidském organismu zodpovídají za humorální část specifické imunitní odpovědi, produkují protilátky - imunoglobuliny. Hrají důležitou úlohu v eliminaci extracelulárních patogenů (již dříve zmíněná neutralizace, opsonizace, ADCC), ale také udržují slizniční imunitu v GIT, či dýchacím systému. Nacházejí se v krvi, extracelulárních prostorech, shromažďují se ve specializovaných orgánech – lymfatické uzliny, slezina, Peyerovy plaky a lymfoidní folikuly ve sliznicích. B lymfocyty mají schopnost antigenní prezentace - exprimují na svém povrchu komplex MHC II/antigen, a tím jej prezentují dalším imunitním buňkám (Th lymfocyty). Pokud se současně naváže antigen na receptor (IgM, IgD) na povrchu B lymfocytu, dochází k jeho aktivaci a proliferaci. Během proliferace, která probíhá v germinálních centrech, dochází k tzv. somatické hypermutaci, při které jsou produkovány imunoglobuliny s vyšší afinitou k antigenu. Ostatní klony, které ztrácí afinitu, jsou eliminovány. Tímto způsobem vyselektované buňky se diferencují v plasmatické buňky, které uvolňují velké množství volných imunoglobulinů do krevního oběhu, odkud se dostávají do cílových tkání.

Imunitní reakce vyvolaná B lymfocyty v nádorové tkáni může být antitumorozní, ale také protumorozní. Imunoglobuliny specifické proti nádorovým antigenům nádorovou buňku opsonizují a následně může dojít k navázání komplementu, či eliminaci pomocí NK buněk (ADCC) (DiLillo, DJ, 2011). B lymfocyty se aktivně podílejí na prezentaci nádorových antigenů T lymfocytům, a tím imunitní reakci podporují (DiLillo, DJ, 2010). V nádorech mohou tvořit terciální folikuly, kde tumor infiltrující B lymfocyty prezentují nádorové antigeny efektorovým T lymfocytům. Dle secernovaných cytokinů (IFN γ , IL-4) polarizují Th buňky směrem k Th1, Th2, či k alternativním funkčním fenotypům (Linnebacher, M, 2012). Na druhou stranu však nemusí být prezentace antigenu doprovázena dostatečnou kostimulací, a tím dochází k anergii či apoptóze specifických T lymfocytů. Protilátky mohou s nádorovými antigeny tvořit komplexy, které jsou fagocytovány makrofágy, což podporuje jejich migraci do nádoru. V mikroprostředí nádoru mohou makrofágy působit supresivně. B lymfocyty také mohou produkovat IL-10 nebo TGF β (regulační B lymfocyty). Tento typ buněk může přímým kontaktem utlumit cytotoxické T lymfocyty, ale také podpořit diferenciaci CD4+ lymfocytů v regulační T lymfocyty (Olkhanud, PB, 2011).

2.3 Význam imunitní reakce v nádoru na prognózu u vybraných tumorů

2.3.1 Imunitní reakce u karcinomu prostaty

Jak je z předchozích kapitol zřejmé, imunitní systém hraje klíčovou úlohu ve vývoji, ale také rozvoji nádorových onemocnění. Nejinak je tomu u karcinomu prostaty. Vesalainen a kol (Vesalainen, S, 1994) ve své studii korelovali prognózu pacientů s Ca prostaty (lokalizovaný i metastatický) s gradíngem onemocnění, perineurální invazí, ale také s množstvím tumor infiltrujících T lymfocytů (TIL). Malý počet nebo absence TIL bylo spojeno s kratším přežíváním pacientů. Na druhou stranu v pozdějších pracích můžeme vysledovat zdánlivě rozporuplné výsledky. Vyšší počet tumor infiltrujících lymfocytů spíše zhoršuje prognózu pacientů s lokalizovaným Ca prostaty, zkracují čas do biochemické recidivy onemocnění (Karja, V, 2005), či nádorově specifické přežití (McArdle, PA, 2004). Rozporuplnost můžeme vysvětlit jednak jinak definovanou kohortou pacientů, ale také analýzou tumor infiltrujících T lymfocytů. McArdle (McArdle, PA, 2004) již diferencuje TIL na CD4+ a CD8+ lymfocyty. Právě vyšší počet CD4+ T lymfocytů souvisí s horší prognózou pacientů s lokalizovaným, lokálně pokročilým, ale také s metastatickým karcinomem prostaty. Objev regulačních T lymfocytů a možnost jejich analýzy pomocí exprese FoxP3 umožňuje podrobnější rozbor T lymfocytů v krvi i nádorové tkáni karcinomu prostaty. Nemocní s Ca prostaty mají vyšší počet regulačních T lymfocytů v krvi než zdravé kontroly (Miller, AM, 2006). Současně regulační T lymfocyty infiltrují více nádorovou tkáň než okolní benigní tkáň prostaty u stejného pacienta (Miller, AM, 2006). Davidsson a kol prokázali negativní korelaci mezi infiltrací karcinomu prostaty regulačními T lymfocyty a celkovým přežitím pacientů (Davidsson, S, 2013). Kromě CD4+ regulačních T lymfocytů byly detekovány v karcinomu prostaty CD8+ regulační T lymfocyty, které suprimují ostatní imunitní buňky hlavně přímým kontaktem (Kiniwa, Y, 2007). Supernatanty z karcinomu prostaty mají také imunopresivní účinek, přitahují regulační T lymfocyty, a to hlavně přítomností CCL22 (ligand pro CCR4 exprimovaný na regulačních T lymfocytech) (Miller, AM, 2006).

Makrofágy, jejich M2 varianta, mají stejně jako regulační T lymfocyty pozitivní vliv na rozvoj nádorového bujení. Jejich počet je vyšší v karcinomu prostaty než v tkáni benigní hyperplasie, či normální tkáni prostaty (Fujii, T, 2013). Větší počet makrofágů byl zaznamenán v nádorech s vyšším Gleasonovým gradem (Gollapudi, K, 2013). Nonomura a kol sledovali počty makrofágů v karcinomu prostaty v závislosti na PSA, Gleasonovo skóre, klinickém stádiu (Nonomura, N, 2011). Infiltrace makrofágy byla větší u nemocných s vyšším Gleasonovým skóre, vyšším klinickým stádiem, vyšším iniciálním PSA a u nemocných s biochemickou recidivou.

Nádorové buňky karcinomu prostaty ovlivňují buňky imunitního systému také pomocí cytokinů. Vedle TGF β (Diener, KR, 2009) má pronádorový účinek také MIC-1 (macrophage inhibitory cytokine

1), jehož množství je v nádorové tkáni zvýšeno (Nakamura, T, 2003) a současně pozitivně koreluje s agresivitou tumoru a klinickým stádiem (Brown, DA, 2009). Jiným cytokinem, který pozitivně ovlivňuje růst karcinomu prostaty, je IL-6. Nádorové buňky ve zvýšené míře produkují IL-6 i IL-6R (Hobisch, A, 2000), hlavně v pozdních metastazujících stádiích. IL-6 aktivuje androgenní receptor, a tím se podílí na progresi onemocnění (Culig, Z, 2012).

Obecně můžeme shrnout, že u pacientů s nádorem prostaty s rostoucím stádiem a agresivitou onemocnění stoupá zastoupení regulačních T lymfocytů, M2 makrofágů a cytokinů, které podporují růst nádoru.

2.3.2 Imunitní reakce u karcinomu ovaria

Karcinom ovaria patří mezi nejletálnější gynekologické tumory. Většina nemocných je diagnostikována v pokročilých stádiích a vesměs mají špatnou prognózu. Pro výzkum však karcinom ovaria představuje relativně snadný zdroj dostatečného množství nádorové tkáně a možnost analýzy ascitické tekutiny. Většina publikovaných studií s karcinomem ovaria se zaměřuje na tumor infiltrující lymfocyty. Zhang a kol jako první prokázali pozitivní korelaci mezi CD3+ lymfocyty v nádorovém epitelu a celkovým přežitím pacientek (Zhang, L, 2003). Nádory s vyšším počtem CD3+ lymfocytů obsahovaly větší množství IL-2 a IFN γ na rozdíl od nádorů s vyšší produkcí VEGF, kde počet CD3+ lymfocytů byl výrazně nižší a byly spojeny s časnou recidivou onemocnění. V jiné studii Tomšová také prokázala, že CD3+ lymfocyty jsou nezávislým pozitivním prognostickým faktorem (Tomsova, M, 2008).

Stejně jako u karcinomu prostaty i nádory ovaria obsahují regulační T lymfocyty, produkují TGF β a suprimují CD8+ T lymfocyty (Woo, EY, 2001). Curiel a kol prokázali asociaci mezi CD4+ CD25+ T lymfocyty a špatnou prognózou pacientek (Curiel, TJ, 2004). Tyto lymfocyty exprimovaly FoxP3, GITR a CTLA-4 a in vitro suprimovaly proliferaci CD3+ CD25- lymfocytů. Počet regulačních T lymfocytů byl vyšší v ascitu i nádorech pokročilejších stádií. Jiným prognostickým znakem může být poměr mezi intraepiteliálními CD8+ T lymfocyty a regulačními T lymfocyty, kdy vyšší poměr znamená delší přežití pacientek (Sato, E, 2005).

Nádory jsou vysoce metabolicky aktivní a vyžadují vysoký příjem živin a kyslíku. Nicméně některé nádory nestíhají doplňovat zásoby včas a dochází ke tkáňové hypoxii. Samozřejmě hypoxické prostředí má negativní vliv na imunitní reakce. Může dojít k degradaci FoxP3 v CD4+ T lymfocytech a se současným zvýšením Th17 T lymfocytů. Na druhou stranu při tkáňové hypoxii je zvýšená produkce HIF-1a (hypoxia inducible factor 1a), který v důsledku vede k zvýšené expresi FoxP3. Townsend a kol sledovali vliv hypoxie (stanovenou nepřímo vaskularitou tumoru, produkcí CD31 a VEGF) na prognózu

pacientů s ovariálním karcinomem. Pacientky s tumory s nižší vaskularitou přežívaly kratší dobu pravděpodobně na základě suprese imunitní reakce v hypoxické tkáni (Townsend, KN, 2013).

Nádorové buňky mají i další možnosti úniku před imunitní reakcí. Mohou produkovat PD-1L, který se váže na PD-1 receptor na povrchu T lymfocytů, který v nich indukuje apoptózu. Nádory ovaria, které exprimovaly na svém povrchu ve zvýšené míře PD-1L, zabraňují průniku cytotoxických T lymfocytů do nádoru, jsou agresivnější a výrazně zkracují celkové přežití pacientek (Hamanishi, J, 2007).

B lymfocyty hrají také významnou úlohu v imunitní reakci v nádorech ovaria. Tumor infiltrující B lymfocyty v ovariální karcinomech vykazují známky aktivace (aktivační markery, exprese IgG, somatická hypermutace a oligoklonalita), avšak IgG produkované těmito lymfocyty nekoreluje se sérovými protinádorovými protilátkami, což naznačuje, že tyto lymfocyty se neúčastní humorální imunitní odpovědi proti nádoru (Nielsen, JS, 2012). Místo toho B lymfocyty exprimují markery typické pro antigen prezentující buňky – CD80, CD86, MHC-I a MHC-II. V těsné blízkosti těchto buněk byly pozorovány CD8+ T lymfocyty. Nádory s pozitivitou B lymfocytů a CD8+ T lymfocytů měly lepší prognózu, což svědčí pro aktivní roli B lymfocytů v prezentaci antigenů a aktivaci cytotoxických T lymfocytů (Nielsen, JS, 2012).

Tumor infiltrující makrofágy fenotypu M2 byly prokázány také v karcinomech ovaria. Jsou charakteristické expresí CD163 a CD204, diferencují se v přítomnosti IL-6 a M-CSF a přispívají k progresi nádoru (Duluc, D, 2007). Agresivnější tumory ovaria obsahují větší počet tumor infiltrujících makrofágů a produkují větší množství M-CSF (Kawamura, K, 2009).

