

Univerzita Karlova v Praze

2. lékařská fakulta

**Ovlivnění růstu tumoru
na experimentálním zvířecím modelu**

Postgraduální doktorské studium biomedicíny
Dizertace z oboru experimentální chirurgie

MUDr. Alexandr Kučera

Praha 2010

Univerzita Karlova v Praze

2. lékařská fakulta

Postgraduální doktorské studium biomedicíny

Disertační práce z oboru experimentální chirurgie

Téma: Ovlivnění růstu tumoru na experimentálním zvířecím modelu

Uchazez : **MUDr. Alexandr Kučera**
Klinika dětské chirurgie UK Praha
2. LF a FN Motol
V Úvalu 84, Praha 5

Školitel: **Prof. MUDr. Richard Škába CSc.**
Klinika dětské chirurgie UK Praha
2. LF a FN Motol
V Úvalu 84, Praha 5

Konsultant: **Doc. MUDr. Radek Špíšek Ph.D.**
Ústav imunologie UK Praha
2. LF a FN Motol
V Úvalu 84, Praha 5

Oborová rada: **Experimentální chirurgie**

Předseda oborové rady: **Prof. MUDr. Jaroslav Živný DrSc.**

Poděkování

Prof. MUDr. Richardu Škábovi CSc. za odborné vedení a podporu v průběhu celého studijního programu

Prof. MUDr. Jiřímu Šnajdaufovi DrSc., přednostovi Kliniky dětské chirurgie 2.LF UK Praha, za umožnění kombinovaného postgraduálního studia

Doc. MUDr. Radkovi Špíškovi Ph.D. za cenné rady a odborné vedení v imunologické oblasti výzkumu

Prof. MUDr. Janovi Hergetovi DrSc. za poskytnutí zázemí experimentálních laboratorí v Ústavu fyziologie 2.LF UK Praha

Mým kolegům MUDr. Monice Šervinkové, MUDr. Magdalén Šimsově, MUDr. Ondřeji Petru za pomoc při operacích a měřeních při experimentální studii

Kvůli Venclíkové z laboratoře Ústavu fyziologie 2.LF UK Praha za technickou pomoc při experimentální studii

Ústavu molekulární genetiky AV ČR, především Mgr. Petru Pajerovi za poskytnutí sarkomové linie

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem záv re nou práci zpracoval samostatn a že jsem uvedl všechny použité informa ní zdroje. Sou asn dávám svolení k tomu, aby tato záv re ná práce byla archivována v Ústavu v deckých informací 2. léka ské fakulty Univerzity Karlovy v Praze a zde užívána ke studijním ú el m. Za p edpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou p ednáškovou nebo publika ní aktivitu, se zavazuje, že bude tento zdroj informací ádn citovat.

Souhlasím se zp ístupn ím elektronické verze mé práce v Digitálním repozitá i Univerzity Karlovy v Praze (<http://repositor.cuni.cz>). Práce je zp ístupn na pouze v rámci Univerzity Karlovy v Praze.

V Praze dne 15.4.2010

MUDr. ALEXANDR KU ERA

Obsah

1. Úvod do problematiky	6
1.1 Specifická a nespecifická imunita.....	12
1.2 Nádorové antigeny.....	14
1.3 Buňky imunitního systému.....	15
1.4 Dendritické buňky	17
2. Cíle studie	22
3. Materiál a metodika	24
3.1 Indukce tumoru Diethylnitrosaminem.....	24
3.2 Indukce tumoru pomocí sarkomové linie	24
3.3 Příprava dendritických buněk.....	25
3.4 Kvantifikace produkce IL-12.....	26
3.5 Protoková cytometrie.....	26
3.6 Indukce nádorově specifických T lymfocytů in vitro	26
3.7 Podání vakcíny založené na DC in vivo	27
3.8 Statistická analýza	27
4. Výsledky	28
4.1 Příprava zralých DC.....	32
4.2 In vivo protinádorová imunoterapie.....	37
5. Diskuze	39
6. Použití imunoterapie v klinické praxi	46
7. Závěr	50
8. Souhrn	52
9. Abstract	53
10. Literatura	54
11. Seznam zkratk	63

1. Úvod do problematiky

Nádorová onemocnění jsou stále tíživějším problémem v oblasti veřejného zdraví. Podle zprávy Mezinárodní agentury pro výzkum rakoviny (IARC) se za posledních 30 let výskyt nádorových onemocnění zdvojnásobil. Odhaduje se, že v roce 2008 bylo diagnostikováno více než 12 milion nových případů nádorových onemocnění, 7 milion lidí v důsledku tohoto onemocnění zemřelo, a dalších 25 milion lidí žilo s nádorovým onemocněním. Přes zlepšení onkologické péče a zlepšení dostupnosti léčby narůstá počet onkologických onemocnění. Na této skutečnosti se podílí trvalý růst a stárnutí světové populace. Zpráva IARC zdrazňuje globální „onkologickou krizi“. Problémem i pro bohaté země je otázka, jak získat dostatek finančních prostředků, aby se všem pacientům dostalo léčby a aby mohla být poskytována paliativní, podpůrná a terminální péče v velkém množství. Kromě toho čím dál tím větší důraz je kladen na prevenci vzniku nádorových onemocnění (boj s obezitou, kouření atd.) a také na včasnou diagnostiku nádoru. V posledních letech byla zavedena řada screeningových programů. Na začátku roku 2009 zahájilo Ministerstvo zdravotnictví ČR celorepublikový screeningový program zaměřený na včasný záchyt kolorektálního karcinomu. Navazuje tak na program pro screening nádoru prsu, který v České republice úspěšně probíhá od roku 2002, a program pro screening nádoru hrdla doložního, který byl zahájen v roce 2008. Neustále se hledají nové postupy v léčbě nádorů, které by zlepšily léčbu a přežití pacientů. V posledních letech především v oblasti imunoterapie.

V České republice je ročně onkologické onemocnění diagnostikováno u více než 67000 pacientů, z čehož 27000 zemře. S nemocí žije 387 000 lidí. Počet úmrtí na jednotlivé nádorové onemocnění je znázorněn v tabulce.

Počet úmrtí žen na nádorové onemocnění v ČR za rok 2005

Ženy	
Prs	5533
Tlusté střevo a konečník	3236
Děloha a děložní šípek	2742
Pľíce	1617
Krev a mízní tkáň	1404
Vaječník	1121

Počet úmrtí mužů na nádorové onemocnění v ČR za rok 2005

Muži	
Prostata	4846
Tlusté střevo a konečník	4746
Pľíce	4632
Močový měchýř	1180
Ledvina	1821
Krev a mízní tkáň	1602

Počet úmrtí za rok, ÚZIS, 2005

Úmrtnost (mortalita) na zhoubné novotvary je v České republice mezi vyspělými zeměmi jedna z nejvyšších, což je dáno i tím, že patříme mezi onkologicky nejzatíženější populace v Evropě [1]. Mezi evropskými zeměmi přetrvávají dvojnásobné rozdíly v mortalitě a incidenci nádorových onemocnění. Nejvyšší úmrtnost mužů v letech 2000-2004 najdeme v Maarsku 255,2 úmrtí na 100000 obyvatel za rok, v České republice 215,9/100000, na druhém konci spektra jsou Švédsko, Finsko, Švýcarsko s přibližně 130 úmrtími na 100000 jedinců. Nejhorší výsledky má ČR v přežití u kolorektálního karcinomu. Tento fakt je důsledkem skutečnosti, že více než 50 % pacientů s touto diagnózou je v ČR diagnostikováno v pokročilém klinickém stadiu a tedy ve stavu, kde je pravděpodobnost dlouhodobého přežití výrazně snížena. Vysoký podíl pozdě zachycených nádorů tak snižuje celkové výsledky léčby ve srovnání s dalšími zeměmi. Ze statistik je zřejmé, že nádorové onemocnění je velkým problémem dnešní doby a hledáme kromě již osvědčených léčebných postupů také další možnosti. Dnes standardně používanými léčebnými metodami je léčba chirurgická, chemoterapie a radioterapie. Léčba jen malé části nádorů je možná pouze jednou z výše uvedených modalit. K dosažení dobrého léčebného efektu je nutná kombinace léčebných metod. Ke zlepšení přežití pacienta by mohlo pomoci zavedení nových postupů, které jsou v dnešní době ve stádiu výzkumu.

Nejúspěšnějším způsobem odstranění nádorové tkáně je chirurgická léčba. Na našem pracovišti, které je centrem pro léčbu děložních nádorů, operujeme ročně kolem 100 pacientů s nádorem.

Nádory operované na klinice dětské chirurgie 2005-2008

	2005	2006	2007	2008
Tumor hrudní stěny	2	6	2	3
Plicní metastáza - thorakoskopie	6	4	5	2
Plicní metastáza - resekce plic	3	9	7	5
Nádor žaludku	2	1	1	
Nádor tenkého stěva			1	
Nádor tlustého stěva	3		2	
Sakrokokcygeální teratom	8	5	3	2
Currarinova triáda		1		4
Neurofibrom mesenteria			1	
Desmoid mesenteria			1	
Benigní nádor jater - resekce		1	1	1
Hepatoblastom	4	5	3	1
Hepatocelulární karcinom + sarkom	2	2		
Fokální nodulární hyperplázie - FNH			1	2
Hemangiom jater				1
Papilární cystický a solidní tumor pankreatu (PCSTP)				3
Karcinom pankreatu				1
Neuroblastom	19	16	12	15
Nefroblastom (Wilms)	8	6	7	7
Tumor močového měchýře - biopsie		1		
Adrenokortikální nádor nadledviny	5	4	4	2
Lymfangiom retroperitonea		1	2	
Nádor varle	4	6	4	4
Kožní hemangiom	18	22	11	14
Kožní lymfangiom	8	7	6	5
Pigmentové névy	12	13	15	8
Tumor měkkých tkání	2	5	4	8
Lipom	9	9	6	3
Sarkom pánve				2
Celkem	115	124	99	93

Chirurgická léčba má svá omezení. V některých případech není možné nádor celý odstranit, někdy zstanou nádorové buňky po odstranění nádoru v hraniční tkáni. V této fázi onemocnění také ještě nelze detekovat vzdálené metastatické postižení. Eliminace této tzv. minimální reziduální nemoci (MRN) je pro přežití pacienta klíčová. K eliminaci MRN se v současné době používá chemoterapie, radioterapie. V posledních letech se jeví další možnosti i zavedení imunoterapie.