I dendritické buňky mají defektní funkci v nádorech ovaria, produkují IL-10, exprimují na svém povrchu PD-1. Inaktivace PD-1 na povrchu DC vede ke snížení IL-10, zvýšení IL-2 a IFN γ při interakci s T lymfocyty (Curiel, TJ, 2003).

Souhrnně můžeme konstatovat, že podobně jako v jiných nádorech i u karcinomu ovaria je vyšší počet regulačních T lymfocytů a M2 makrofágů v nádorovém infiltrátu spojen s horší prognózou, naopak vyšší počet B lymfocytů a cytotoxických CD8+ T lymfocytů přispívá k delšímu přežívání pacientek. Interakce nádorových buněk s imunitními je však mnohem komplexnější. Není plně objasněna úloha jiných imunitních buněk např. Th17 lymfocytů. Nádorové buňky karcinomu ovaria ovlivňují složení infiltrátu nejen produkovanými cytokiny, ale také přímým kontaktem.

2.3.3 Imunitní reakce u karcinomu ledviny

Karcinom ledviny zahrnuje skupinu mnoha typů maligních tumorů, které se liší histologickou stavbou i biologickým chováním. Nejčastěji se jedná o světlobuněčný karcinom. Na rozdíl od maligních

tumorů jiných orgánů je světlobuněčný karcinom radio i chemorezistentní. Na druhou stranu se však u generalizovaného stádia jako u jednoho z mála začala již v minulosti používat imunoterapie, která u části pacientů měla efekt a u některých dokonce vedla ke kompletní remisi onemocnění. Byly dokonce zaznamenány spontánní regrese plicní metastázy po odstranění primárního tumoru. Z těchto poznatků můžeme usuzovat na imunogenicitu tohoto typu tumoru. Čím je charakteristické mikroprostředí světlobuněčného karcinomu? Influx CD8+ T lymfocytů je u mnoha solidních tumorů spojen s lepší prognózou. U karcinomu ledviny je tomu jinak. Větší počet CD8+ i CD4+ T lymfocytů bývá u agresivnějších tumorů a je spojen s kratším přežitím pacientů (Nakano, O, 2001). Infiltrát je charakteristický polarizací Th1, což je potvrzeno expresí CXCR3 a produkcí lytických granul (Prinz, PU, 2012). CD8+ T lymfocyty z nádorového infiltrátu se však chovají ex vivo atypicky. Nereagují na stimulaci, nedochází k mobilizaci, ani degranulaci lytických granul, neprodukují typické cytokiny charakteristické pro cytotoxickou reakci. Pravděpodobnou příčinou je potlačení přenosu signálu z TCR do jádra pomocí diacylglycerol kinázy α , jejíž zvýšená exprese je právě charakteristická pro renální karcinom (Prinz, PU, 2012). Charakteristika CD4+ T lymfocytů se také u různých stádií a gradingu nádoru liší. V časných stádiích onemocnění CD4+ T lymfocyty exprimují markery typické pro Th1 lymfocyty (CXCR3, CCR5, CD45RO, and CD95) (Cozar, JM, 2005). V pokročilých stádiích CD4+ T lymfocyty exprimují CCR4, který se v nádorech nachází na povrchu terminálně diferencovaných regulačních T lymfocytů. Tohoto poznatku se nově využívá v klinických studiích (Sugiyama, D, 2013), v kterých antiCCR4 protilátky snižují množství regulačních T lymfocytů v nádorech. I v jiných studiích byl potvrzen vyšší počet regulačních T lymfocytů jak v krvi, tak nádorech pokročilých stádií (Ning, H, 2012, Polimeno, M, 2013). Na druhou stranu byly publikovány výsledky, ve kterých přítomnost CD4+ CD25+ FoxP3- T lymfocytů spíše než CD4+ CD25+ FoxP3+ T lymfocytů (přirozené regulační T lymfocyty) pozitivně korelovaly s TNM stádiem, velikostí tumoru, přítomností nekrózy i nádorovou mortalitou (Siddiqui, SA, 2007).

Stejně jako u jiných solidních nádorů i u renálního karcinomu tvoří velkou část nádorového infiltrátu tumor asociované makrofágy, méně pak dendritické buňky. V pozdějších stádiích se vyskytují častěji makrofágy typu M2, které produkují TGF β , TNF α , VEGF, PDGF, ale i jiné pronádorové molekuly (Balkwill, F, 2009, Santoni, M, 2013). Tyto makrofágy signifikantně zhoršují prognózu pacienta (Dannenmann, SR, 2013). Na druhou stranu s příznivou prognózou je asociovaná přítomnost zralých dendritických buněk charakterizovaných expresí CD83 (Kobayashi, M, 2007), které efektně prezentují antigen naivním T lymfocytům. V renálním karcinomu byla však popsána další zvláštní skupina dendritických buněk, které jsou CD209+ (nezralé dendritické buňky), ale současně exprimují CD14 a CD163 (znaky makrofágů). Diferencují se v přítomnosti IL-6, IL-8 a VEGF, které se často v renálních karcinomech nacházejí, vylučují matrix metaloproteinázu 9 (MMP9) a TNF α , jež oba podporují růst a

metastazování nádorových buněk (Figel, AM, 2011). Funkci efektorových T lymfocytů však nepotlačují. Nosiči nádoru s vysokým obsahem těchto dendritických buněk měli špatnou prognózu (Figel, AM, 2011).

Z předchozích studií je zřejmé, že výsledky publikovaných studií u karcinomu ledviny jsou kontroverzní. Ve vztahu k jednotlivým podtypům karcinomu ledviny a k prognóze pacienta je nutné podrobněji prozkoumat vlastnosti a interakce jednotlivých typů buněk v nádorovém infiltrátu.

3 Imunoterapie nádorů urogenitálního systému

Imunoterapie má u nádorů urogenitálního systému již dlouhou historii. Standardem léčby povrchových nádorů močového měchýře s vysokým rizikem progresu onemocnění je BCG aplikovaný opakovaně intravesikálně. BCG prokazatelně snižuje riziko recidivy i progresu onemocnění. Po aplikaci BCG do měchýře mykobakteria adherují na urotel pomocí FAP (fibronectin attachment protein) a pronikají do intersticia, kde indukují výraznou zánětlivou odpověď s influxem neutrofilů (75%) a makrofágů (25%) (de Boer, EC, 1991, Kavoussi, LR, 1990, Zhao, W, 1999). V pozdější fázi převažuje CD4+ imunitní odpověď. U pacientů po BCG vakcinaci nalézáme v moči zvýšené množství prozánětlivých cytokinů (IL-1, -2, -6, -8 a -12, TNF, IFN- γ a GM-CSF) (Shintani, Y, 2007, Schamhart, DH, 2000), což svědčí o převaze Th1 odpovědi, která je důležitá pro eliminaci nádorových buněk. Důležitou úlohu hraje také TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand), molekula z TNF rodiny, která indukuje apoptózu v nádoru. TRAIL byl prokázán ve zvýšeném množství v intracelulárních zásobách neutrofilů, které tím přispívají k lokální imunitní odpovědi. V moči BCG responderů bylo prokázáno vyšší množství TRAIL (Ludwig, AT, 2004).

Z urologických nádorů se imunoterapie používala u generalizovaného stádia renálního karcinomu, který je radio i chemorezistentní. Do praxe se zavedly 2 preparáty – IFN α a IL-2. Podávání IFN α u pacientů s dobrou prognózou dle Motzerových kritérií, se světlobuněčným karcinomem a plicními metastázami vykazovalo signifikantní klinický efekt u 6-15% pacientů s 25% snížením rizika progresu a prodloužením přežití o 3-5 měsíců (Coppin, C, 2005, Motzer, RJ, 2002). Monoterapie IL-2 je obdobná monoterapii IFN α , ale je zatížena častějšími nežádoucími účinky (Coppin, C, 2005). Monoterapie IFN α nebo IL-2 je účinná u pacientů se světlobuněčným karcinomem a s dobrou prognózou a může být u vybraných pacientů použita (Ljungberg, B, 2010). V posledních letech však monoterapie IFN α nebo IL-2 byla vytlačena novými preparáty – VEGF inhibitory (bevacizumab), inhibitory tyrosin kináz (sunitinib, sorafenib, pazopanib) a mTOR inhibitory (temsirolimus, everolimus), které významně prodloužily přežití pacientů a množství pacientů s odpovědí na léčbu. IFN α si však stále drží místo

v kombinaci s bevacizumabem. Tato kombinace je stále jednou z možností první volby terapie pacientů s nízkým a středním rizikem (Ljungberg, B, 2010).

Až do nedávna byla imunoterapie v léčbě karcinomu prostaty i ovaria na okraji zájmu. Nicméně v posledních letech přinesl výzkum v této oblasti velké pokroky. Rozvoj výzkumu imunitních interakcí v nádorech přinesl s sebou také různé imunoterapeutické postupy, které si kladou za cíl eliminovat nádorovou tkáň za cenu co nejmenších vedlejších účinků. Nejčastěji se setkáváme s postupy využívající cílenou buněčnou odpověď nebo cílených protilátek.

Celobuněčné vakcíny z nádorových buněk přinášejí možnost prezentace většího počtu nádorových antigenů imunitnímu systému nicméně s nutností podpory rozvoje imunitní reakce, např. pomocí současného podání BCG (Michael, A, 2005) nebo pomocí transfekce genu pro GM-CSF (GVAX vakcína) (Ward, JE, 2007). Ani jedna z provedených studií však u generalizovaného karcinomu prostaty neprokázala větší účinnost než standardní zavedená terapie (docetaxel + prednison) nebo podávání placeba.

Peptidové vakcíny využívají stejného principu vyvolání imunitní reakce proti konkrétnímu antigenu. Výhodou je snazší produkce a skladování takového antigenu. Tyto vakcíny se však vyznačovaly nižší účinností díky slabé imunogenicitě, ale také díky mutaci, či ztrátě daného antigenu na povrchu nádorové buňky. Další nevýhodou je HLA restrikce daného antigenu. Příkladem lze uvést studii Meidenbauera, který zkoumal, zda vakcína z rekombinantního PSA s lipidem A nebo v kombinaci s GM-CSF stimuluje expanzi specifických efektorových T-lymfocytů (Meidenbauer, N, 2000). Dva z 10 pacientů měli PSA reaktivní T-lymfocyty již před začátkem studie, kdežto po ukončení byl prokazatelný efekt u 8 z 10 pacientů. Noguchi srovnával efekt peptidové vakcíny se současným podáváním estramustinu (Noguchi, M, 2005). Do studie fáze I/II bylo zahrnuto 16 pacientů. Vakcína byla individualizována podle kolujících peptid-specifických T-lymfocytů či peptid-reaktivních imunoglobulinů G. Všechny 13 pacientů s kombinovanou terapií mělo pokles PSA, z nichž 6 mělo pokles vyšší než 50%.

DNA vakcíny využívají plasmidů kódující nádorový antigen, např. PSA, PSMA (prostatický specifický membránový antigen), PAP (kyselá prostatická fosfatáza). Jejich účinnost je také omezená pravděpodobně díky slabé schopnosti plasmidů in vivo proniknout do antigen prezentujících buněk (Becker, JT, 2010). Novější přístupy kombinují aplikaci DNA plasmidů se současným podáním např. GM-CSF, což u některých pacientů s karcinomem prostaty vede k prodloužení zdvojeovacího času PSA (PSA-dt) a průkazu T buněčné odpovědi vůči danému antigenu (McNeel, DG, 2009). Jako výhodnější se jeví použití mRNA, kterou lze aplikovat přímo nebo obalenou v liposomech, či transfekovanou do

dendritických buněk. Studií s RNA však není publikováno mnoho (Fotin-Mleczek, M, 2012). Její využití s dendritickými buňkami bude popsáno v dalším textu.

Virové vektory lze také úspěšně použít jako protinádorové vakcíny. Mají výhodu ve vysoké imunogencitě a možnosti nést větší množství genetického materiálu. Nejčastěji se používají viry pravých (vaccinia) a ptačích neštovic (fowlpox viry) spadajících do skupiny Pox virů nesoucích dvouvláknovou DNA. Z těch novějších postupů lze uvést studii s pacienty s karcinomem prostaty, u nichž byla testována vakcína PROSTVAC. Vakcína obsahuje směs virů s geny kódující PSA a geny kódující kostimulační molekuly. Celkové přežití pacientů i 3 leté přežití bylo u pacientů v aktivním rameni signifikantně delší v rámci studie fáze II (Madan, RA, 2009).

Poslední dobou se setkáváme s imunoterapeutickými postupy kombinující různé strategie u pacientů s karcinomem prostaty. Jednou z možností je deplece regulačních T lymfocytů pomocí nízké dávky cyklofosfamidu nebo denileukinu (IL-2 fúzovaný s difterickým toxinem) (Litzinger, MT, 2007). V současné době probíhají studie kombinující PROSTVAC vakcínu s ipilimumabem (anti CTLA-4).

3.1 Imunoterapie dendritickými buňkami u karcinomu prostaty

Dendritické buňky jakožto nejpotentnější antigen prezentující buňky mají schopnost iniciovat imunitní reakci. Jak již bylo popsáno v předchozích kapitolách, dendritické buňky jsou v nádorovém mikroprostředí modifikovány a jejich schopnost podpořit protinádorovou imunitní reakci je výrazně potlačena. Ex vivo upravených pulzovaných dendritických buněk se v imunoterapeutických postupech setkáváme již více než 15 let. Jedinou FDA schválenou vakcínou využívající princip aktivní buněčné terapie u pacientů s kastrofálně rezistentním karcinomem prostaty (CRPC) je Sipuleucel-T (Kantoff, PW, 2010). Jedná se o první schválenou protinádorovou vakcínu v léčbě onkologického onemocnění. Principem této vakcíny jsou autologní antigen prezentující buňky, které jsou ex vivo pulzovány hybridním proteinem prostatické kyselá fosfatázy a GM-CSF. Následně je přípravek čerstvý aplikován zpět pacientům intravenózně (Small, EJ, 2000). Tento přípravek prošel několika studiemi fáze III. V prvních dvou studiích označené D9901 a D9902A byl Sipuleucel-T srovnáván s placebem (Higano, CS, 2009). Primárním cílem bylo srovnání doby do progresu onemocnění. V průběhu studií však vyšlo najevo, že většina pacientů progredovala ještě dříve, než dostali plnou dávku vakcíny. Rozdíl v době do klinické nebo radiologické progresu byl statisticky nesignifikantní. Doba celkového přežití ve skupině se Sipuleucelem-T byla ale o 4,3 měsíců delší ($p=0,011$). Na základě těchto výsledků autoři zkonstruovali další studii fáze III (IMPACT) (Kantoff, PW, 2010). Jednalo se o dvojitě zaslepenou randomizovanou studii, do které bylo zahrnuto 512 pacientů, z nichž 341 dostalo sipuleucel-T a 171

placebo. Primárním cílem studie bylo celkové přežití, sekundárním cílem pak doba do progresu. Medián celkového přežití byl ve skupině se sipuleucelem-T 25,8 měsíců, v placebo skupině 21,7 měsíců ($p=0,03$). Pravděpodobnost přežití 36 měsíců od randomizace byla 31,7% se sipuleucelem-T a 23% s placebem. Na druhou stranu nebyl statisticky signifikantní rozdíl v době do progresu (14,6 × 14,4 měs.).

V následujícím článku jsou přehledně shrnuty další studie s dendritickými buňkami u pacientů karcinomem prostaty. Článek byl publikován v časopise Polish Journal of Urology v roce 2007 (Minárik, I, 2007).

3.2 Imunoterapie dendritickými buňkami u karcinomu ovaria

Karcinom ovaria je nádorové onemocnění, se kterým většina pacientek přichází již v pozdním stádiu s metastázami, pouze 15% přichází s lokalizovaným onemocněním. Tumory ovaria díky volnému prostoru v okolí mohou růst nepozorovaně dlouhou dobu. Prognóza pacientek v pozdních stádiích je však špatná. Proto i u tohoto tumoru existují snahy pacientkám nabídnout alternativní možnosti léčby než samotnou chemoterapii. Jednou z perspektivních možností jsou i u tohoto tumoru vakcíny z dendritických buněk. Stejně jako u karcinomu prostaty narážíme na problém výběru antigenu pro pulzaci dendritických buněk – NY-ESO-1 (New York esophageal-1), CA-125, HER2/neu, MUC1, folátový receptor α jsou definované peptidy, či proteiny, které mohou být u karcinomu ovaria zvýšeny. Stejně tak se však mohou použít lyzáty, DNA, či mRNA nádorových buněk. Genetické informace kódující tumor asociované antigeny mohou být dodány dendritickým buňkám také pomocí virových vektorů.

Publikovaných studií ve srovnání s karcinomem prostaty není mnoho. V roce 2002 Hernando a kol. ve studii I. fáze prokázali, že pomocí dendritických buněk pulzovaných nádorovým lyzátem karcinomu ovaria a KLH dochází u některých pacientek po opakovaných aplikacích vakcíny k vývoji imunitní reakce proti KLH i nádorovému lyzátu (DTH reakce, ELISPOT) (Hernando, JJ, 2002). Stejní autoři poté v roce 2007 publikovali kazuistiku, ve které pacientka po debulkingu a chemoterapii měla relaps v uzlinách (Hernando, JJ, 2007). Pacientka dostala kúru 10 vakcín z dendritických buněk pulzovaných mRNA kódující folátový receptor α . Po 6. vakcíně se prokazatelně zvýšil počet CD4+ a CD8+ T lymfocytů produkujících IFN γ . Ještě 16 měsíců po ukončení vakcinace byla regrese uzlinového postižení větší než 50%.

V roce 2000 Brossart a kol. prokázali, že pacientky s karcinomem mammy a ovaria mohou být úspěšně vakcinovány autologními dendritickými buňkami pulzovanými peptidy HER2/neu a MUC1 (Brossart, P, 2000). Došlo k proliferaci cytotoxických T lymfocytů zaměřených proti těmto peptidům. Vakcína byla dobře tolerována.

Zajímavou studii publikoval Rahma a kol., které se účastnilo 21 pacientek ve stádiích III a IV, jejichž ovariální karcinom exprimoval ve zvýšené míře protein p53 (Rahma, OE, 2012). Pacientky byly rozděleny do 2 kohort, z nichž jedna dostala vakcínu s peptidem p53:264-272 s.c. společně s GM-CSF a adjuvans (montanide) a druhá vakcínu s dendritickými buňkami pulzovanými stejným peptidem intravenózně. V obou skupinách byly detekovány specifické imunitní reakce proti danému peptidu pomocí ELISPOT (69% × 83%). Rozdíl přežití nebyl statisticky signifikantní.

V další studii Chu a kol. pulzovali dendritické buňky směsí proteinů HER2/neu, hTERT (human telomerase reverse transcriptase) a PADRE (pan HLA-DR epitope) peptidů (Chu, CS, 2012). Jedna

skupina pacientek dostala současně cyklofosamid, který však vedl pouze ke snížení neutrofilů, ne však lymfocytů, či regulačních T lymfocytů. Imunitní reakce vyvolané vakcínou byly slabé, nicméně 3 leté přežití pacientek bylo slibné (90%).

Loveland a kol. aplikovali 10 pacientkám vakcínu z dendritických buněk pulzovaných fúzním proteinem mannan-MUC1 (Loveland, BE, 2006). Specifické reakce proti fúznímu proteinu byly prokázány u 9 pacientek, u 2 pacientek, které před vakcinací progredovaly, došlo ke stabilizaci onemocnění.

Jiným fúzním proteinem obsahující intracelulární a extracelulární porce HER2/neu a GM-CSF (Iapuleucel-T) byly pulzovány dendritické buňky ve studii publikované Peethambaramem (Peethambaram, PP, 2009). Studie se zúčastnilo 18 pacientek s nádory ovaria, mammy a kolon. U všech byly měřitelné specifické imunitní reakce proti fúznímu proteinu, nicméně objektivní odpovědi chyběly a jen u 2 pacientek došlo ke stabilizaci onemocnění.

V současné době probíhá několik klinických studií fáze III využívající dendritických buněk. Jejich výsledky však ještě nejsou známy. Všechny dosavadní studie byly fáze I nebo II, což potvrzuje skutečnost, že v imunoterapii karcinomu ovaria zbývá ještě dlouhá cesta před námi.

4 Hypotézy a cíle práce

4.1 Metodické aspekty přípravy buněčné imunoterapie u karcinomu ovaria a prostaty

Jednotlivé úkoly řešené v průběhu experimentů:

- Podmínky pěstování DC z periferních monocytů pacientek s ovariálním karcinomem a pacientů s karcinomem prostaty
- Metody indukce apoptózy nádorových buněk UV zářením
- Optimalizace časů expozice dendritických buněk nádorovým buňkám a sledování lokalizace nádorových buněk po pohlcení
- Ověření funkčnosti DC z monocytů u pacientů - Indukce specifické protinádorové odpovědi in vitro u pacientek s ovariálním karcinomem

Naší hypotézou bylo:

Metody kultivace DC z periferních monocytů pacientů vhodných k imunoterapii musí vést k indukci imunitní reakce in vitro proti nádorovým antigenům.

4.2 Imunoterapie pomocí dendritických buněk u pacientů s karcinomem prostaty

Jednotlivé úkoly řešené v průběhu experimentu:

- Stanovení optimálního aktivačního činidla pro maturaci dendritických buněk v GMP podmínkách
- Ověření počtů regulačních T lymfocytů v krvi pacienta s karcinomem prostaty a možnosti jejich ovlivnění
- Ověření in vitro přítomnosti tumor specifických cytotoxických T lymfocytů v krvi pacienta po aplikaci vakcíny a sledovat kinetiku odpovědi

Naší hypotézou bylo:

Dendritické buňky podané in vivo vyvolají imunitní reakci in vivo.

4.3 Analýza infiltrátu imunitních buněk u karcinomu ledviny

Jednotlivé úkoly řešené v průběhu experimentu:

- Stanovení zastoupení dendritických buněk, neutrofilů a regulačních T lymfocytů v krvi a nádoru pacientů s karcinomem ledviny a korelovat výsledky dle klinického stádia onemocnění

Naší hypotézou bylo:

Nádorový infiltrát se mění v průběhu progresu nádoru a má prognostický význam.

5 Materiál a metodika

Materiál a metodika jednotlivých experimentů je podrobně popsána v publikovaných článcích v časopisech s impact faktorem. Kopie článků jsou vytištěny v rámci kapitoly 6 této práce.

6 Výsledky a diskuze

Výsledky práce jsou rozděleny do jednotlivých podkapitol podle tématu. Ke každé podkapitole je přiložen původní článek publikovaný v časopisech s impact faktorem, u podkapitoly týkající se metodických aspektů přípravy buněčné imunoterapie u karcinomu prostaty jsou výsledky vypsány přímo podrobně v textu. Krátká stať před článkem shrnuje zásadní výsledky.