Zásadní význam imunitního systému v souvislosti s nádorovým bujením je znám již dlouho. Z historie byla popsána řada případů, kdy došlo k vymizení nebo alespoň regresi tumoru po proběhlé bakteriální infekci. Vyvolání imunitní reakce proti bakteriím působilo také na růst nádoru. Tento efekt byl popsán nejprve u erysipelu. V 19. století popsal Busch po proběhlé infekci erysipelu regresi a následný relaps lymfomu. Na přelomu 19. a 20. století Fehleisen a Bainbridge popsali po erysipelu regresi u karcinomu prsu. Problematikou se nejvíce zajímal na konci 19. století americký chirurg W. Cooley, který zaznamenal regresi sarkomu po proběhlé bakteriální infekci. Po řadě zkušeností vytvořil vlastní sérum, které bylo kombinací mrtvých bakterií *Streptococcus pyogenes* a bakterií *Serratia marcescens*, a které bylo po něm nazváno Cooleyho toxin. Cooley vyzkoušel svou metodu na řadě dalších pacientů, než musel s metodou skončit pro drastický průběh léky a ne zcela přesvědčivé výsledky. V roce 1950 byly publikovány studie, které ukázaly, že inbrední myši mohou být imunitizovány proti nádorovým karcinogeny, a že protilátky vytvořené proti tumoru byly specifické [2].

V roce 1957 byla formulována Thomasem a Burnetem hypotéza o protinádorovém imunitním dohledu. Tato hypotéza spoívá v tom, že imunitní systém v as rozpoznává zm n né mutované bu ky a odstraní je.

V posledních 30 letech se vlivem obrovského rozvoje imunologie pokouší ada experimentálních i klinických studií vyvolat imunitní reakci proti nádor m a tím ovlivnit jejich r st. Principem t chto metod je použití antigen prezentujících bun k, které hrají velmi významnou úlohu v imunitní reakci a tvo í spojovací lánek mezi nespecifickou a specifickou imunitní reakc í. Po styku s nádorovým antigenem tento antigen prezentující bu ka vystaví na svém povrchu. Existují postupy, kterými lze v laborato i p ipravit z monocyt pacienta obrovské množství dendritických bun k. Poté, co jsou takto p ipravené dendritické bu ky „p inuceny“ pohlit a vystavit na svém povrchu nádorové antigeny, je možno je injikovat zp t pacientovi s nádorovým onemocn ním jako jistou formu proti nádorové vakcíny. Prezentace nádorových antigen v lymfatických uzlinách by v optimálních podmínkách vedla ke vzniku protinádorové imunitní reakce, a tím ke zlepšení prognózy onemocn ní. Tento postup je nazýván vakcinací, stejn jako u infek ních onemocn ní, protože se snažíme po podání antigenu vyvolat následnou imunitní reakci. Termín vakcinace je spojen s Edwardem Jennerem, anglickým venkovským léka em, který si všiml, že doji ky, které prod laly kravské neštovice, nikdy neonemocn ly pravými neštovicemi. Jenner v postup byl pojmenován "vakcinace", pocházející ze slova vacca (latinsky kráva).

1.1 Specifická a nespecifická imunita

V obraně proti nádorům se podílí obě složky imunitního systému, jak systém specifické (adaptivní) tak i nespecifické (přirozené) imunity. Jednotlivé složky imunity spolu úzce spolupracují a navzájem se ovlivňují, a regulují buď přímým kontaktem zprostředkovaným adhezivními molekulami na buněčném povrchu, nebo rozpustnými mediátory, zejména cytokiny.

Buněčné složky nespecifické imunity (makrofágy, NK buňky, granulocyty) a nespecifické humorální složky (komplement, antimikrobiální peptidy, cytokiny), jsou schopny rychlé detekce přítomnosti patogenu v organismu. Jde o systém vývojem starší. Obranná reakce v případě nespecifické imunity je velmi rychlá, uniformní, tj. vždy stejná a už se s antigenem dříve setkali nebo ne. Nespecifická imunita nemá mechanismy, které by zabezpečily vznik imunologické paměti.

Představiteli specifické buněčné imunity jsou T lymfocyty a specifickou humorální imunitu zastupují produkty plazmatických buněk - protilátky. Specifita spoívá v rozpoznání antigenu. Klíčovým mechanismem pro funkci specifické imunity je proces vzniku specifických receptorů na B a T lymfocytech. Výsledkem náhodného přeskupování genových segmentů u genů pro T a B lymfocyty je existence obrovského množství receptorů s přesně definovanou specifitou, tedy velká zásobárna antigen specifických lymfocytů. Bohužel lymfocyt pro určitý antigen je velmi malé množství a tento počet je pro úspěšnou obranu organismu nedostačující. Nejprve dochází ke klonální expanzi a vytvoření dostatečné populace efektorových buněk.

Tento proces trvá v tšinou 4-7 dní. Při opakovaném setkání s patogenem je situace odlišná, v organismu jsou vytvořeny paměťové T a B lymfocyty a sekundární odpověď je mnohem rychlejší. Lymfocyty T se vyvíjejí z lymfoidních předchůdců z kostní dřeně a dozrávají v thymu (brzlíku). Dělí se podle funkcí na několik podskupin. Ty je možné rozlišit pomocí membránových znaků (receptorů) označovaných jako CD. Podskupina T lymfocytů která má na povrchu receptor CD4 má zejména funkci pomocná, helper. Rozpoznává antigen, který předkládá buňka prezentující antigen. Druhá hlavní podskupina T lymfocytů má znak CD 8. Tato subpopulace vykonává funkci cytotoxickou a supresorovou (ničí infikované nebo nádorové buňky a potlačuje imunitní reakci).

Lymfocyty B mají své označení od slova Bursa, nebo u ptáků existuje orgán zvaný Fabriciova bursa, kde lymfocyty dozrávají. Konečným stadiem B lymfocytů jsou plazmatické buňky, které vytvářejí protilátky, proti antigenu, který reakci vyvolal. Povrchové molekuly typické pro B lymfocyty jsou CD 19 a CD20. Aktivace T a B lymfocytů je poměrně složitý proces, který je pod přísnou kontrolou. Aktivace nesprávných lymfocytů může mít pro organismus fatální následky, například v podobě autoimunitních onemocnění. Během vývoje T a B lymfocytů je sada autoreaktivních buněk eliminována. Kontrolním mechanismem je síť regulací T lymfocytů. Dalším klíčovým mechanismem je fakt, že k aktivaci T lymfocytů nestačí pouze přítomnost antigenu, ale antigen musí být předkládán antigen prezentujícími buňkami. Nejúčinnějším představitelům antigen prezentujících buněk jsou dendritické buňky (DC). Dendritické buňky tedy plní roli prostředníka mezi systémy nespecifické a specifické imunity. Způsobují, že může dojít k plnohodnotné imunitní reakci.

1.2 Nádorové antigeny

Imunitní systém patří k základním homeostatickým mechanismům a jeho úkolem je chránit organismus před škodlivinami zevního i vnitřního prostředí. Imunitní systém přebíhá u staré, poškozené nebo zmutované buňky. Tyto struktury imunitní systém rozpozná pomocí antigenů. Nejvýznamnějšími antigeny jsou proteiny a různé komplexní polysacharidy. Nejčastěji jsou antigeny z vnějšího prostředí, jsou nazývány exoantigeny. Antigeny, které pocházejí z organismu samotného nazýváme autoantigeny.

Základním předpokladem reakce imunitního systému s nádorovými buňkami je existence nádorově specifických antigenů, které by umožnily imunitnímu systému jejich rozpoznání. Rozlišujeme dvě kategorie nádorových antigenů. Jedná se o antigeny specifické pro nádory (TSA). Mezi tyto antigeny patří proteiny, které se na normálních buňkách nevyskytují. Například komplexy MHC jsou vázány s abnormálními fragmenty buněčných proteinů, nebo s fragmenty proteinů onkogenních virů. Druhou kategorií jsou antigeny asociované s nádory (TAA). Tyto antigeny nejsou výlučně specifické pro nádorové buňky ale nacházejí se i na některých normálních buňkách. Odlišnost spoívá v kvantitativní expresi, nebo v časové abnormalitě exprese. Tyto antigeny se používají jako pomocné diagnostické markery. Patří sem onkofetální antigen například -fetoprotein (AFP), karcinoembryonální antigen (CEA), některé melanomové antigeny (AGE-1, Melan-A), prostatický specifický antigen (PSA) [3].

1.3 Buňky imunitního systému podílející se na obraně proti nádorům

Pokud je abnormalita nádorových buněk imunitním systémem rozpoznána, na boji s nádorovými buňkami se podílí v zásadě všechny hlavní imunitní mechanismy: nespecifické (neutrofilní granulocyty, makrofágy, NK buňky, i antigenem specifické (protilátky aktivující komplement, Th1, Tc – buňky). Které konkrétní složky imunitního systému mají vliv na proti nádorovou imunitu se prokázalo v řadě experimentálních studií.

Zásadní význam v obraně proti nádorům mají T a B lymfocyty. I athymické myši nejsou zcela imunodeficitní, lze u nich detekovat významné množství cirkulujících T lymfocytů. Až pokusy na myších bez funkčních genů RAG1 a RAG2 (RAG^{-/-}), které nemají T a B lymfocyty, se podařilo prokázat, že u těchto myší se vyvinou indukované nádory rychleji a vzniká také více spontánních nádorů [4].

Další důležitou složkou v proti nádorové imunitě jsou NK buňky (přirozeně zabíječi). Jsou to lymfocyty, které nejsou ani T, ani B. Patří do systému nespecifické imunity a významně se podílejí na zabíjení buněk infikovaných viry, nebo nádorovými změnami. Rozpoznávají a ničí zejména ty buňky, které nemají HLA molekuly. Obsahují perforiny, kterými ničí cílovou buňku. Selektivní eliminace NK buněk u myší po podání anti-asialo-GM¹ protilátky, jiní myši 3x vnímavější k chemicky indukovaným tumorům.

Dalším typem buněk podílejícím se na protinádorové imunitě jsou NK-T-lymfocyty. Tyto buňky jsou bohatým zdrojem cytokinů (např. IFN- γ , IL-4) a mají pravděpodobně klíčovou regulační funkci. Myši, které nemají NKT buňky (kmen J 281 -/-), mají také vyšší incidenci indukovaných tumorů [5-7].

Velký význam v protinádorové imunitě má cytokin IFN- γ , který podporuje tvorbu antigen- specifických CD4 Th1 buněk a cytotoxických T lymfocytů, podporuje také aktivaci dendritických buněk a makrofágů a inhibuje angiogenezi. Při neutralizaci IFN- γ monoklonálními protilátkami nebo pomocí genetické manipulace se zvyšuje vnímavost k chemicky indukovaným, i spontánním tumorům [8].