6.1 Metodické aspekty přípravy buněčné imunoterapie u karcinomu ovaria a prostaty

6.1.1 Karcinom ovaria

Jak jsem již dříve zmínil, karcinom ovaria se detekuje ve většině případů (75%) ve stádiu III a IV, které mají špatnou prognózu. Ve stádiu III je 5 leté přežití kolem 20-25%, ve stádiu IV ještě horší (10%). Adjuvantní nebo primární chemoterapie je často následována recidivou onemocnění. V takovýchto případech již není příliš možností, co pacientkám nabídnout. Jednou z možností by mohla být imunoterapie. V posledních 10-15 letech se výzkum v této oblasti obrací na cílenou buněčnou imunoterapii, šitou na míru proti danému nádoru. Jako perspektivní se jeví vakcíny využívající dendritické buňky. V naší studii jsme se zaměřili právě na in vitro průkaz možnosti výroby vakcíny pro pacientky s ovariálním karcinomem. Nádorové buňky jsme izolovali z ascitické tekutiny nebo primárního tumoru. Sledovali jsme, jak UV záření vyvolává apoptózu nádorových buněk. Jako optimální pro největší výtěžnost apoptotických nádorových buněk je doba 24hod po ozáření. Dále jsme z periferních mononukleárních buněk po kultivaci v přítomnosti IL-4 a GM-CSF izolovali nezralé dendritické buňky. Takto připravené nezralé dendritické buňky jsme kokultivovali s apoptotickými nádorovými buňkami, kdy doba 4 hodin kokultivace se jevila jako nejvýtečnější. Přítomnost apoptotických tělísek v endosomálním kompartmentu jsme prokázali na konfokálním mikroskopu. Maturace pulzovaných dendritických buněk pomocí poly I:C je účinná. Na dendritických buňkách jsme v jednotlivých stádiích sledovali intenzitu exprese MHC-II (HLA-DR), maturačního znaku CD83 a kostimulačních molekul CD80 a CD86. Zralé dendritické buňky ve srovnání s nezralými signifikantně více produkovaly IL-12p70 a TNF α , pulzované také o něco více IL-10. Jen maturované pulzované dendritické buňky signifikantně více indukovaly proliferaci specifických T lymfocytů (prokázáno metodou ELISPOT). Tento experiment je počátkem dalšího vývoje vakcíny z dendritických buněk na Ústavu imunologie UK 2.LF a FN Motol. Prokázali jsme schopnost její produkce a schopnost indukovat specifickou lymfocytární odpověď in vitro. Podrobnější postup i výsledky jsou uvedeny v přiloženém původním článku.

6.1.2 Karcinom prostaty

Nádorová onemocnění zapříčiňují přibližně 30% příčin úmrtí v české populaci. Mezi mužskou částí populace zaujímá přední místo karcinom prostaty. Incidence tohoto onemocnění byla v roce 2010 celkem 131/100 000 a mortalita 28,4/100 000. S trendem stárnutí populace toto onemocnění hraje důležitější roli. V současné době existují k dispozici diagnostické postupy, které mohou odhalit nemocné muže před generalizací onemocnění. Takovými pacientům lze jako kurativní metodu nabídnout radikální operační výkon, nebo radioterapii. Asi u 1/3 mužů, kteří prodělají kurativní výkon, karcinom prostaty založí mikrometastázy, které se projeví jako tzv. biochemická recidiva. Jelikož karcinom prostaty je pomalu rostoucí nádor, jeho citlivost k cytostatikám je nízká. Pro tyto pacienty neexistuje v současné době lék, který by progresi onemocnění zastavil a úplně eliminoval. Specifická imunoterapie by mohla být alternativou, která by zvýšila naději na úplné vyléčení.

V našem experimentu jsme se zaměřili na pacienty po radikální prostatektomii, kteří mají vyšší riziko recidivy, tj. musí splňovat alespoň jedno z kritérií: předoperační PSA nad 10 ng/ml, Gleasonovo skóre ≥ 7 , pozitivní chirurgické okraje nebo stadium T3 a více. U nich jsme poté stanovili fenotyp a funkci dendritických buněk a srovnali se zdravými kontrolami. Právě nenarušená funkce dendritických buněk je podmínkou pro možnost jejich využití v protinádorové vakcíně. Dále jsme optimalizovali indukci apoptózy a nekrózy u prostatických linií LNCaP a DU145 – tento zdroj nádorových antigenů jsme zvolili proto, že je z technických důvodů obtížné získat pacientovy autologní nádorové buňky z prostaty v dostatečném množství k přípravě vakcíny. Takto připravené buňky prostatických linií jsme poté předložili připraveným dendritickým buňkám.

Metodika přípravy dendritických buněk z periferních mononukleárů, jejich pulzace, stanovení fenotypu, fagocytózy a produkce cytokinů je stejná jako v předchozím článku týkající se ovariálního karcinomu. Výsledky byly prezentovány průběžně na významných českých i mezinárodních kongresech (sjezd ČUS, Central European Meeting pořádané EAU, 7th EFIS Tatra Immunology Konference v roce 2006, Onkourologické a mamologické sympozium), přesné citace jsou uvedeny v přehledu publikační činnosti.

Výsledky řešení

1. Pacienti a kontroly

- a. Do studie jsme zahrnuli 9 pacientů a 10 kontrol. Všichni pacienti splňovali vstupní kritéria specifikované výše. Mezi kontrolami jsou muži ve stejném věku jako pacienti, bez známek nádorového postižení.

2. Ověření možnosti kultivace dendritických buněk z periferních mononukleárních buněk pacienta po radikální prostatektomii

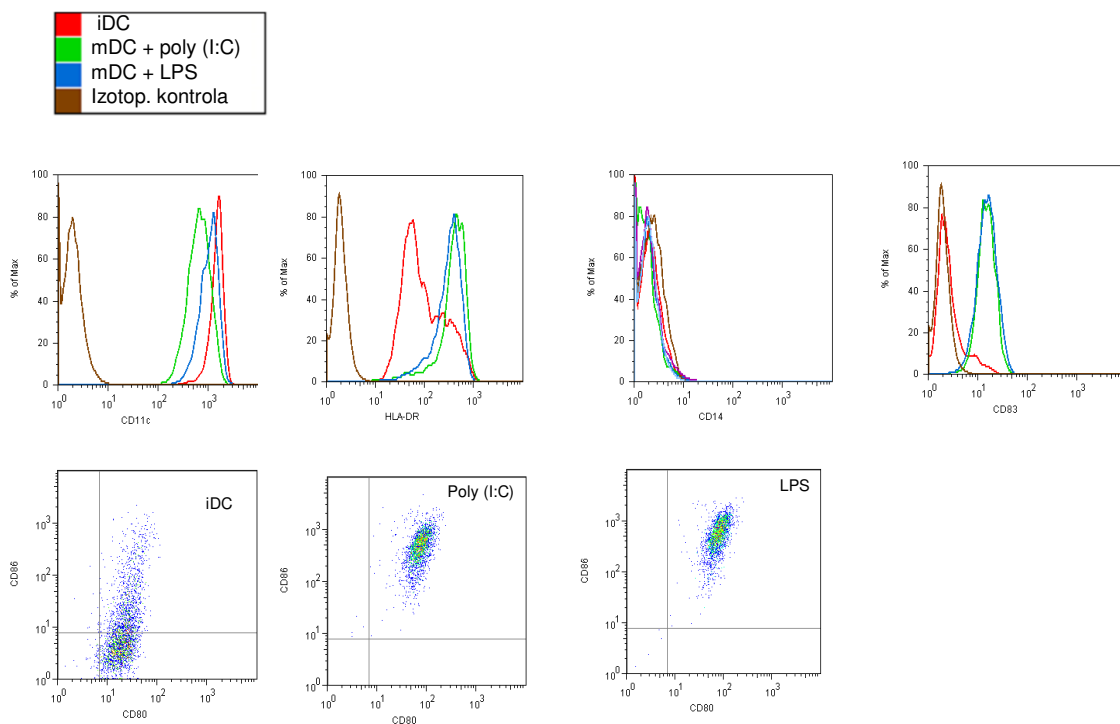
- Z 30ml krve pacienta se podařilo izolovat dostatečné množství mononukleárů, které jsme poté nechali diferencovat v dendritické buňky za přítomnosti IL-4 a GM-CSF po dobu 6 dní. U takto diferencovaných dendritických buněk jsme stanovovali fenotyp a vybrané funkční charakteristiky.

3. Fenotyp dendritických buněk

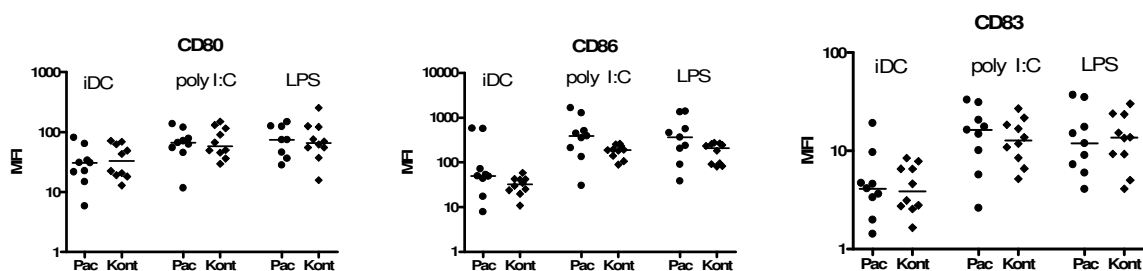
- Část vykultivovaných dendritických buněk jsme poté vystavili maturačnímu stimulu po dobu 24hod. V našem případě se jednalo o lipopolysacharid (LPS) nebo poly I:C.
- Na průtokovém cytometru jsme pozorovali expresi povrchových molekul, které charakterizují takto vykultivované dendritické buňky – HLA-DR+, CD11c+ a CD14-, a také molekuly charakterizující jejich maturační stav – CD83, CD80 a CD86. V našem souboru měly nezralé dendritické buňky expresi HLA-DR, CD11c, nízkou expresi CD80 a CD86 a neexprimovaly CD83 a CD14. U maturovaných dendritických buněk byla signifikantně vyšší exprese kostimulačních molekul CD80 a CD86, HLA-DR a byla přítomna molekula CD83 typická pro zralé DC (obr.1). Všechny tyto charakteristiky odpovídají fenotypu zdravých kontrol. Rozdíl mezi pacienty a zdravými kontrolami nebyl statisticky významný (graf č.1).

Obr.1

Fenotyp



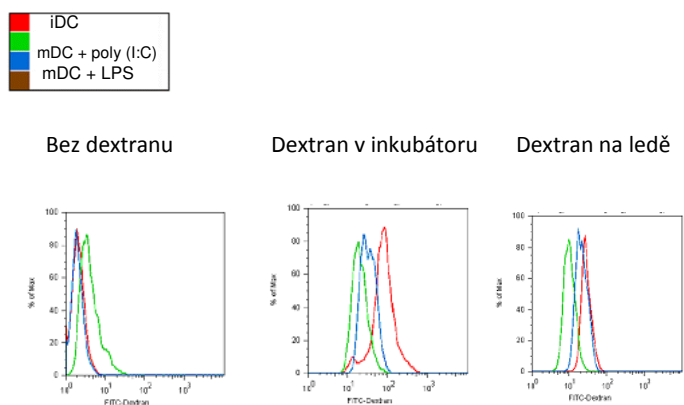
graf č.1



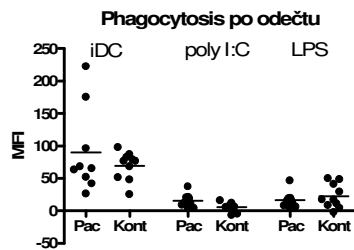
4. Fagocytóza dextransu

- a. Zralým i nezralým dendritickým buňkám jsme předložili dextran značený FITC. Dendritické buňky, jakožto fagocytující buňky, dextran pohltní. Fagocytární aktivita je obecně vysoká u nezralých DC, se stupněm maturace klesá. Část dendritických buněk s dextranem jsme inkubovali v termální boxu při 37°C a 5% CO₂, část na ledu při 5°C. Množství fagocytovaného dextransu poté stanovujeme na průtokové cytometrii. Úroveň fluorescence dendritických buněk na ledu odpovídá nespecificky vázanému dextranu. Tuto hodnotu poté musíme odečíst od fluorescence fagocytujících buněk. Z výsledku měření vyplývá, že i v našem souboru pacientů dendritické buňky vykazují fagocytární aktivitu odpovídající stupni maturace, což je jedním z hlavních předpokladů pro úspěšnou pulzaci dendritických buněk nádorovým antigenem (obr.2). Rozdíl mezi fagocytární aktivitou dendritických buněk pacientů a zdravých kontrol byl statisticky nevýznamný (graf č.2).