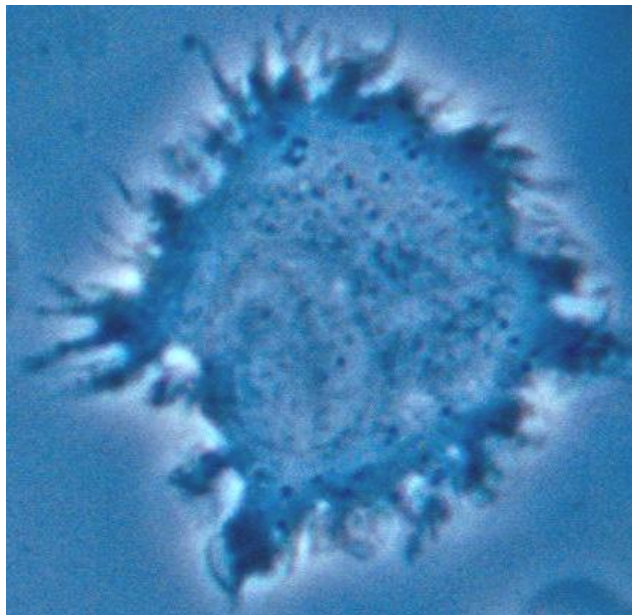
Indukce specifické protinádorové imunitní odpovědi byla prokázána u celé řady lidských nádorových buněk, např. maligního melanomu, leukémií, renálního karcinomu, karcinomu prostaty, ovariálního karcinomu a dalších [9-13].

Základním předpokladem, aby mohl imunitní systém spustit účinnou reakci proti nádoru, musí nádorovou buňku nebo specifický povrchový antigen rozpoznat. V tom hrají zásadní úlohu fagocytující buňky, zvláště buňky dendritické, které zpracovávají a prezentují antigen.

1.4 Dendritické buňky

Dendritické buňky jsou nejužším představitelem skupiny antigen prezentujících buněk (APC). Poprvé dendritické buňky popsal Langerhans už v roce 1968, avšak jako nervové buňky kůže. Jejich pravou funkci objevily až Steinman a Cohn, kteří jsou tedy považováni za jejich objevitele. V roce 1973 určil, že se jedná o buňky odlišné od makrofágů, a že se tyto buňky specializují na stimulaci naivních T lymfocytů. Dendritické buňky jsou zvláštním typem fagocytujících buněk. Mezi fagocytující buňky ještě patří neutrofilní a eosinofilní granulocyty, monocyty a jejich tkáňová forma makrofágy. Mezi těmito buňkami je ale značný rozdíl. Základním rozdílem je, že neutrofilní granulocyty neexprimují za normálních okolností MHC proteiny II. třídy a nejsou tedy buňkami prezentujícími antigen. Úlohou dendritických buněk je především zpracování a předkládání antigenu. Tím aktivují naivní T lymfocyty a tvoří spojnici mezi nespecifickou a specifickou imunitou. Makrofágy se stávají plně funkčními až po aktivaci signály, které jim poskytnou T lymfocyty ve formě cytokinů (TNF, IFN- γ). Dendritické buňky jsou tedy jako jediné schopny aktivovat naivní T lymfocyty.

DC vznikají z kmenových buněk v kostní dřeně, odkud jsou již jako nedělicí se buňky vyplavovány do krevního oběhu. V dendritické buňky se také mohou diferencovat monocyty. V různých tkáních se buňky odvozené od monocytů nazývají různými jmény. Langerhansovy buňky v kůži, Kupfferovy buňky v játrech, alveolární makrofágy v plicích, peritoneální makrofágy v dutině břišní, oligodendroglie v centrálním nervovém systému. Typická morfologie dendritické buňky je na obr. 1.



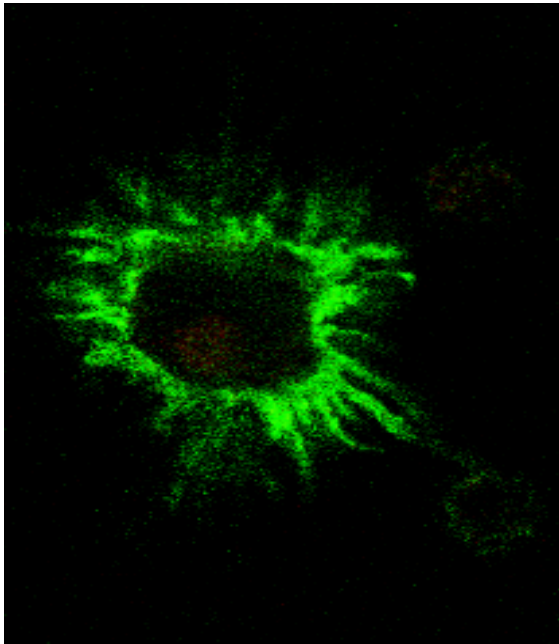
Obr. .1 DC ve sv telném mikroskopu

Zpracování a prezentace antigenu lymfocyt m, je jedním z hlavním krok vyvolání specifické imunitní reakce. P i aktivaci dendritických bun k se produkují cytokiny, které aktivují specifické složky imunity a zároveň zprost edkují celkovou reakci organismu. Zejména IL 1, IL 6, TNF. Dendritické bu ky se vyskytují tém ve všech orgánech a tkáních a cestují mezi krví a lymfou. Dendritické bu ky se nevyskytují pouze v mozku, v testes a v corney. Nejvíce dendritických bun k je v k ži a ve sliznicích dýchacího a trávicího tra ktu.

Možnost získat dostate né množství DC z periferních monocyt in vitro za p ítomnosti Interleukin – 4 (IL-4) a faktoru stimulujícího kolonie granulocyt a makrofág (GM-CSF) umožnila jejich intenzivní studium a b hem posledních 5 let byl u in n zna ný pokrok ve znalostec h o jejich p esné funkci v organismu a jejich fyziologii [14-17].

V periferních tkáních se DC vyskytují v tzv. nezralém stavu a na svém povrchu nemají molekuly nezbytné pro aktivaci T lymfocytů jako např. CD40, CD54, CD80, CD86 a znaky typické pro zralé DC. V tomto stadiu nestimulují T lymfocyty, ale pohlcují okolní antigeny [18]. V nezralém stavu má dendritická buňka na svém povrchu soubor antigenů poskytující reprezentativní vzorek látek přítomných v jejím okolí. Pro efektivní aktivaci T lymfocytů její výbava ovšem nedostačuje. Práce z poslední doby spíše naznačují, že funkcí nezralé DC in vivo je indukce specifické tolerance proti vlastním antigenům. DC se tedy významně podílí na zachování tolerance v i vlastním tkáním. DC přiběžně pohlcují odumřelé molekuly vlastních tkání, fragmenty molekul zpracují a vystaví v komplexu s MHC proteiny na svém povrchu. T lymfocyty autogeny poznají a jsou utlumeny nebo reakce vůči antigenu aktivně potlačují, vytváří tzv. regulaci T lymfocytů. Tento mechanismus je pro organismus velmi důležitý. Kdyby docházelo ke stimulaci imunitní odpovědi i za klidového stavu, značně by se zvýšilo riziko vzniku autoreaktivních klonů T i B lymfocytů a z toho pramenící nebezpečí vzniku autoimunitních onemocnění [17-19].

Jiná situace nastává, při narušení integrity organismu. Nebezpečím může být reprezentováno řadou situací. Klasicky jde o přítomnost infekčního patogenu a nebo velkého množství buněk hynoucích nekrotickou smrtí. Detekce těchto specifických signálů nastartuje proces maturace dendritické buňky, vedoucí k výrazné změně fenotypu a funkčních vlastností DC. Dendritická buňka přestane pohlcovat okolní antigeny a zpracovává fragmenty, které ji aktivovaly. Zvýšená transkripce genů pro hlavní histokompatibilní komplex MHC I. a II. tedy má za následek vyšší syntézu těchto molekul a jejich zvýšený transport na membránu. Obrázek DC při označení povrchovou protilátkou proti CD 80 je na obr. 2.



Obr. 2. Typická morfologie DC při značení povrchovou protilátkou proti CD 80 a pozorování v konfokálním mikroskopu.

Dendritické buňky tvoří komplex MHC molekuly a zpracovaného antigenu na povrchu. Pohltí exogenní antigen, který je degradován na polypeptidy v endozomech a navázán na molekulu MHC II. Tedy, kterou poté prezentuje na buněném povrchu. K cytotoxické reakci prostřednictvím CD 8+T lymfocyt je nutná prezentace antigenního peptidu na molekule MHC I. Tedy. Takto zpracovaný antigen je endogenního původu a pochází z vlastních buněk organismu, nebo z intracelulárních parazitů (virů). DC však dokážou na MHC I. Tedy navázat také exogenní antigeny.

Tento proces nazývaný cross – priming umožňuje primární aktivaci T lymfocyt s požadovanou antigenní specifitou, například právě v imunoterapii nádorů. Rozpoznání komplexu MHC – peptid na DC receptorem na T lymfocytech představuje první signál. Druhým signálem k aktivaci lymfocyt je interakce mezi koostimulačními molekulami na DC a jejich ligandy na T lymfocytech. Při nedostatku druhého signálu je indukována anergie T lymfocytů. Během maturace dochází k přesmyku v expresi chemokinových receptorů a DC se přesunuje do lymfatických uzlin, kde aktivuje antigen specifické T lymfocyty. Zralé DC exprimují celou sadu koostimulačních molekul (CD 80, CD 86), adhezivních molekul, cytokinů (např. IL-1, IL-6, TNF, IL-12), které jsou potřebné pro optimální stimulaci T lymfocytů [19,20].

Stejně jako u lymfocytů, tak u dendritických buněk lze rozlišit celou sadu subpopulací. Hlavní jsou dva základní podtypy. Výše popisované nezralé a zralé DC jsou označovány jako myeloidní (mDC). Kromě nich existují ještě morfologicky i funkčně zcela odlišné plazmocytoïdní DC (pDC). Název dostali pro svou podobu připomínající plazmatické buňky, avšak funkčně s nimi žádnou podobu nemají. Pro mDC jsou hlavními růstovými faktory IL4 a GM-CSF a hlavní funkcí je stimulovat specifické T lymfocyty. Hlavními růstovými faktory plazmocytoïdních buněk jsou CD40L a IL3 a hlavním znakem je exprese receptoru pro IL3, kterým je CD 123. Plazmocytoïdní dendritické buňky, stejně jako myeloidní, po stimulaci dozrávají a stimulují specifické T lymfocyty. Avšak hlavním rozdílem je, že plazmocytoïdní dendritické buňky exprimují receptory nukleových kyselin TLR 7, TLR 9 a po setkání s virem produkují velké množství interferonu. V současné době není zcela jasné kolik subpopulací dendritických buněk existuje a jaké jsou mezi nimi vývojové vztahy. Je však již zcela jasné, že mají zásadní úlohu v indukci imunitní reakce.

2. Cíle studie

Objevení klíčové role dendritických buněk pro zahájení imunitní reakce podnítilo úvahy o jejich možném využití v klinické medicíně pro specificko-protinádorovou imunoterapii.

Cílem této studie je vytvořit model terapeutické protinádorové vakcinace pomocí dendritických buněk na modelu fibrosarkomu. Náš výzkum má několik částí.

V první fázi hledáme způsob pomocí nichž bychom indukovali tumory u experimentálních zvířat. Tumor bychom indukovali dvěmi způsoby. V první skupině pomocí kancerogenních látek a v druhé pomocí sarkomové linie.

V druhé fázi bychom připravili protinádorovou vakcínu z monocytů periferní krve. Chtěli bychom charakterizovat připravenou vakcínu založenou na dendritických buňkách, které prezentují nádorové antigeny a ukázat, že tyto buňky jsou schopny indukovat protinádorovou imunitní odpověď. Principem je použití *in vitro* připravených DC, které prezentují vhodnou formu nádorových antigenů. Existují postupy, kterými lze v laboratorii připravit z monocytů pacienta velké množství dendritických buněk. Poté, co jsou takto připravené dendritické buňky „přinuceny“ pohltit a vystavit na svém povrchu nádorové antigeny, je možné je aplikovat zpit pacientovi s nádorovým onemocněním jako protinádorové vakcíny. V naší studii jsme jako antigen použili zabitě nádorové buňky. Ty jsou vhodným zdrojem nádorových antigenů z několika důvodů. Při použití této strategie nemusíme znát předem specifické nádorové antigeny. Použití celých nádorových buněk poskytuje široké spektrum nádorových specifických antigenů, specifických pro MHC I. a II. třídy, včetně nádorových antigenů specifických pro jednotlivé pacienty.

Předchozí studie ukazují, že DC, které prezentují nádorové antigeny z pohlcených mrtvých nádorových buněk mohou indukovat nádorově specifickou imunitní odpověď in vitro i in vivo.

V závěrečné fázi by proběhla vlastní studie, aplikace dendritických buněk a sledování ovlivnění růstu tumoru na experimentálním modelu. Prezentace nádorových antigenů, která by vedla ke vzniku imunitní reakce, by mohla zlepšit prognózu nádorových onemocnění.

3. Materiál a metodika

3.1 Indukce tumoru Diethylnitrosaminem a Phenobarbitalem

V první fázi experimentu jsme se pokusili indukovat tumor jater pomocí kancerogenních látek. Použili jsme 15 potkan (Wistar) vážících kolem 200g rozdělených do dvou skupin. V první skupině po dobu 10 týdnů jsme tumor indukovali. V druhé skupině po dobu 5 týdnů jsme tumor neindukovali, s tímto týdnem jsme pokračovali na výrobu vakcíny. Potkani, byli umístěni v klecích maximálně po čtyřech zvířatech, ve standardizovaných laboratorních podmínkách. Byly dodrženy stávající předpisy a směrnice pro chov a experimentální používání zvířat. Experiment byl prováděn se souhlasem etické komise. Tumor jsme indukovali pomocí Diethylnitrosaminu (200mg/kg/d), v kombinaci s podáváním Phenobarbitalu (500ppm/rat). Diethylnitrosamin byl aplikován jednorázovou injekcí intraperitoneálně, phenobarbital byl zvířatům podáván jako přísada ve stravě. Indukce trvala 5 měsíců.

3.2 Indukce tumoru pomocí sarkomové linie

Při této indukci jsme použili sarkomové linie imortalizovaných fibroblastů (K2). Tento model nádorového onemocnění jsme používali ve spolupráci s Ústavem molekulární genetiky AV ČR. Označení kultury A 297, NbIII 2A (5000000 j/ml).

Fibrosarkomová linie K2 byla kultivována v médiu MEM suplementovaném 10% fetálním bovinním sérem, 2 mM L -glutaminu, 100 U/ml penicilinu a 100 µg/ml streptomycinu (Cambrex). Pro buněné kultury bylo použito médium RPMI+10%FBS. Aplikovali jsme 0.2 ml tkáňové kultury, subkutánně. Na tento experiment jsme použili skupinu 20 potkanů Lewis vážících kolem 250g. Nádory se chovaly velice agresivně, rychle se zvětšovaly, prorostaly do okolních tkání a metastazovaly do jater a plic.

3.3 Příprava dendritických buněk

Dendritické buňky byly připraveny z monocytů. Mononukleární buňky periferní krve byly izolovány na ficolovém gradientu (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden), monocyty izolovány pomocí 2h adherence na povrch kultivační lahvičky a kultivovány 5 dnů s 250 pg/ml kryšitického IL -4 a 10 ng/ml GM-CSF [17]. Nezralé DC byly kultivovány přes noc se zabitými K2 buňkami v kompletním RPMI médiu v poměru 1:1. Maturace DC byla indukována přidáním 25 µg/ml Poly I:C (Sigma) po dobu 6hod.

3.4 Kvantifikace produkce IL -12

Supernatanty z kultur DC byly sebrány 24h po přidání Poly I:C a uchovány v -20°C do okamžiku analýzy. Concentrace bioaktivní formy IL -12 p70 byly stanoveny pomocí ELISA kit (Invitrogen, Carlsbad, CA).

3.5 Pr toková cytometrie

Pro analýzu fenotypu DC bylo 2×10^5 bun k inkubováno s protilátkami proti CD80/B7.1 and CD86 v PBS po dobu 30 min ve 4°C. Následn byla vazba primárních protilátek detekována pomocí sekundárních protilátek konjugovaných s FITC (Immunotech, Marseille, France). Zna ení bylo detekováno na p ístroji FACSCalibur a data analyzována softwarem FlowJo (Treestar, Oregon, USA).

V p ípad intracelulárního zna ení byly bu ky restimulovány in vitro pomocí zabitych nádorových bun k v p ítomnosti 5 $\mu\text{g/ml}$ brefeldinu A (Sigma-Aldrich) v 37°C po dobu 6h. Bu ky byly následn ozna eny protilátkou proti CD8, fixovány, permeabilizovány pomocí roztoku cytofix -cytoperm (BD Biosciences), a ozna eny protilátkou proti IFN- γ .

3.6 Indukce nádorov specifických T lymfocyt in vitro

K2 bu ky byly zabity pomocí UV ozá ení (312 nm, 10 min). Ne zralé DC byly po dobu 6h kokultivovány se zabitymi nádorovými bu kami v pom ru 1:1 a pohlcení nádorových bun k bylo ov eno konfokální mikroskopií. DC pulzované nádorovými bu kami byly následn aktivovány 6h pomocí 25 $\mu\text{g/ml}$ Poly I:C for 6h a použity pro stimulaci T lymfocyt izolovaných ze sleziny. DC pulzované K2 bu kami byly p ídány v pom ru 1:10. T etí den byl do bun né kultury p ídán IL-2 (25 IU/ml). Sedmý den byly T lymfocyty restimulovány DC pulzovanými nádorovými bu kami a následn byla stanovena fr ekvence nádorov specifických T lymfocyt , pomocí intracelulárního zna ení pro IFN γ [20].

3.7 Podání vakcíny založené na DC in vivo

V modelu terapeutické vakcinace jsme injikovali 2×10^6 živých K2 nádorových buněk subkutánně do pravého boku. Po těchto týdnech, když byly rostoucí nádory palpabilně zjistitelné, byly krysy imunizovány 5×10^5 zralých DC, které byly pulzovány zabitými K2 buňkami. DC byly injikovány s.c. do okolí nádoru. Růst nádoru byl monitorován kaliperem každý druhý den. V každé experimentální skupině bylo zahrnuto pět zvířat.

3.8 Statistická analýza

Pro protektivní vakcinaci byly sestrojeny křivky přežití podle Kaplan a Meiera. Pro porovnání experimentálních skupin byl použit Man-Whitney test.

4. Výsledky

Indukce tumoru pomocí kancerogenních látek Diethylnitrosaminu a Phenobarbitalu byla málo úspěšná, protože se nám podařilo vyvolat kancerogenní efekt pouze u malé části zvířat. Dle odborných prací se pomocí diaminobenzidinu nebo nitrosaminu podaří průměrně u 80% krmených zvířat tumor indukovat [21-30], v našem případě jsme tak úspěšní nebyli a kancerogenní efekt jsme zaznamenali pouze ve 20%. Používali jsme Diethylnitrosamin (200mikrogram /kg a 1 den), v kombinaci s podáváním Phenobarbitalu (500ppm/rat).

První studii jsme provedli na 10 potkanech (Wistar). Indukce trvala 5 měsíců. Histologicky byly přítomny ve 20% kancerogenní změny v játrech, v 10% atypie bez nádorových buněk, v 10% steatosa, v 10% chronické fibrotické změny. Bohužel jsme dosáhli pouze malé úspěšnosti v indukci tumoru. Nádory vzniklé přímo na zvířeti působením kancerogenu, by se více podobaly nádorům u našich pacientů, než nádory indukované již připravenou nádorovou linií. Tento model by měl v tšší péči v hodnocení výsledků také by pomocí dendritických buněk. Bohužel doba indukce byla dlouhá a tumor se nám nepodařilo u většiny zvířat indukovat. Proto jsme se rozhodli použít k indukci tumoru sarkomovou linii fibroblast (K2). Systémové a intrahepatální podání suspenze nádorových buněk vedlo k rychlému růstu nádoru, tvorbě metastáz a následně ke smrti během 1 měsíce. Plicní metastatická ložiska a povodní nádor v játrech u jednoho experimentálního zvířete jsou znázorněny na obrázku (Obr. 3).



Obr.3a. Pitevnický nálezn po aplikaci nádorových bun k intrahepatáln . Patrně je p vodní ložisko v játrech a plicní metastázy.