Obr.2



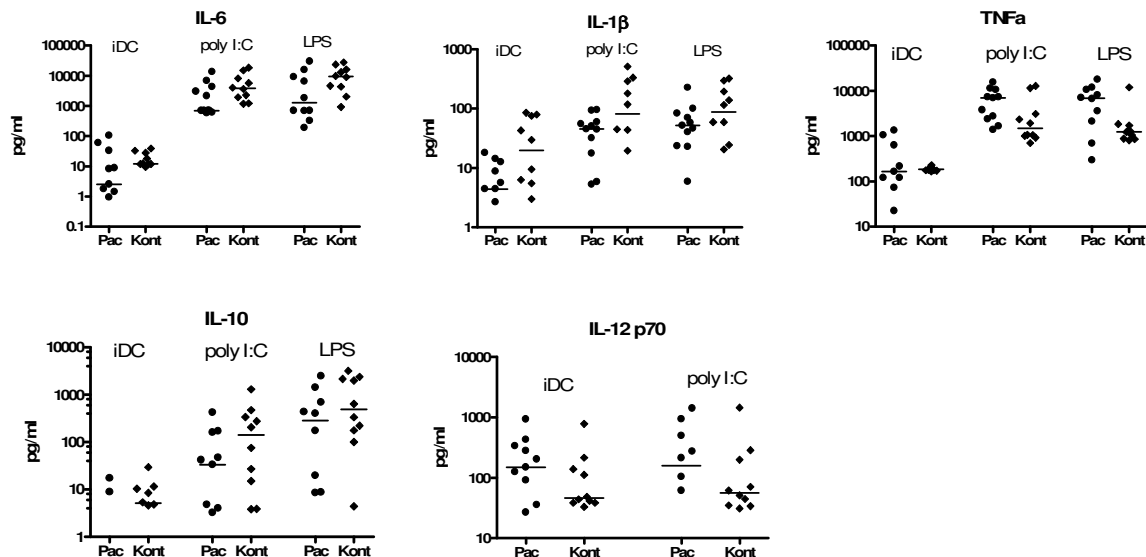
graf č.2



5. Produkce cytokinů

- a. Po odběru supernatantu kultivovaných dendritických buněk jsme pomocí metody ELISA stanovili produkci cytokinů IL-12, IL-1 β , IL-6, TNF- α a IL-10. Výsledky jednoznačně potvrzují signifikantní rozdíl v produkci cytokinů mezi zralými a nezralými dendritickými buňkami. Maturované dendritické buňky produkují velké množství výše jmenovaných cytokinů, na rozdíl od nezralých, jež mají omezenou produkci, případně žádnou. Tato pozorování jsou v souladu s výsledky u zdravých kontrol. Statisticky nebyl rozdíl mezi pacienty a zdravými kontrolami významný (graf č.3).

graf č.3

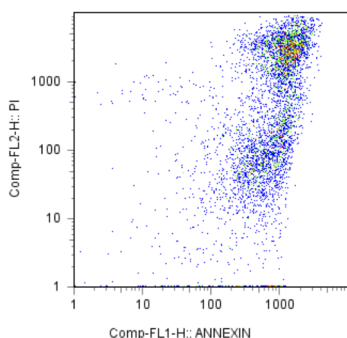


6. Apoptóza nádorových buněk

- a. Jelikož ze vzorků prostat po radikální prostatektomii lze z technických důvodů izolovat jen velmi omezené množství autologních nádorových buněk, rozhodli jsme se využít pro pulzaci dendritických buněk prostatických nádorových linií LNCaP a DU145. Tyto nádorové buňky jsme vystavili intenzivnímu UV záření po dobu 30s, 60s, 3 min, 5minut a 10minut a

v době 24hod jsme pozorovali množství buněk, které přešly do apoptózy. Ke stanovení biologického stádia jsme použili značení Annexinem a propidium jodidem. Apoptózu jsme detekovali také pomocí TUNNEL assay, která však nepřinesla lepší výsledky než značení Annexinem a propidium jodidem, navíc příprava je významně delší. Zjistili jsme, že buňky nádorových linií jsou značně odolné proti UV záření a na jejich usmrcení je potřeba doba ozáření alespoň 5minut (obr.3).

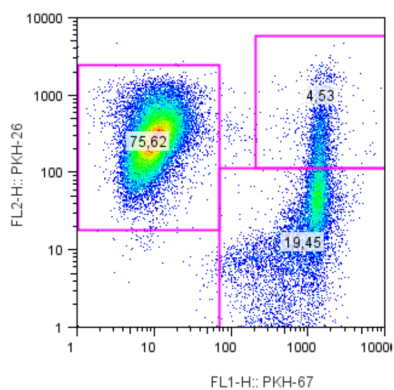
obr.3



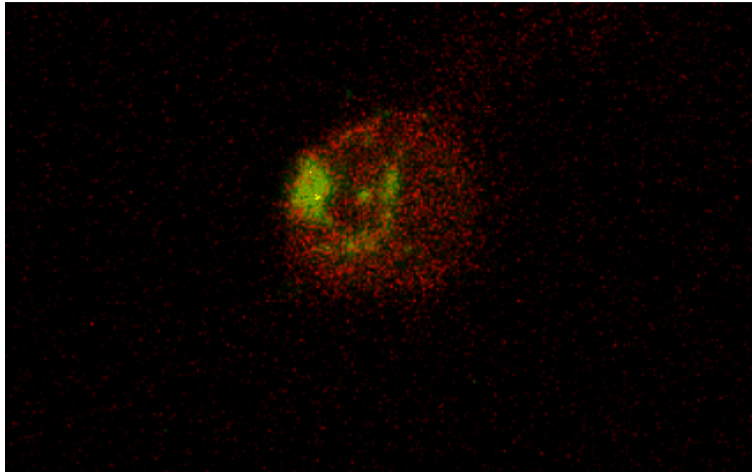
7. Pulzace dendritických buněk směsí apoptotických a nekrotických nádorových buněk

- a. Směs apoptotických a nekrotických nádorových buněk jsme označili barvivem PKH-26 a nezralé dendritické buňky, které mají schopnost fagocytózy, jsme označili barvivem PKH-67. Poté jsme obě populace buněk koinkubovali v kompletním mediu po dobu 4 hodin v poměru 4:1 (Tu×iDC). Následně jsme směs analyzovali na průtokovém cytometru. Výsledná data prokazují, že nezralé dendritické buňky pohlcují buňky nádorové (obr.4), což je předpokladem úspěšné vakcíny. Výsledek jsme si také ověřili na konfokálním mikroskopu (obr.5)

obr.4



obr.5



Shrnutí

Prokázali jsme, že od pacientů ve zvýšeném riziku biochemické recidivy lze získat kultivaci z monocytů periferní krve dostatečné množství funkčních DC, což je základem pro budoucí přípravu terapeutické vakcíny. Dále jsme zjistili, že z technických důvodů nelze použít jako zdroj nádorového antigenu autologní prostatickou nádorovou tkáň, proto jsme se zaměřili na možnost pulsace prostatickými nádorovými liniemi LNCaP a DU145. Optimalizovali jsme přípravu zdroje nádorových antigenů z těchto linií pomocí indukce apoptózy a ověřili jsme, že kultivované DC pacientů v dostatečné míře pohlcují tyto nádorové buňky. Naše výsledky byly nezbytnou preklinickou přípravnou částí k následnému vývoji terapeutické vakcíny.

6.2 Imunoterapie pomocí dendritických buněk u pacientů s karcinomem prostaty

V následující publikaci jsme se věnovali optimalizaci přípravy vakcíny pro pacienty s karcinomem prostaty v GMP podmínkách. Jako nejlepší medium pro kultivaci dendritických buněk z periferních mononukleárů v těchto podmínkách se osvědčilo medium Cell Gro. Ke stanovení nejlépe vyhovujícího maturačního činidla byly nezralé dendritické buňky nejdříve maturovány v přítomnosti poly I:C, lipopolysacharidu, nebo směsí IL-1, IL-6, TNF a PGE2. Takto připravené zralé dendritické buňky byly následně pulzovány influenza matrix peptidem. Po kokultivaci a následné restimulaci s autologními T lymfocyty jsme zjistili, že maturace dendritických buněk pomocí poly I:C vede k nejvyšší proliferaci specifických T lymfocytů. U našeho modelového pacienta jsme detekovali vyšší podíl regulačních T lymfocytů v krvi než u zdravých kontrol. Pomocí aplikace nízkých dávek cyklofosfamidu po dobu 7 dní jsme dokázali snížit množství regulačních T lymfocytů v krvi pacienta. V další fázi přípravy vakcíny jsme nezralé dendritické buňky pulzovali nádorovými antigeny ve formě apoptotických nádorových tělísek z linie LNCaP indukovaných UV ozářením. Takto připravené dendritické buňky in vitro

zvyšovaly 5× detekci specifických T lymfocytů po restimulaci. Proliferaci specifických T lymfocytů jsme také stanovili u našeho modelového pacienta in vivo po několika dávkách vakcíny. Došlo jak k proliferaci specifických T lymfocytů zaměřených proti dendritickým buňkám pulzovaným LNCaP, ale také proti PSA. Dále jsme sledovali klinický vývoj onemocnění pacienta, jehož přežití bylo pozitivním stimulem k iniciaci klinických studií u pacientů s karcinomem prostaty v různých stádiích onemocnění. Podrobný postup přípravy a výsledky jsou uvedeny v článku.

6.3 Analýza infiltrátu imunitních buněk u karcinomu ledviny

Nádorová onemocnění různých orgánů se liší interakcí s imunitním systémem. Stejně tak různá stádia nádorového onemocnění se liší v zastoupení imunitních buněk v krvi i nádorovém infiltrátu. Pro úspěšný vývoj imunoterapeutických metod tak musíme nejdříve pochopit, jak daný nádor s imunitním systémem interaguje. V našem případě jsme se zaměřili na pacienty s tumorem ledviny, který je výborným zdrojem nádorové tkáně pro charakterizaci imunitních buněk v nádorovém infiltrátu. Stanovili jsme zastoupení dendritických buněk, regulačních T lymfocytů a neutrofilů v krvi i nádorech pacientů a výsledky jsme korelovali s klinickým stádiem. Pacienty jsme rozdělili do 2 skupin: časné stádium odpovídající nádorům omezeným na ledvinu a pokročilé stádium odpovídající nádorům invadujícím přes pouzdro ledviny nebo metastazujícím. Počty dendritických buněk byly vyšší v krvi pacientů než u zdravých kontrol. V časném stádiu větší procento dendritických buněk v krvi exprimovalo maturační marker CD83, ale také jsme pozorovali vyšší zastoupení plasmacytoidních dendritických buněk v nádorovém infiltrátu. Počty neutrofilů v krvi pacientů byly vyšší než u zdravých kontrol. V pozdních stádiích stoupal počet infiltrujících neutrofilů v nádorové tkáni. Rozdíl v zastoupení regulačních T lymfocytů v nádorech jsme však mezi oběma skupinami nepozorovali. Nicméně pacienti měli vyšší počet regulačních T lymfocytů v krvi než zdravé kontroly. Tato práce je součástí výzkumného projektu zaměřeného na analýzu imunitního infiltrátu nádoru ve vztahu k prognóze onemocnění. Poznatky mohou v budoucnu sloužit k individualizaci protinádorové léčby včetně imunoterapie. Podrobný postup i výsledky jsou popsány a diskutovány v příloženém článku.

7 Závěr

Ve své práci jsem do problematiky imunologie nádorů urogenitálního systému přispěl těmito poznatky: realizovali jsme studii proveditelnosti imunoterapie DC u pacientek s karcinomem ovaria a pacientů s karcinomem prostaty. Dendritické buňky připravené z monocytů těchto pacientů jsou funkční, mají vysokou fagocytární aktivitu, pohlcují apoptotické nádorové buňky, po maturaci exprimují znaky zralých dendritických buněk. U pacientek s karcinomem ovaria indukují specifické T lymfocyty. Optimalizovali jsme čas UV ozáření pro indukci apoptózy u nádorových buněk. Experimentální metody optimalizované v rámci řady laboratorních pokusů se nám podařilo převést do podmínek správné výrobní praxe (GMP), což je podmínkou k aplikaci in vivo pacientům. U prvního pacienta, kterému byl přípravek buněčné terapie aplikován, jsme byli schopni detekovat in vivo specifické T lymfocyty proti nádorovým antigenům prostaty a potenciální klinický efekt. V poslední části mé práce u karcinomu ledviny jsme stanovili zastoupení jednotlivých buněčných populací v nádoru a periferní krvi. Tato studie je součástí výzkumného projektu zaměřeného na analýzu imunitního infiltrátu nádoru a imunitních parametrů v periferní krvi ve vztahu k prognóze onemocnění. Poznatky získané v tomto výzkumu mohou v budoucnu sloužit k individualizaci protinádorové léčby včetně imunoterapie.