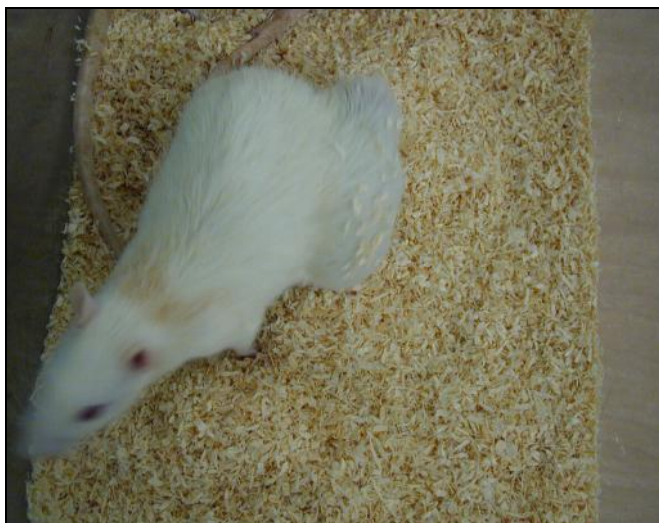
Obr.3b. Plicní metastáza po aplikaci nádorových bun k intrahepatáln .

Pro experimenty s aplikací dendritických buněk jsme zvolili subkutánní podání, při kterém byl růst nádoru pomalejší, nedocházelo k rychlé tvorbě metastáz a velikost nádoru bylo možno objektivně měřit (Obr. 4).

Histologicky se jednalo o vysoce maligní sarkom, morfologicky blíže neurčený. Nádor byl znatelný, tvořený oválnými až větovitými buňkami, místy strukturalizovanými v proudech, ložiskovitě s náznaky epiteloidní koheze.



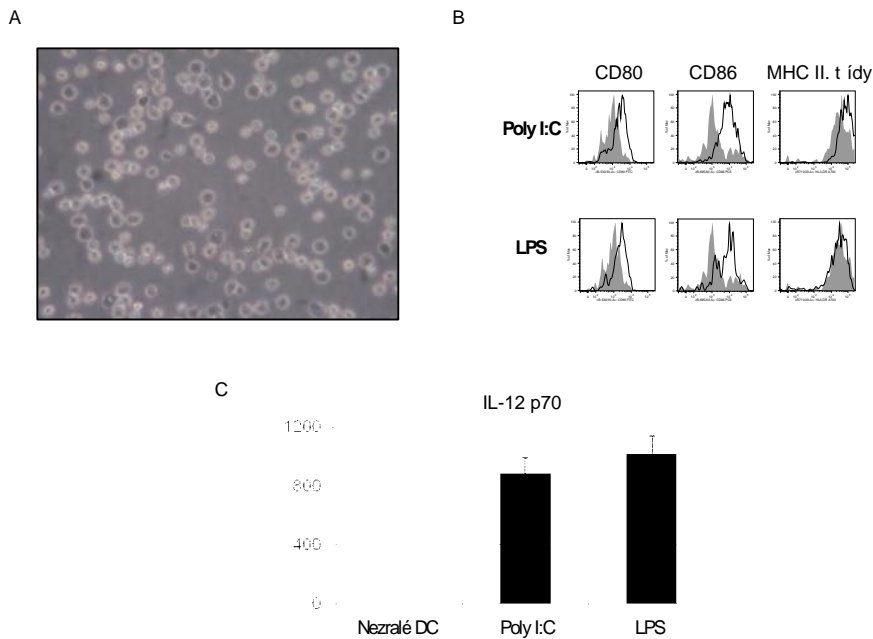
Obr.4a. Lokalizovaný růst nádoru po subkutánním podání nádorových buněk.



Obr.4b. Lokalizovaný r st nádoru po subkutánním podání nádorových bun k.

4.1 Příprava zralých DC, které fagocytovaly zabité buňky fibrosarkomové linie

Nejdříve jsme z monocytů periferní krve připravili nezralé DC. Během pětidenné kultivace monocytů v přítomnosti krysího IL-4 a GM-CSF došlo k diferenciaci buněk s typickou morfologií nezralých DC (Obrázek 5A). Následně jsme testovali schopnost nezralých DC projít aktivací po stimulaci bakteriálním LPS nebo syntetickým analogem virové RNA, Poly (I:C). Po 24 h stimulace nezralých DC těmito látkami jsme detekovali výrazné zvýšení exprese kostimulačních molekul (CD80, CD86) a molekul spojených s prezentací antigenů, například MHC molekul II. třídy (Obrázek 5B). DC stimulované Poly (I:C) a LPS také produkovaly vysoké množství aktivní formy Th1 polarizačního cytokinu IL-12 p70 (Obrázek 5C).



Obr. 5. Charakteristiky dendritických bun k použitých pro protinádorovou vakcinaci. Nezralé DC byly připraveny v RPMI+10% FBS medium a aktivovány pomocí Poly I:C 24h.

A. Morfologie nezralých DC.

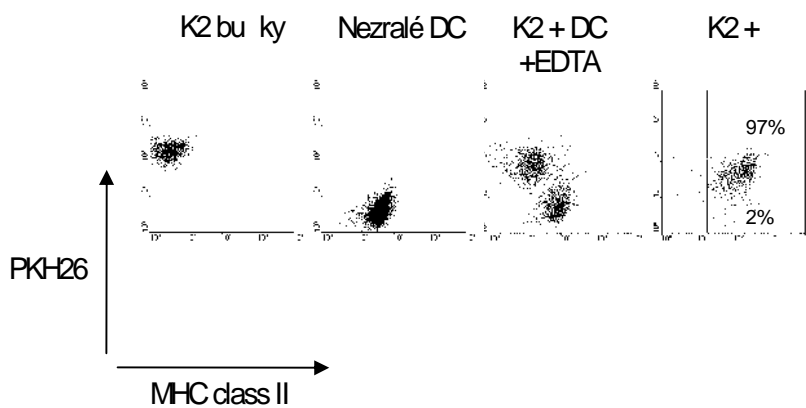
B. Fenotyp nezralých DC (šediv) a DC aktivovaných 24h pomocí Poly I:C nebo LPS (čern).

C. Produkce cytokin aktivovanými DC po stimulaci Poly I:C a LPS.

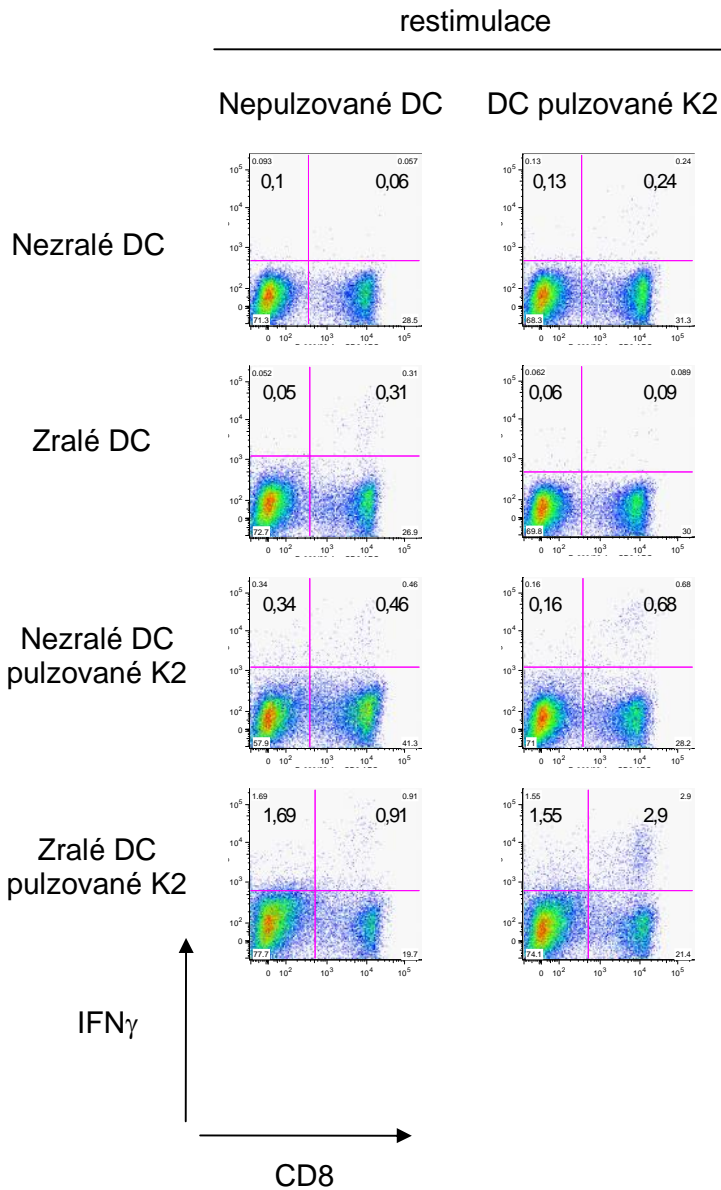
Aby mohly být použity v nádorové imunoterapii, musí zralé DC prezentovat nádorové antigeny. V naší studii jsme jako zdroj nádorových antigenů použili mrtvé nádorové buňky. Testovali jsme tedy, zda nezralé DC fagocytují zabitě nádorové buňky linie fibrosarkomu K2. Nezralé dendritické buňky rychle fagocytovaly K2 buňky zabitě UVA ozáření, což bylo dokumentováno průtokovou cytometrií (Obrázek 6A). Zralé DC, které fagocytovaly zabitě K2 buňky byly následně použity jako antigen prezentující buňky pro aktivaci nádorově specifických T lymfocytů v in vitro experimentech.

Po dvou týdnech stimulace autologních splenocytů dendritickými buňkami, které fagocytovaly K2 buňky jsme detekovali signifikantní zvýšení nádorově specifických T lymfocytů, především CD8 cytotoxických T lymfocytů. Nezralé DC nádorově specifické T lymfocyty nestimulovaly (Obrázek 6B).

DC pohlcují zabité buňky K2 fibrosarkomu a indukuje jí nádorově specifickou T buňkovou odpověď in vitro.



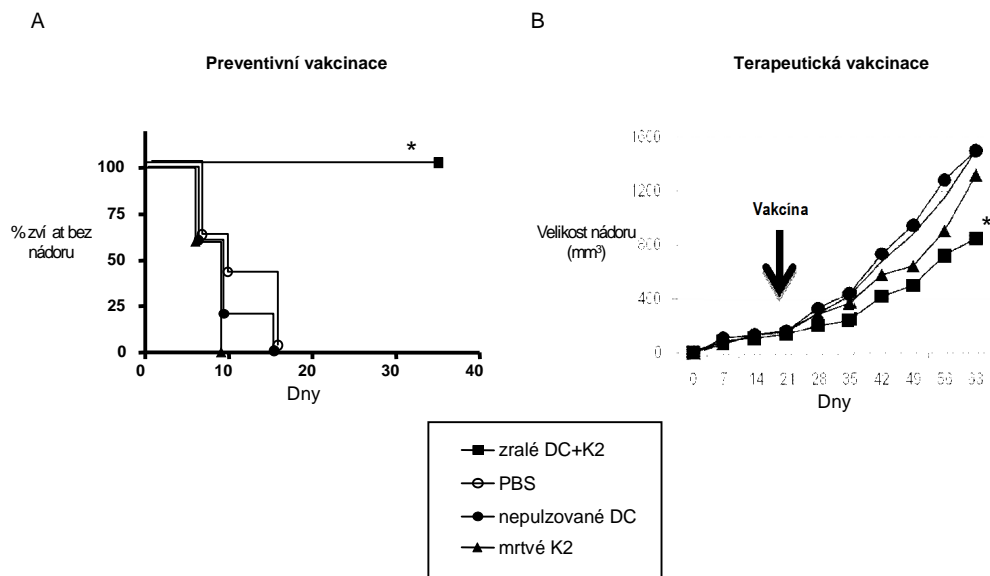
Obr. 6a. Fagocytoza zabitých K2 buněk nezralými DC. Internalizace nádorových buněk byla potvrzena protokovou cytometrií. Zabité nádorové buňky byly označeny PKH26 a kokultivovány s nezralými DC označenými protilátkou proti MHC II. Tedy. Pokus s EDTA znázorňuje negativní kontrolu (EDTA blokuje fagocytární mechanismy).



Obr. 6.b. In vitro expanze T lymfocyt specifických pro K2 fibrosarkomové buňky. Nezralé DC byly pulzovány K2 buňkami a aktivovány pomocí Poly I:C. Následně byly použity pro stimulaci autologních T lymfocytů. Po 7 dnech byla analyzována frekvence nádorově specifických T lymfocytů pomocí intracelulárního značení na IFN γ .

4.2 In vivo protinádorová imunoterapie v modelu terapeutické vakcinace

Poté, co jsme dokázali, že zralé DC, které prezentují nádorové antigeny mohou indukovat nádorově specifické T lymfocyty, jsme testovali účinnost vakcinace DC na experimentálním živém modelu. Náš model terapeutické vakcinace srovnáváme s již známým a osvědčeným modelem preventivní vakcinace, který probíhal v předchozích pokusech. V modelu preventivní vakcinace byly krysy nejprve očkované vakcínou založenou na podání zralých DC, které pohltily mrtvé nádorové buňky. Po dvou týdnech byly injikovány živé nádorové buňky. V případě vakcinace terapeutické byly krysy očkované DC vakcínou 3 týdny poté, co jim byly injikovány živé K2 buňky. Očkování tedy proběhlo až poté, co byly nádory ustanoveny. Jak znázorňuje obrázek 7A, krysy očkované preventivně byly zcela chráněny proti růstu živých nádorových buněk. Vakcinace DC, které neprezentovaly nádorové antigeny, nebo samotnými zabitými nádorovými buňkami neměla protektivní efekt. Na druhé straně, podání DC vakcíny v modelu terapeutického očkování k regresi nádoru nevedla. Podání DC vakcíny v terapeutických podmínkách přechodně zpomalilo kinetiku růstu nádoru, ale efekt byl pouze přechodný. Nádory poté začaly opět progresivně růst a zvířata nakonec podlehla (obr. 7B).



Obr. 7. Efekt protinádorové vakcinace zralými DC pulzovanými bu kami K2 fibrosarkomu na vznik a růst nádoru.

A. V modelu preventivní vakcinace bylo injikováno 5×10^5 zralých DC s.c., které byly pulzovány zabitými nádorovými bu kami. Po sedmi dnech byly subkutánně injikovány živé nádorové bu ky. Přítomnost nádoru byla kontrolována každý druhý den a byly sestrojeny křivky přežití podle Kaplan-Meiera.

B. V modelu terapeutické vakcinace jsme injikovali 2×10^6 živých K2 nádorových buněk subkutánně do pravého boku. Po těchto týdnech, když byly rostoucí nádory palpací zjistitelné, byly krysy imunizovány 5×10^5 zralých DC, které byly pulzovány zabitými K2 bu kami. DC byly injikovány do okolí nádoru. V každé experimentální skupině bylo zahrnuto pět zvířat. Růst nádoru byl měřen kaliperem každý druhý den.

5. Diskuze

Jednou ze základních funkcí imunitního systému je chránit organismus před změnami mutovanými buňkami. V klinické praxi jsme se setkali se spontánní resorpcí nekompletně odstraněného lipoblastomu, nebo v evoluci liposarkomu v lipoblastom nebo ve vyzrálý lipom [31,32]. V těchto případech je vliv imunitního systému zřejmý. Imunitní systém hraje zásadní roli v kontrole rozvoje nádoru, což potvrzují výsledky studií s imunodeficientními myši. V experimentu také probíhala úspěšných pokusů na zvířatech, kdy se pomocí indukované imunitní reakce podařilo ovlivnit růst tumoru, ale do klinické praxe se tyto úspěšné postupy v rámci protinádorové imunoterapie ve většině případů nepodařilo [33-38].

Zpočátku protinádorové imunoterapie se používali pacientovy buňky, které se kultivovaly in vitro za přítomnosti vysokých dávek interleukinu 2, který zvyšuje cytotoxicitu. Takto připravené buňky vykazovaly in vitro značnou schopnost zabít nádorové linie. Tyto buňky (zabíječi) byly podávány u některých typů nádorů například zhoubného nádoru ledviny, maligního melanomu. Velké klinické studie rozdělily mezi pacienty léčenými infuzemi zabíječů a ostatními pacienty neprokázaly. Další fází použití imunoterapie se zaměřilo na možnost aktivovat a pomnožit lymfocyty, které pronikly přímo do nádoru a dalo se předpokládat, že mezi nimi budou specifické protinádorové lymfocyty. Výsledky nebyly přesvědčivé, náklady vysoké a tak se koncem 80 let od tohoto způsobu také postupně ustoupilo.

Nad jiné výsledky přinesli studie s dendritickými buňkami. Po objevu, že lze získat z monocytů velké množství dendritických buněk, které se in vitro několik dní kultivovaly a dalo se s nimi dále pracovat byl zlomovým okamžikem. Dendritické buňky byly in vitro stimulovány nádorovými buňkami které pohltily, poté byly vpraveny zpět do organismu a u myši vyvolaly ústup nádoru. Prohloubněji bylo studováno, kde byl dokázán v experimentu na zvířatech ústup nádoru. V některých studiích preventivní vakcinace, kdy nejdříve jsou vpraveny do organismu dendritické buňky které prezentují nádorový antigen, a později jsou zvířata proti vzniku nádoru imunní [39-41]. Brzy po objevu byly zahájeny klinické studie. Nejprve u pacientů s melanomem, karcinomem ledviny, prostaty a některými lymfomy, ale v té době v pokročilém stadiu onemocnění.

Jedním z prvních, kdo provedl klinickou studii s dendritickými buňkami u nádoru, byl Hsu a kol.. Léčili pacienti s maligním B lymfomem po neúspěšné klasické terapii. Podával vakcíny dendritických buněk s antigenem, kterým byl imunoglobulin z monoklonálních B lymfocytů. Tolerance léčby byla dobrá, byla zaznamenána regrese nádoru a byly prokázány antiidiotypové T lymfocyty, svědčící o vyvolané imunitní reakci [42]. Klinickou studii s B lymfomou udělal také Fong a kol.. Vakcína byla podána celkem u 4 pacientů, z nichž 2 měli kompletní remisi více než 3 roky [43]. Několik studií proběhlo s melanomem. Tento nádor patří k lidským karcinomům s nejvyšší úmrtností. Neodpovídá na konvenční terapii, ale tyto nádory vyvolávají imunitní reakci a mohl by tudíž být vhodný pro imunoterapii. Zpočátku byly dendritické buňky stimulovány surovým extraktem z melaninů. Tento extrakt obsahoval nedefinovanou směs antigenů. Později díky tomu, že se izolovaly typické nádorové antigeny melanomu (Mage-1, Mage-3, Melan A, antigen gp100) se dendritické buňky aktivovaly in vitro s jedním z melanomových peptidů. Nestle a kol. celkem podali dendritické buňky kultivované s melanomem celkem 16 pacientům [44].

Klinický efekt regrese nádoru byla pozorována u 5 pacientů, z toho u dvou pokračoval více než rok. Studii s velkým počtem 31 pacientů provedl Rosenberg a spol. z Národního ústavu rakoviny v americké Bethesda. Antigenem byl peptid gp 100, jehož imunogenita se zvýšila molekulovou manipulací a imunitní odpověď zvyšoval přidáním IL 2. U 16% pacientů byl zaznamenán klinický efekt [45].

V posledních několika letech se imunoterapie vakcínami z dendritických buněk začala používat u pokročilé rakoviny prostaty. Bylo prokázáno, že léčba prodlužuje přežití a zlepšuje kvalitu života u pacientů s metastatickým onemocněním. Buňky karcinomu prostaty produkují bílkovinu označovanou jako prostatický specifický antigen PSA, tento antigen je základem vakcíny. Po obdržení obojí látky, byly u 42% pacientů zaznamenány anti-PSA protilátky. Tímto způsobem byla detekována u 71% pacientů. 57 procent pacientů přežilo déle, než se předpokládalo. Nejdelší přežití bylo 71 měsíců - téměř šest let [46]. Renální karcinom je další možnou volbou pro léčbu pomocí imunoterapie, protože efekt standardní chemoterapie je malý. V Bostonu probíhala studie vakcinací pomocí dendritických buněk u 23 pacientů (13 pacientů s renálním karcinomem a 10 pacientů s tumoru prsu). U 5 pacientů s renálním karcinomem byla zaznamenána stabilizace onemocnění od 3-9 měsíců a u 2 pacientek s tumoru prsu dokonce regrese onemocnění [47]. Ačkoli podávání protinádorových vakcín ve většině případů vedlo k indukci detekovatelné protinádorové imunitní odpovědi, efekt na klinický průběh onemocnění byl omezený. [48]

Účinnost protinádorové imunity je bohužel v praxi zatím menší než se předpokládalo. Imunitní systém má obrovskou účinnost v ochraně proti infekci bakteriální nebo virové, ale proti nádorům tento efekt není dostatečně účinný. Proč tedy v klinické praxi není zatím imunoterapie tak účinná jak bychom si představovali?

Nádorové buňky vznikají z vlastních buněk organismu a nejsou tedy imunitním systémem vnímány jako cizí. Imunitní reakce vyvolávají dobře nádory, které jsou v experimentu vyvolány na zvířatech pomocí chemických látek nebo z exogenních nádorových buněk. Z lidským nádor je nejvíce imunogenní maligní melanom.