Rozvoj vědy i techniky v poslední době umožnil podrobné studium a lepší porozumění imunitnímu systému, a to nejen v rámci fyziologických procesů, ale také patologických. Nezdá se, že některých nových imunoterapeutických procesů často vede k objasnění příčiny selhání, a tím dále posouvá naše znalosti ohledně interakce nádoru s imunitním systémem. Dnes již částečně chápeme, že interakce mezi nádorovými a imunitními buňkami se v průběhu růstu nádoru mění, že buňky imunitního systému dokážou zpočátku nádorovým buňkám vzdorovat, nicméně nádorové mikroprostředí si v pozdějších stádiích imunitní buňky přizpůsobí tak, že růst i metastazování nádoru podporují. Proto hlavně v pozdějších stádiích je třeba nejdříve přesně definovat roli imunitních buněk v nádoru a až poté se můžeme pokusit imunitní systém stimulovat k eliminaci tumoru. Imunoterapie šitá na míru pacientovi je dle mého názoru budoucností léčby nádorových onemocnění.

8 Poděkování

V první řadě bych rád poděkoval Doc. MUDr. Ivanu Kawaciukovi, CSc. , že mi umožnil nastoupit na Urologickou kliniku UK 2.LF a FN Motol, kde jsem celých 9 let pracoval a získával cenné zkušenosti pro svou klinickou praxi, že se mě ujal a byl mým školitelem. Neméně bych chtěl poděkovat prof. MUDr. Jiřině Bartůňkové, DrSc. a jejímu kolektivu, pod jejíž vedením vznikaly a probíhaly všechny projekty týkající se buněčné imunoterapie, za její soustavnou podporu. Určitě bych chtěl také poděkovat Doc. MUDr. Ladislavu Jarolímovi, CSc., který se mne po odchodu doc. Kawaciuka ujal a vedl do konce studií a prof. MUDr. Marku Babjukovi, CSc., který mě v průběhu postgraduálních studií aktivně podporoval. Rád bych vyjádřil svou vděčnost a poděkování RNDr. Janu Lašťovičkovi, CSc., který mi pomáhal se sběrem a analýzou dat. Nakonec bez podpory rodiny bych svou práci nemohl dokončit, proto chci poděkovat manželce za trpělivost a podporu v těžkých chvílích. Samozřejmě děkuji všem ostatním spolupracovníkům, kteří se na práci podíleli.

9 Seznam citované literatury

- Balkwill, F. (2009) Tumour necrosis factor and cancer, *Nature reviews. Cancer*, **9**, 361-371.
- Barreira da Silva, R. and Munz, C. (2011) Natural killer cell activation by dendritic cells: balancing inhibitory and activating signals, *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, **68**, 3505-3518.
- Becker, J.T., *et al.* (2010) DNA vaccine encoding prostatic acid phosphatase (PAP) elicits long-term T-cell responses in patients with recurrent prostate cancer, *J Immunother*, **33**, 639-647.
- Beriou, G., *et al.* (2009) IL-17-producing human peripheral regulatory T cells retain suppressive function, *Blood*, **113**, 4240-4249.
- Beyer, M. and Schultze, J.L. (2006) Regulatory T cells in cancer, *Blood*, **108**, 804-811.
- Brossart, P., *et al.* (2000) Induction of cytotoxic T-lymphocyte responses in vivo after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells, *Blood*, **96**, 3102-3108.
- Brown, D.A., *et al.* (2009) Macrophage inhibitory cytokine 1: a new prognostic marker in prostate cancer, *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, **15**, 6658-6664.
- Buckowitz, A., *et al.* (2005) Microsatellite instability in colorectal cancer is associated with local lymphocyte infiltration and low frequency of distant metastases, *British journal of cancer*, **92**, 1746-1753.
- Burnet, F.M. (1970) The concept of immunological surveillance, *Progress in experimental tumor research*, **13**, 1-27.
- Burnet, M. (1964) Immunological Factors in the Process of Carcinogenesis, *British medical bulletin*, **20**, 154-158.
- Callaway, M.P. and Briggs, J.C. (1989) The incidence of late recurrence (greater than 10 years); an analysis of 536 consecutive cases of cutaneous melanoma, *British journal of plastic surgery*, **42**, 46-49.
- Caruso, R.A., *et al.* (2002) Prognostic value of intratumoral neutrophils in advanced gastric carcinoma in a high-risk area in northern Italy, *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, **15**, 831-837.
- Clemente, C.G., *et al.* (1996) Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma, *Cancer*, **77**, 1303-1310.
- Colonna, M., *et al.* (2004) Plasmacytoid dendritic cells in immunity, *Nature immunology*, **5**, 1219-1226.
- Cools-Lartigue, J., *et al.* (2013) Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells and promote metastasis, *The Journal of clinical investigation*.
- Coppin, C., *et al.* (2005) Immunotherapy for advanced renal cell cancer, *Cochrane Database Syst Rev*, CD001425.
- Cozar, J.M., *et al.* (2005) Analysis of NK cells and chemokine receptors in tumor infiltrating CD4 T lymphocytes in human renal carcinomas, *Cancer immunology, immunotherapy : CII*, **54**, 858-866.

- Culig, Z. and Pühr, M. (2012) Interleukin-6: a multifunctional targetable cytokine in human prostate cancer, *Molecular and cellular endocrinology*, **360**, 52-58.
- Curiel, T.J., *et al.* (2004) Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival, *Nature medicine*, **10**, 942-949.
- Curiel, T.J., *et al.* (2003) Blockade of B7-H1 improves myeloid dendritic cell-mediated antitumor immunity, *Nature medicine*, **9**, 562-567.
- Dannenmann, S.R., *et al.* (2013) Tumor-associated macrophages subvert T-cell function and correlate with reduced survival in clear cell renal cell carcinoma, *Oncoimmunology*, **2**, e23562.
- Davidsson, S., *et al.* (2013) CD4 helper T cells, CD8 cytotoxic T cells, and FOXP3(+) regulatory T cells with respect to lethal prostate cancer, *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, **26**, 448-455.
- de Boer, E.C., *et al.* (1991) Leukocytes in the urine after intravesical BCG treatment for superficial bladder cancer. A flow cytofluorometric analysis, *Urol Res*, **19**, 45-50.
- Deligdisch, L., *et al.* (1982) Histologic correlates of virulence in ovarian adenocarcinoma. II. Morphologic correlates of host response, *American journal of obstetrics and gynecology*, **144**, 885-889.
- Dhodapkar, M.V., *et al.* (2003) Vigorous premalignancy-specific effector T cell response in the bone marrow of patients with monoclonal gammopathy, *The Journal of experimental medicine*, **198**, 1753-1757.
- Diener, K.R., *et al.* (2009) Transforming growth factor-beta-mediated signaling in T lymphocytes impacts on prostate-specific immunity and early prostate tumor progression, *Lab Invest*, **89**, 142-151.
- Dighe, A.S., *et al.* (1994) Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors, *Immunity*, **1**, 447-456.
- DiLillo, D.J., *et al.* (2011) B-lymphocyte effector functions in health and disease, *Immunologic research*, **49**, 281-292.
- DiLillo, D.J., *et al.* (2010) B cells are required for optimal CD4+ and CD8+ T cell tumor immunity: therapeutic B cell depletion enhances B16 melanoma growth in mice, *J Immunol*, **184**, 4006-4016.
- Donskov, F. and von der Maase, H. (2006) Impact of immune parameters on long-term survival in metastatic renal cell carcinoma, *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, **24**, 1997-2005.
- Draube, A., *et al.* (2011) Dendritic cell based tumor vaccination in prostate and renal cell cancer: a systematic review and meta-analysis, *PloS one*, **6**, e18801.
- Duluc, D., *et al.* (2007) Tumor-associated leukemia inhibitory factor and IL-6 skew monocyte differentiation into tumor-associated macrophage-like cells, *Blood*, **110**, 4319-4330.
- Dunn, G.P., *et al.* (2002) Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape, *Nature immunology*, **3**, 991-998.
- Dzionek, A., *et al.* (2000) BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood, *J Immunol*, **165**, 6037-6046.

- Ehrlich, P. (1909) Über den jetzigen stand der karzinomforschung, *Ned. Tijdschr. Geneeskd.*, **5**, 273-290.
- Engel, A.M., *et al.* (1997) MCA sarcomas induced in scid mice are more immunogenic than MCA sarcomas induced in congenic, immunocompetent mice, *Scandinavian journal of immunology*, **45**, 463-470.
- Epstein, N.A. and Fatti, L.P. (1976) Prostatic carcinoma: some morphological features affecting prognosis, *Cancer*, **37**, 2455-2465.
- Ezernitchi, A.V., *et al.* (2006) TCR zeta down-regulation under chronic inflammation is mediated by myeloid suppressor cells differentially distributed between various lymphatic organs, *J Immunol*, **177**, 4763-4772.
- Figel, A.M., *et al.* (2011) Human renal cell carcinoma induces a dendritic cell subset that uses T-cell crosstalk for tumor-permissive milieu alterations, *The American journal of pathology*, **179**, 436-451.
- Flavell, R.A., *et al.* (2010) The polarization of immune cells in the tumour environment by TGFbeta, *Nature reviews. Immunology*, **10**, 554-567.
- Fotin-Mleczeck, M., *et al.* (2012) Highly potent mRNA based cancer vaccines represent an attractive platform for combination therapies supporting an improved therapeutic effect, *The journal of gene medicine*, **14**, 428-439.
- Freud, A.G., *et al.* (2014) Human natural killer cell development in secondary lymphoid tissues, *Seminars in immunology*.
- Fridlender, Z.G. and Albelda, S.M. (2012) Tumor-associated neutrophils: friend or foe?, *Carcinogenesis*, **33**, 949-955.
- Fujii, T., *et al.* (2013) Immunohistochemical analysis of inflammatory cells in benign and precancerous lesions and carcinoma of the prostate, *Pathobiology*, **80**, 119-126.
- Geissmann, F., *et al.* (2010) Unravelling mononuclear phagocyte heterogeneity, *Nature reviews. Immunology*, **10**, 453-460.
- Gijsbers, K., *et al.* (2005) GCP-2/CXCL6 synergizes with other endothelial cell-derived chemokines in neutrophil mobilization and is associated with angiogenesis in gastrointestinal tumors, *Experimental cell research*, **303**, 331-342.
- Girardi, M., *et al.* (2001) Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells, *Science (New York, N.Y.)*, **294**, 605-609.
- Giraud, E., *et al.* (2004) An amino-bisphosphonate targets MMP-9-expressing macrophages and angiogenesis to impair cervical carcinogenesis, *The Journal of clinical investigation*, **114**, 623-633.
- Gollapudi, K., *et al.* (2013) Association between tumor-associated macrophage infiltration, high grade prostate cancer, and biochemical recurrence after radical prostatectomy, *Am J Cancer Res*, **3**, 523-529.
- Gregory, A.D. and Houghton, A.M. (2011) Tumor-associated neutrophils: new targets for cancer therapy, *Cancer research*, **71**, 2411-2416.

- Hamanishi, J., *et al.* (2007) Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**, 3360-3365.
- Hernando, J.J., *et al.* (2007) Vaccination with dendritic cells transfected with mRNA-encoded folate-receptor-alpha for relapsed metastatic ovarian cancer, *The lancet oncology*, **8**, 451-454.
- Hernando, J.J., *et al.* (2002) Vaccination with autologous tumour antigen-pulsed dendritic cells in advanced gynaecological malignancies: clinical and immunological evaluation of a phase I trial, *Cancer immunology, immunotherapy : CII*, **51**, 45-52.
- Higano, C.S., *et al.* (2009) Integrated data from 2 randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trials of active cellular immunotherapy with sipuleucel-T in advanced prostate cancer, *Cancer*, **115**, 3670-3679.
- Hobisch, A., *et al.* (2000) Immunohistochemical localization of interleukin-6 and its receptor in benign, premalignant and malignant prostate tissue, *The Journal of pathology*, **191**, 239-244.
- Hovanessian, A.G. (2007) On the discovery of interferon-inducible, double-stranded RNA activated enzymes: the 2'-5'oligoadenylate synthetases and the protein kinase PKR, *Cytokine & growth factor reviews*, **18**, 351-361.
- Chaput, N., *et al.* (2009) Identification of CD8+CD25+Foxp3+ suppressive T cells in colorectal cancer tissue, *Gut*, **58**, 520-529.
- Chu, C.S., *et al.* (2012) Phase I/II randomized trial of dendritic cell vaccination with or without cyclophosphamide for consolidation therapy of advanced ovarian cancer in first or second remission, *Cancer immunology, immunotherapy : CII*, **61**, 629-641.
- Janikashvili, N., *et al.* (2011) The dendritic cell-regulatory T lymphocyte crosstalk contributes to tumor-induced tolerance, *Clinical & developmental immunology*, **2011**, 430394.
- Jefford, M., *et al.* (2003) Functional comparison of DCs generated in vivo with Flt3 ligand or in vitro from blood monocytes: differential regulation of function by specific classes of physiologic stimuli, *Blood*, **102**, 1753-1763.
- Jensen, H.K., *et al.* (2009) Presence of intratumoral neutrophils is an independent prognostic factor in localized renal cell carcinoma, *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, **27**, 4709-4717.
- Kantoff, P.W., *et al.* (2010) Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer, *N Engl J Med*, **363**, 411-422.
- Karja, V., *et al.* (2005) Tumour-infiltrating lymphocytes: A prognostic factor of PSA-free survival in patients with local prostate carcinoma treated by radical prostatectomy, *Anticancer research*, **25**, 4435-4438.
- Kavoussi, L.R., *et al.* (1990) Fibronectin-mediated Calmette-Guerin bacillus attachment to murine bladder mucosa. Requirement for the expression of an antitumor response, *The Journal of clinical investigation*, **85**, 62-67.
- Kawamura, K., *et al.* (2009) Detection of M2 macrophages and colony-stimulating factor 1 expression in serous and mucinous ovarian epithelial tumors, *Pathology international*, **59**, 300-305.

- Kiniwa, Y., *et al.* (2007) CD8+ Foxp3+ regulatory T cells mediate immunosuppression in prostate cancer, *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, **13**, 6947-6958.
- Klein, G. (1966) Tumor antigens, *Annual review of microbiology*, **20**, 223-252.
- Kobayashi, M., *et al.* (2007) Tumor infiltrating dendritic cells predict treatment response to immunotherapy in patients with metastatic renal cell carcinoma, *Anticancer research*, **27**, 1137-1141.
- Koebel, C.M., *et al.* (2007) Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state, *Nature*, **450**, 903-907.
- Kryczek, I., *et al.* (2009) Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments, *Blood*, **114**, 1141-1149.
- Lengauer, C., *et al.* (1998) Genetic instabilities in human cancers, *Nature*, **396**, 643-649.
- Liang, S., *et al.* (2005) Shear stress and shear rate differentially affect the multi-step process of leukocyte-facilitated melanoma adhesion, *Experimental cell research*, **310**, 282-292.
- Linnebacher, M. and Maletzki, C. (2012) Tumor-infiltrating B cells: The ignored players in tumor immunology, *Oncoimmunology*, **1**, 1186-1188.
- Litzinger, M.T., *et al.* (2007) IL-2 immunotoxin denileukin diftitox reduces regulatory T cells and enhances vaccine-mediated T-cell immunity, *Blood*, **110**, 3192-3201.
- Ljungberg, B., *et al.* (2010) Guidelines on Renal Cell Carcinoma. In, *EAU Guidelines*. pp. 38-42.
- Loveland, B.E., *et al.* (2006) Mannan-MUC1-pulsed dendritic cell immunotherapy: a phase I trial in patients with adenocarcinoma, *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, **12**, 869-877.
- Ludwig, A.T., *et al.* (2004) Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand: a novel mechanism for Bacillus Calmette-Guerin-induced antitumor activity, *Cancer research*, **64**, 3386-3390.
- MacDonald, K.P., *et al.* (2002) Characterization of human blood dendritic cell subsets, *Blood*, **100**, 4512-4520.
- Madan, R.A., *et al.* (2009) Prostvac-VF: a vector-based vaccine targeting PSA in prostate cancer, *Expert opinion on investigational drugs*, **18**, 1001-1011.
- Maeda, H. and Shiraishi, A. (1996) TGF-beta contributes to the shift toward Th2-type responses through direct and IL-10-mediated pathways in tumor-bearing mice, *J Immunol*, **156**, 73-78.
- Mahmoud, S.M., *et al.* (2011) Tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer, *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, **29**, 1949-1955.
- McArdle, P.A., *et al.* (2004) The relationship between T-lymphocyte subset infiltration and survival in patients with prostate cancer, *British journal of cancer*, **91**, 541-543.
- McNeel, D.G., *et al.* (2009) Safety and immunological efficacy of a DNA vaccine encoding prostatic acid phosphatase in patients with stage D0 prostate cancer, *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, **27**, 4047-4054.

- Meidenbauer, N., *et al.* (2000) Generation of PSA-reactive effector cells after vaccination with a PSA-based vaccine in patients with prostate cancer, *Prostate*, **43**, 88-100.
- Michael, A., *et al.* (2005) Delayed disease progression after allogeneic cell vaccination in hormone-resistant prostate cancer and correlation with immunologic variables, *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, **11**, 4469-4478.
- Miller, A.M., *et al.* (2006) CD4+CD25high T cells are enriched in the tumor and peripheral blood of prostate cancer patients, *J Immunol*, **177**, 7398-7405.
- Minárik, I., *et al.* (2007) Dendritic cell vaccines for prostate cancer, *Polish Journal of Urology*, **60**, 133-137.
- Miyahara, Y., *et al.* (2008) Generation and regulation of human CD4+ IL-17-producing T cells in ovarian cancer, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**, 15505-15510.
- Moretta, L., *et al.* (2005) Human natural killer cells: Molecular mechanisms controlling NK cell activation and tumor cell lysis, *Immunology letters*, **100**, 7-13.
- Motzer, R.J., *et al.* (2002) Interferon-alfa as a comparative treatment for clinical trials of new therapies against advanced renal cell carcinoma, *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, **20**, 289-296.
- Myron Kauffman, H., *et al.* (2002) Transplant tumor registry: donor related malignancies, *Transplantation*, **74**, 358-362.
- Nagaraj, S., *et al.* (2010) Mechanism of T cell tolerance induced by myeloid-derived suppressor cells, *J Immunol*, **184**, 3106-3116.
- Nakamura, T., *et al.* (2003) Quantitative analysis of macrophage inhibitory cytokine-1 (MIC-1) gene expression in human prostatic tissues, *British journal of cancer*, **88**, 1101-1104.
- Nakano, O., *et al.* (2001) Proliferative activity of intratumoral CD8(+) T-lymphocytes as a prognostic factor in human renal cell carcinoma: clinicopathologic demonstration of antitumor immunity, *Cancer research*, **61**, 5132-5136.
- Nielsen, J.S., *et al.* (2012) CD20+ tumor-infiltrating lymphocytes have an atypical CD27- memory phenotype and together with CD8+ T cells promote favorable prognosis in ovarian cancer, *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, **18**, 3281-3292.
- Ning, H., *et al.* (2012) Tumor-infiltrating regulatory T cells are positively correlated with angiogenic status in renal cell carcinoma, *Chinese medical journal*, **125**, 2120-2125.
- Noguchi, M., *et al.* (2005) Immunological evaluation of individualized peptide vaccination with a low dose of estramustine for HLA-A24+ HRPC patients, *Prostate*, **63**, 1-12.
- Nonomura, N., *et al.* (2011) Infiltration of tumour-associated macrophages in prostate biopsy specimens is predictive of disease progression after hormonal therapy for prostate cancer, *BJU international*, **107**, 1918-1922.
- Old, L.J. and Boyse, E.A. (1964) Immunology of Experimental Tumors, *Annual review of medicine*, **15**, 167-186.

- Olkhanud, P.B., *et al.* (2011) Tumor-evoked regulatory B cells promote breast cancer metastasis by converting resting CD4(+) T cells to T-regulatory cells, *Cancer research*, **71**, 3505-3515.
- Opdenakker, G. and Van Damme, J. (2004) The countercurrent principle in invasion and metastasis of cancer cells. Recent insights on the roles of chemokines, *The International journal of developmental biology*, **48**, 519-527.
- Peethambaram, P.P., *et al.* (2009) A phase I trial of immunotherapy with lapuleucel-T (APC8024) in patients with refractory metastatic tumors that express HER-2/neu, *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, **15**, 5937-5944.
- Penn, I. (1995) Sarcomas in organ allograft recipients, *Transplantation*, **60**, 1485-1491.
- Penn, I. (1999) Posttransplant malignancies, *Transplantation proceedings*, **31**, 1260-1262.
- Piccard, H., *et al.* (2012) On the dual roles and polarized phenotypes of neutrophils in tumor development and progression, *Critical reviews in oncology/hematology*, **82**, 296-309.
- Polimeno, M., *et al.* (2013) Regulatory T cells, interleukin (IL)-6, IL-8, vascular endothelial growth factor (VEGF), CXCL10, CXCL11, epidermal growth factor (EGF) and hepatocyte growth factor (HGF) as surrogate markers of host immunity in patients with renal cell carcinoma, *BJU international*, **112**, 686-696.
- Prinz, P.U., *et al.* (2012) High DGK-alpha and disabled MAPK pathways cause dysfunction of human tumor-infiltrating CD8+ T cells that is reversible by pharmacologic intervention, *J Immunol*, **188**, 5990-6000.
- Rahma, O.E., *et al.* (2012) A gynecologic oncology group phase II trial of two p53 peptide vaccine approaches: subcutaneous injection and intravenous pulsed dendritic cells in high recurrence risk ovarian cancer patients, *Cancer immunology, immunotherapy : CII*, **61**, 373-384.
- Rilke, F., *et al.* (1991) Prognostic significance of HER-2/neu expression in breast cancer and its relationship to other prognostic factors, *International journal of cancer. Journal international du cancer*, **49**, 44-49.
- Santoni, M., *et al.* (2013) Emerging role of tumor-associated macrophages as therapeutic targets in patients with metastatic renal cell carcinoma, *Cancer immunology, immunotherapy : CII*, **62**, 1757-1768.
- Sato, E., *et al.* (2005) Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 18538-18543.
- Serafini, P., *et al.* (2008) Myeloid-derived suppressor cells promote cross-tolerance in B-cell lymphoma by expanding regulatory T cells, *Cancer research*, **68**, 5439-5449.
- Sfanos, K.S., *et al.* (2008) Phenotypic analysis of prostate-infiltrating lymphocytes reveals TH17 and Treg skewing, *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, **14**, 3254-3261.
- Shankaran, V., *et al.* (2001) IFNgamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity, *Nature*, **410**, 1107-1111.