Předpokládá se, že imunitní systém má zásadní vliv a účinnost v době, kdy dochází k maligní transformaci buněk v nádorové, a pokud imunitní systém tyto buňky rozpozná, tak je včas zničí. Tento tzv. imunitní dohled je účinný, protože se jedná o stadium s minimálním počtem nádorových buněk, na rozdíl od pokročilého procesu, kdy nádorových buněk je obrovské množství. Například nádor pouze o velikosti jednoho milimetru má už kolem milionu buněk, nádor o velikosti 1 cm obsahuje kolem 1 miliardy nádorových buněk, které již unikly imunitnímu dohledu. Na zničení takového množství nádorových buněk by bylo zapotřebí obrovské množství imunitních buněk. Zajistit takovou koncentraci v nádoru, je složité jak pro přirozenou imunitu, tak i pro léčebné metody. Jedinou naději je zmenšení nádorové hmoty chirurgicky nebo pomocí chemoterapie a radioterapie. Kromě vzniku obrovského množství nádorových buněk je další příčinou neúčinnosti imunitního systému proti nádorům to, že nádory mají různé mechanismy, jak uniknout imunitnímu systému. Především to je známa variabilita nádorových buněk, vznik mutantních forem, které stále dále unikají imunitnímu systému. V průběhu imunitního tlaku dochází ke klonální selekci. Nádorové buňky mají mechanismy, jak vytvořit toleranci, aby imunitní systém nereagoval, a nádorové buňky proto byly „neviditelné“. Toho lze docílit například nízkou hustotou exprese nádorových antigenů. Další možností, jak uniknout imunitnímu dohledu je produkce faktorů inaktivujících T lymfocyty nebo jiné cytokiny s inhibičním účinkem například TGF- β , nebo IL 10.

Některé nádorové buňky exprimují na svém povrchu stejný protein Fas-ligand (FasL), jako se nachází na povrchu Tc lymfocytů. FasL se váže na apoptotický receptor Fas (CD 95), který je přítomný na povrchu nádorových buněk a způsobuje jejich apoptotickou smrt. Faktory produkované některými nádory přímo inhibují funkce dendritických buněk. Patří mezi ně oxid dusnatý, který indukuje apoptozu DC, IL 10, TGF- β – inhibující zrání DC. Další příčinou je, že nádorové buňky nefungují jako profesionální APC, protože na povrchu nemají kostimulační molekuly CD 80, CD86. Prekurzory Tc a Th, které antigen rozeznávají, jsou utlumeny. Imunitní systém považuje nádory za vlastní tkáň a chrání je před imunitním působením prostřednictvím tlumivých regulací T lymfocytů. Po odstranění těchto buněk se zvyšuje účinnost imunitního systému proti nádorům, ale je to spojeno s rizikem autoimunitního onemocnění. V některých případech působí proti nádorové protilátky dokonce na stimulačních receptorů nádoru a paradoxně urychlují růst tumoru [3]. Nádory mají tedy celou řadu způsobů, jak vyhnout imunitě a zdá se, že se jim to zatím daří a jsou předvedou o krok vpřed.

Oponenti proti nádorové vakcinaci tedy často tvrdí, že nadřadné výsledky ze zvířecích modelů se nepodařilo převést do klinické praxe. To je ovšem velmi nepřesné a zjednodušující tvrzení. Existuje zcela zásadní rozdíl mezi účinnými vakcínami u zvířecích modelů a klinickými studiemi, které byly provedeny u lidí. Úspěšné vakcíny byly u zvířecích modelů testovány v modelech preventivní vakcinace. Naproti tomu klinické studie testující účinnost protinádorové imunoterapie u pacientů s nádorovým onemocněním byly vždy testovány na pacientech, kteří trpěli pokročilým onemocněním, často ve stádiu metastáz, a kteří byli předem intenzivně chemoterapii. Neúčinnost protinádorové imunoterapie u těchto těžce imunosuprimovaných pacientů není vbec překvapivá [49,50].

V naší studii jsme testovali účinnost protinádorové vakcinace pomocí DC v modelu terapeutické vakcinace.

Použili jsme již dříve popsany protokol založený na přípravě zralých DC, které prezentují nádorové antigeny ze zabíjených nádorových buněk [51]. Podávali jsme zralé DC, které jediné dokáží aktivovat naivní T lymfocyty. Při terapeutické vakcinaci vedlo podání DC vakcíny pouze k přechodnému zpomalení progresu již rostoucího nádoru, ale ne k úplné eradikaci nádorové tkáně.

Souasný náhled na vztah mezi imunitním systémem a buňkou v procesu nádorové transformace byl formulován prof. R. Schreiberem v teorii protinádorového dohledu: "Cancer immunosurveillance and immunoediting hypothesis". Navrhuje rozlišovat tři stádia v průběhu progresu nádorového onemocnění, stádium eliminace, ekvilibria a úniku nádoru imunitnímu dohledu. [52,53]. Pro existenci tohoto modelu svědčí nyní řada experimentálních prací. [54]. Nejistota je buďka v počátcích procesu nádorové transformace rozpoznána imunitním systémem a eliminována. Nedojde-li k eliminaci, může nádorová buňka indukovat imunitní reakci, která sice nevede k úplné eliminaci nádorových buněk, ale brání jejich nekontrolovanému růstu. Proces může opět vyústit v eliminaci nádorových buněk, nebo v dlouhotrvající stav dynamické rovnováhy, který v klinice nejspíše odpovídá preneoplastickým stavům. V případě, že onemocnění progreduje do další fáze nádorové buňky pod selektivním tlakem imunitního systému vyvíjí mechanismy, které jim dovolí unikat imunitní reakci. Vznikající genetická nestabilita a plasticita nádorových buněk vede ke vzniku variant, které mají nižší imunogenicitu a disponují mechanismy, které nakonec vedou k úniku nádorové populace imunitní reakci. Nádorové buňky například produkují faktory, které účinně inhibují protinádorovou imunitní odpověď, jako například TGF- β a IL-10. Produkce těchto faktorů navíc vede k indukci supresivních populací T lymfocytů, především regulačních FoxP3+ regulačních T lymfocytů [55-57].

Z této modifikované teorie protinádorového dohledu vyplývá, že nejvyšší profit z protinádorové imunoterapie by měli mít pacienti ve fázi ekvilibria, zatímco pacienti s pokročilým nádorovým onemocněním (fáze úniku) by imunoterapií neměla hrát zásadní roli, protože nádorové buňky již unikly dohledu imunitního systému. Většina pacientů s nádorovým onemocněním je ale diagnostikována v pokročilých stádiích a je proto nutné hledat účinné strategie protinádorové imunoterapie i pro tuto kohortu. Cílem protinádorové imunoterapie u těchto pacientů nemusí být úplná eradikace nádorových buněk, ale pouze návrat ze stádia úniku zpět do stádia dynamické rovnováhy. To by umožnilo opětovnou kontrolu růstu nádorových buněk specifickou imunitní reakcí. Aby tedy měla protinádorová imunoterapie naději na úspěch, mělo by před jejím zahájením dojít k redukci nádorové hmoty pomocí jiných terapeutických modalit (chirurgií, chemoterapií nebo radioterapií) a k neutralizaci nádorem produkováných imunosupresivních faktorů. Pouhá resekce nádorové hmoty vedla k eliminaci nádorem indukované imunosuprese na modelu metastazujícího karcinomu prsu. Navíc bylo nedávno popsáno, že některá cytostatika indukují imunogenní buněčnou smrt, která je charakterizována translokací proteinu teplotního šoku z endoplazmatického retikula na povrch buněk [58-60]. Nádorové buňky zabité tímto lékem aktivují dendritické buňky a indukují protinádorovou imunitní reakci. Pilotní studie také prokázaly, že aktivní protinádorová imunoterapie může být v synergii s následnou chemoterapií. Dvě klinické studie, u pacientů s malobuněčným karcinomem plic a pacientů s glioblastoma multiforme, prokázaly vyšší účinnost chemoterapie po předchozí aktivní imunoterapii pomocí DC vakcinace [61-63].

6. Použití imunoterapie v klinické praxi

U detekovatelného nádoru, který unikl mechanismům imunitní obrany, jsou možnosti imunoterapie omezené a léčba spoívá ve zpomalení růstu nádoru, úplné vyléení je vyjímé.

V souasném období se v rámci imunoterapie v praxi úspěšně aplikují protilátky proti konkrétním antigenům. Tato pasivní imunoterapie spoívá v přípravě monoklonálních protilátek proti nádorovému antigenu. Protilátky se naváží na receptory nádorových buněk a přilákají buňky imunitního systému. Protilátky se používají u nádoru tlustého stěva, preparát se nazývá Edrekolomab, u nádoru lymfatické tkáně se používá preparát Rituximab, u nádoru prsu Trastuzumab.

Použití dendritických buněk ve formě vakcín, je zatím ve fázi klinických studií. V posledních letech znalosti o funkci imunitního systému a dendritických buňkách rychle rostou, přesto mnoho otázek ještě zůstává nejasných. Pochopení imunobiologie DC buněk umožní terapeutickou manipulaci tímto systémem a zvýšení významu imunitní reakce v boji proti nádorům.

Vzhledem k možnosti vyvinutí cílené vakcíny proti tumorosnímu antigenu, se jeví možnost podání vakcíny u rizikových pacientů, u kterých vyvinutí nádoru teprve předpokládáme. Tímto směrem se asi v nejbližší době imunologická léčba nádoru bude vyvíjet, tzv. *primární prevence*.

Imunitní systém má schopnost pamatovat si antigen po dekády, někdy i celý život. Výzkum těchto možností imunitního systému a možnost specifické imunitní odpovědi vedlo k obrovskému úspěchu vakcinačního programu proti infekčním nemocem a reprezentuje nejpozornější triumf moderní medicíny a imunologie.

Průměrná délka života se ještě na počátku 20. století pohybovala kolem 30 let. Imunizace je již dávno uznávána jako jednoduchá, bezpečná a efektivní cesta ochrany dětí i dospělých proti závažným infekčním nemocím. Proč by se tedy stejného úspěchu nemohlo docílit i při vakcinaci proti nádorovým onemocněním? Na experimentálních modelech byl tento způsob již mnohokrát ověřen.

V souvislosti s úspěšnou očkováním proti virům způsobujícím nádorové onemocnění. Výsledky v očkování proti viru hepatitidy B, která je spojená s výskytem karcinomu jater ukazují snížení počtu nových onemocnění [64-66]. Velmi úspěšné je očkování proti karcinomu čípku u žen. Vakcinace proti HPV ukazuje úspěšnost 100% [67,68]. Je velká naděje, že stejný úspěch jako při inakčních vakcinacích proti infekcím, může přinést vakcinace proti nádorům. Poznávání imunitního systému společně s rozvojem laboratorních technik a identifikace nádorových antigenů dnes dovolují manipulaci s komponenty imunitního systému *in vitro*. Je tedy nutné najít vhodné pacienty, u kterých by se nádor vyvinul a podat jim preventivní nádorovou vakcínu. Do této skupiny zapadají pacienti především s hereditárními nádorovými syndromy, jako například pacienti v jejichž rodinách je kolorektální karcinom, nebo ženy s BRCA mutacemi.