- Shintani, Y., *et al.* (2007) Intravesical instillation therapy with bacillus Calmette-Guerin for superficial bladder cancer: study of the mechanism of bacillus Calmette-Guerin immunotherapy, *Int J Urol*, **14**, 140-146.
- Schamhart, D.H., *et al.* (2000) Urinary cytokines reflecting the immunological response in the urinary bladder to biological response modifiers: their practical use, *European urology*, **37 Suppl 3**, 16-23.
- Siddiqui, S.A., *et al.* (2007) Tumor-infiltrating Foxp3-CD4+CD25+ T cells predict poor survival in renal cell carcinoma, *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, **13**, 2075-2081.
- Small, E.J., *et al.* (2000) Immunotherapy of hormone-refractory prostate cancer with antigen-loaded dendritic cells, *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, **18**, 3894-3903.
- Sugiyama, D., *et al.* (2013) Anti-CCR4 mAb selectively depletes effector-type FoxP3+CD4+ regulatory T cells, evoking antitumor immune responses in humans, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **110**, 17945-17950.
- Talks, K.L., *et al.* (2000) The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages, *The American journal of pathology*, **157**, 411-421.
- Thomas, D.A. and Massague, J. (2005) TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance, *Cancer cell*, **8**, 369-380.
- Thomas, L. and Lawrence, H.S. (1959) Cellular and humoral aspects of the hypersensitive states. In, *Symposia of the Section on Microbiology, the New York Academy of Medicine*,. P.B. Hoeber, New York,, pp. 529-532.
- Tomsova, M., *et al.* (2008) Prognostic significance of CD3+ tumor-infiltrating lymphocytes in ovarian carcinoma, *Gynecologic oncology*, **108**, 415-420.
- Townsend, K.N., *et al.* (2013) Markers of T cell infiltration and function associate with favorable outcome in vascularized high-grade serous ovarian carcinoma, *PLoS one*, **8**, e82406.
- van den Broek, M.E., *et al.* (1996) Decreased tumor surveillance in perforin-deficient mice, *The Journal of experimental medicine*, **184**, 1781-1790.
- Vesalainen, S., *et al.* (1994) Histological grade, perineural infiltration, tumour-infiltrating lymphocytes and apoptosis as determinants of long-term prognosis in prostatic adenocarcinoma, *Eur J Cancer*, **30A**, 1797-1803.
- Vivier, E., *et al.* (2012) Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer, *Nature Reviews Immunology*, **12**, 239-252.
- Voo, K.S., *et al.* (2009) Identification of IL-17-producing FOXP3+ regulatory T cells in humans, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**, 4793-4798.
- Ward, J.E. and McNeel, D.G. (2007) GVAX: an allogeneic, whole-cell, GM-CSF-secreting cellular immunotherapy for the treatment of prostate cancer, *Expert opinion on biological therapy*, **7**, 1893-1902.
- Weckermann, D., *et al.* (2001) Disseminated cytokeratin positive tumor cells in the bone marrow of patients with prostate cancer: detection and prognostic value, *The Journal of urology*, **166**, 699-703.

Woo, E.Y., *et al.* (2001) Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer, *Cancer research*, **61**, 4766-4772.

Zhang, L., *et al.* (2003) Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer, *N Engl J Med*, **348**, 203-213.

Zhao, W., *et al.* (1999) Characterization of the fibronectin binding motif for a unique mycobacterial fibronectin attachment protein, FAP, *The Journal of biological chemistry*, **274**, 4521-4526.

Zorn, E. and Hercend, T. (1999) A natural cytotoxic T cell response in a spontaneously regressing human melanoma targets a neoantigen resulting from a somatic point mutation, *European journal of immunology*, **29**, 592-601.

10 Seznam řešených grantů a vlastních publikací

Granty:

- GA UK 54/2005
Vliv interakce nádorovou buňkou na charakteristiky dendritických buněk u pacientů s karcinomem prostaty.
Effescst of interaction with a tumour cell on characteristics of dendritic cells from patients with prostate carcinoma.
2005-2006
- GA UK 7753/2007
Studium interakce dendritických buněk a lymfocytů pacientů se solidními nádory reprodukčního a vylučovacího traktu.
Examination of interaction of patients' dendritic cells and lymphocytes with solid tumors of reproductive and urinary system.
2007-2009
- VZ MSM 0021620812
Chronická onemocnění vznikající na podkladě nepřiměřené reaktivity imunitního systému, jejich patogeneze a možnosti včasné diagnostiky a léčby.
Chronic diseases originated from inappropriate reactivity of immune system, their pathogenesis and possibilities of their early diagnosis and treatment.
2005-2011

Původní články s IF související s disertací:

- Tobiášová Z, Pospíšilová D, Miller AM, Minárik I, Sochorová K, Spísek R, Rob L, Bartůnková J. In vitro assessment of dendritic cells pulsed with apoptotic tumor cells as a vaccine for ovarian cancer patients. *Clin Immunol.* 2007 Jan;122(1):18-27. **IF 3.551**
- Rozková D, Tiserová H, Fucíková J, Last'ovicka J, Podrazil M, Ulcová H, Budínský V, Prausová J, Linke Z, Minárik I, Sedivá A, Spísek R, Bartůnková J.. FOCUS on FOCIS: combined chemo-immunotherapy for the treatment of hormone-refractory metastatic prostate cancer.. *Clinical Immunology*, 2009, sv. 131, s. 1–10. ISSN 1521-6616. **IF 3.606**
- Minárik I, Lašřovička J, Budínský V, Kayserová J, Spíšek R, Jarolím L, Fialová, A, Babjuk M, Bartůnková J. Regulatory T cells, dendritic cells and neutrophils in patients with renal cell carcinoma. *Immunol Lett.* 2013 May;152(2):144-50. **IF 2.337**

Přehledové články související s disertací:

- Minárik I., Dendritic cell vaccines for prostate cancer. Polish Journal of Urology, 2007, sv. 60, s. 133–137. ISSN 0500-7208

Abstrakta související s disertací:

- I Minárik, Z Tobiasova, R Spisek, J Bartunkova, I Kawaciuk. Phenotype and function analysis of dendritic cells from patients after radical prostatectomy for prostate carcinoma. 7th EFIS Tatra Immunology Conference, 24.-28.6.2006. Štrbské Pleso, Slovakia.
- Z Tobiasova, D Pospisilova, I Minárik, R Spisek, L Rob, J Bartunkova. DC-based immunotherapy in patients with ovarian cancer – in vitro studies. 7th EFIS Tatra Immunology Conference, 24.-28.6.2006. Štrbské Pleso, Slovakia.
- I Minárik, Z Tobiasova, I Kawaciuk, J Bartunkova. Charakteristika funkce a fenotypu dendritických buněk pacientů po radikální prostatektomii pro karcinom prostaty. Česká urologie, 2006, p. 87. (Výroční konference České urologické společnosti ČLS JEP 11.-13.října 2006)
- I Minárik, Z Tobiasova, I Kawaciuk, J Bartunkova. Phenotype and function analysis of dendritic cells from patients after radical prostatectomy for prostate carcinoma. European Urology Meetings 2006; 1(1): 129.
- Minárik, Ivo. Vakcína z dendritických buněk pro nemocné s karcinomem prostaty. In Abrahámová Jitka. Vybrané otázky onkologie XI.. Praha: Galén, 2007. s. 93–98.
- Minárik Ivo, Tobiášová Zuzana, Kawaciuk Ivan, Bartunkova Jirina. Phenotype and function analysis of dendritic cells from patients with prostate carcinoma after radical prostatectomy, FOCIS 2007, San Diego, USA
- Minárik, Ivo. Zastoupení populací dendritických buněk v periferní krvi a nádoru u pacientů s karcinomem ledviny. Sjezd ČSAKI 2008, Praha
- Minárik, Ivo. Vakcína z dendritických buněk pro pacienty s karcinomem prostaty. Výroční konference ČUS, 10/2008, Hradec Králové, přednáška
- Minárik, Ivo. Preparation of dendritic cell vaccine in patients with prostate cancer and its in vitro efficacy. European Urology Meetings 2008; 3(10):148
- Minárik, Ivo. Charakteristika dendritických buněk a zastoupení regulačních T-lymfocytů v krvi a nádorové tkáni u pacientů se světlobuněčným karcinomem ledviny - přednáška na výročním sjezdu ČUS JEP, 2009. Praha
- Minárik, I., Lašovička, J., Budínský, V., Kawaciuk, I., Bartůňková, J. Characteristics of dendritic cells and regulatory T-lymphocytes in the blood and tumor tissue in patients with renal cell carcinoma. European Urology Supplements. 2009 April; 8(8):676-677.
- Minárik, R. Horváth, M. Podrazil, H. Hromádková, P. Dušek, L. Jarolím, M. Babjuk, J. Bartůňková. Phase I/II of clinical study of prostate cancer immunotherapy using dendritic cell vaccination strategy – first results. European Urology Supplements. 2010 September; 9(6): 629
- Minárik I., Horváth R., Podrazil M., Hromádková H., Špišek R., Dušek P., Jarolím L., Babjuk M., Bartůňková J. Fáze I/II klinické studie imunoterapie karcinomu prostaty pomocí vakcinace dendritickými buňkami – první výsledky. Ces Urol 2010; 14(4): 26
- Minárik I., Špišek R., Podrazil M., Dušek P., Jarolím L., Bartůňková J., Babjuk M. Klinické studie fáze I/II imunoterapie dendritickými buňkami u pacientů s biochemickou recidivou a hormon refrakterním karcinomem prostaty – výsledky po 1 roce. Ces Urol 2011; 15(Suppl 2):63

- I. Minárik, J. Lašt'ovička, V. Budinský, J. Kayserová, R. Špíšek, L. Jarolím, A. Fialová, M. Babjuk and J. Bartůňková. Regulační T lymfocyty, dendritické buňky a neutrofilů u pacientů s renálním karcinomem. *Ces Urol* 2013; 17(Suppl 1), 22.
- Jarolím L., Špíšek R., Podrazil M., Babjuk M., Fučíková J., Fialová A., Minárik I., Hromádková H., Bartůňková J.: Klinická studie imunoterapie fáze I/II pomocí dendritických buněk u nemocných s karcinomem prostaty a biochemickou recidivou. *Klinická urologia* 2013; 9: 10.
- Špíšek R., Podrazil M., Babjuk M., Jarolím L., Fučíková J., Fialová A., Minárik I., Hromádková H., Bartůňková J.: Klinické studie fáze I/II imunoterapie pomocí dendritických buněk u pacientů s biochemickým relapsem karcinomu prostaty. *Journal of Clinical Oncology* 2013; 5: 65.
- Jarolím L., Špíšek R., Podrazil M., Babjuk M., Fučíková J., Fialová A., Minárik I., Hromádková H., Bartůňková J.: Phase I/II clinical trials of dendritic cell-based immunotherapy in patients with the biochemical recurrence of the prostate cancer. *Urology* 2013; 82 (3 Suppl 1): S30.
- Minárik I., Lašt'ovička J., Budinský V., Kayserová J., Špíšek R., Jarolím L., Fialová A., Babjuk M., Bartůňková J.: Regulatory T lymphocytes, dendritic cells and neutrophils in patients with renal cell carcinoma. *Eur Urol Suppl* 2013;12;e1112
- Jarolím L., Špíšek R., Podrazil M., Babjuk M., Fučíková J., Fialová A., Minárik I., Hromádková H., Bartůňková J.: Dendritic cell-based immunotherapy in patients with rising PSA after radical prostatectomy or salvage radiotherapy (phase I/II clinical trials). *Eur Urol Suppl* 2013;12;e1264.
- Jarolím L., Špíšek R., Podrazil M., Babjuk M., Fučíková J., Fialová A., Minárik I., Hromádková H., Bartůňková J.: Imunoterapie pomocí dendritických buněk u nemocných s elevací PSA po radikální prostatektomii nebo salvage radioterapii. *Česká urologie* 2013; 17 (Suppl. 1): 54.
- Jarolím L., Špíšek R., Podrazil M., Babjuk M., Fučíková J., Fialová A., Minárik I., Hromádková H., Bartůňková J.: Long-term immunotherapy by dendritic-cells based vaccine in patients with PSA-recurrent prostate cancer. *Eur Urol Suppl* 2014;13;e872.

Původní články s IF nesouvisející s disertací:

- Vesely S, Jarolim L, Schmidt M, Minarik I, Dusek P, Babjuk M. Parameters derived from the postoperative decline in ultrasensitive PSA improve the prediction of radical prostatectomy outcome. *World J Urol.* 2013 Apr;31(2):299-304. **IF 2.888**