Sekundární prevence by mohla být použita u pacientů s preneoplastickými lézemi. Pacienti, kteří mají podle teorie editace nádoru ustanovenou rovnováhu mezi aktivní imunitní odpovědí a vymezenou populací nádorových buněk. U těchto pacientů by vakcinace mohla bránit v progresi v maligní tumor. To jsou pacienti například s polypy kolon, orální leukoplakii, cervikální intraepitální neoplasií nebo monoklonální gammopathií. Nejvíce prostudovanou preneoplastií je monoklonální gammopathie nejasného významu (monoclonal gammopathy of unknown significance, MGUS). Studium MGUS je technicky jednodušší než studium solidních nádorů, protože nádorové buňky i buňky imunitního systému mohou být poměrně jednoduše izolovány z kostní dřeně.

Pacienti s MGUS mají v kostní dřevě klonální expanzi plazmatických buněk, které jsou podle všech parametrů (cytogenetika, fenotyp) téměř totožné s nádorovými buňkami u mnohočetného myelomu (MM). Zatímco MM je ovšem onemocnění s velmi špatnou prognózou a bez léčby zcela infaustní, pacienti s MGUS zpravidla zůstávají klinicky stabilní po mnoho let, bez rozvoje MM. Bylo zjištěno, že pacienti s MGUS mají v kostní dřevě i v periferní krvi lymfocyty, které jsou schopny rozpoznávat autologní nádorové buňky a reagovat produkcí IFN- γ . U MM takové buňky detekovat nelze [69-71].

Terciální prevence by byla vhodná pro pacienty s nádory, které byly odstraněny dnes klasickými metodami, chirurgickou léčbou, chemoterapií, nebo radioterapií. V organismu však ještě přetrvávají nádorové buňky, a už v místě primárního nádoru, v hraniční tkáni, nebo, jsou přítomny vzdálené mikroskopické metastázy. Vakcinace v těchto případech by byla ve formě adjuvantní terapie. Tato tzv. minimální reziduální nemoc je v současné době díky vývoji v laboratorních technikách možná detekcí specifických molekulárních markerů (chromozomální translokace, T cell receptory, imunoglobuliny u leukemií).

Účinnost dendritických buněk je v současné době ověřována řadou klinických studií. První studie na experimentálních modelech byly velmi povzbudivé a zadalily tento typ imunoterapie mezi nejperspektivnější postupy v současné době. Výhodou použití vakcín připravených z dendritických buněk je možné použití pro různé typy nádorů, nebo jde o stimulaci vlastního imunitního systému v místě nádorových buněk.

Imunologie je jedním z nejrychleji se rozvíjejících oborů. Jestli bylo 19. století nazýváno stoletím páry, 20. století stoletím antibiotik, tak 21. století se jednou možná bude nazývat stoletím imunoterapeutik. Uvidíme, jaké nové poznatky nejbližší roky přinesou a kam se bude dále imunologie ubírat.

Na klinice imunologie ve FN Motol, s jejíž pomocí jsme provedli naši studii, se dlouhodobě úspěšně zabývají výzkumem v oblasti imunoterapie pomocí dendritických buněk. Nyní se podařilo vybudovat technické zázemí nezbytné dle současných legislativních požadavků pro výrobu vakcín (tzv. specializované prostory). Tuto laboratorii certifikoval Státní ústav pro kontrolu léčiv k výrobě léčivých přípravků s mezinárodní platností. Nyní probíhá klinické zkoušení protinádorové vakcíny založené na dendritických buňkách u pacientek s karcinomem ovaria a u pacientů s karcinomem prostaty.

7. Závěr

V naší práci se nám podařilo indukovat tumor na experimentálním modelu pomocí sarkomové linie imortalizovaných fibroblastů (K2). Indukce byla úspěšná ve 100 %. Indukce tumoru pomocí kancerogenních látek Diethylnitrosaminu a Phenobarbitalu se ukázala pro náš experiment nevhodná pro délku indukce a především proto, že se nám tumor podařilo indukovat pouze u malé části zvířat.

V in vitro experimentech se nám podařilo prokázat, že zralé DC, fagocytují zabitá K2 buňky a následně aktivují specifické T lymfocyty.

Poté, co jsme dokázali, že zralé DC, které prezentují nádorové antigeny mohou indukovat nádorové specifické T lymfocyty, jsme testovali účinnost vakcinace DC na experimentálním živém modelu.

Při našem pokusu na experimentálním modelu se nám podařilo po aplikaci dendritických buněk prokázat zpomalení růstu tumoru. Nepodařilo se nám tumor zcela eliminovat a po určitém období, kdy došlo ke zpomalení růstu nádoru, nastala opět progresse [72,73].

Přes známost rozdílů v imunitě myši a lidské experimentální údaje ukazují, že antitumorozní sekundární vakcinace může částečně bránit v progresi tumoru. Protinádorová imunoterapie by měla být zahájena u pacientů, u kterých byla nálož nádorových buněk zredukována předchozí terapií. Racionální kombinace protinádorové imunoterapie, chirurgie a chemoterapie by mohla zlepšit prognózu pacientů s nádorovým onemocněním.

V současné době nejsou možnosti imunoterapie na takové úrovni, aby se nádor dal zcela vyléčit. Současná imunoterapie může dosáhnout pouze u části pacientů ústup nádorového onemocnění a to na pouze krátkou dobu. Není na místě nekritický optimismus, zvláště v informování pacientů o možnosti léčby. Přístí roky však nepochybně přinesou další objevy v patofyziologii dendritických buněk a v imunitní reakci proti nádorům.

Již dnes je zřejmé, že imunita hraje významnou roli a výzkum tímto směrem může dát v budoucnu pacientům šanci na vyléčení. Největším příslibem do budoucna se jeví primární vakcinace tedy preventivní, která může rozvoji onemocnění zcela zabránit. Imunologové, onkologové a chirurgové by měli spolupracovat na tvorbě terapeutických protokolů, ve kterých budou kombinovány jednotlivé terapeutické modalities a navrhnout optimální časové schéma takových protokolů. Zařazení moderních strategií protinádorové imunoterapie do terapeutických protokolů by mohlo znamenat další zlepšení prognózy onkologických pacientů.

8. Souhrn

V této studii prezentujeme model terapeutické protinádorové vakcinace pomocí dendritických buněk na modelu fibrosarkomu a srovnáváme ho s modelem preventivní vakcinace. Charakterizujeme připravenou vakcínu založenou na dendritických buňkách, které prezentují nádorové antigeny a ukazujeme, že tyto buňky jsou schopny indukovat protinádorovou imunitní odpověď. Vakcinace krysu, u kterých již existuje rostoucí nádorová tkáň, nevede k eradikaci nádorových buněk. Přestože v případě terapeutické vakcinace dojde k indukci protinádorové imunitní odpovědi a dočasnému zpomalení růstu nádoru, nádory posléze uniknou imunitnímu dohledu a nekontrolovaně rostou. Imunoterapie zahájená ve stádiu minimální reziduální nemoci poté, co došlo k redukci nádorové hmotnosti jinými terapeutickými modalitami, by mohla přispět ke zlepšení výsledků terapeutických protokolů používaných v onkologii. Tyto výsledky naznačují, že má-li být protinádorová imunoterapie úspěšná, je nutné, aby byla zahájena v pozdních stádiích nádorového onemocnění.

9. Abstract

In this study we present the model of therapeutic vaccination of sarcoma -bearing rats with dendritic cells that present tumor antigens from killed tumor cells. We present the characteristics of DCs-based vaccine and its capacity to induce antitumor immune response. Vaccination of rats with established tumors did not led to the eradication of tumors. Despite the induction of a vigorous immune response after administration of DCs -based vaccine and transient decrease in tumor progression, tumors eventually resumed their growth and animals vaccinated with DCs succumbed to cancer. Immunotherapy initiated at the stage of minimal residual disease, after reduction of tumor load by other modalities, will have much better chance to offer a clinical benefit to cancer patients than the immunotherapy at the stage of metastatic disease. These results argue for the timing of cancer immunotherapy to the stages of low tumor load.

10. Literatura

1. Cancer control in Europe: state of the art in 2008. *European Journal of Cancer*. 2008; 44 (10), 1341-1476.
2. Burnet FM. The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res* 1970; 13: 1-27.
3. Hořejší V, Bartáková J. *Základy imunologie*. Praha, Triton, 2005; str. 174.
4. Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ and Schreiber RD. IFN - gamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 2001; 410: 1107-11.
5. Smyth MJ, Crowe NY and Godfrey DI. NK cells and NKT cells collaborate in host protection from methylcholanthrene -induced fibrosarcoma. *Int Immunol* 2001; 13: 459-63.
6. Smyth MJ, Thia KY, Street SE, Cretney E, Trapani JA, Taniguchi M, Kawano T, Pelikan SB, Crowe NY and Godfrey DI. Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells. *J Exp Med* 2000; 191: 661-8.
7. Street SE, Cretney E and Smyth MJ. Perforin and interferongamma activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis. *Blood* 2001; 97: 192-7.
8. Kaplan DH, Shankaran V, Dighe AS, Stockert E, Aguet M, Old LJ and Schreiber RD. Demonstration of an interferon gammadependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 7556-61.

9. Berard F, Blanco P, Davoust J et al.: Cross-priming of naive CD8 T cells against melanoma antigens using dendritic cells loaded with killed allogeneic melanoma cells. *J Exp Med*. 2000 Dec 4; 192: 1535-44.
10. Banchereau J, Briere F, Caux C et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2000; 18, 767-811.
11. Dhodapkar MV, Steinman RM, Krasovsky J, Munz C & Bharwaj N. Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *J. Exp. Med.*, 2001; 193(2), 233-238.
12. Spisek R, Bougras G, Ebstein F et al.. Transient exposure of dendritic cells to maturation stimuli is sufficient to induce complete phenotypic maturation while preserving their capacity to respond to subsequent restimulation. *Cancer Immunol Immunother*. 2003; 52(7), 445-454.
13. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity . *Nature*. 1998; Mar 19, 392: 245-52.
14. Blattman JN, Greenberg PD. Cancer immunotherapy: a treatment for the masses. *Science*. 2004 Jul 9; 305: 200-5.
15. Steinman RM. Some scientific and organizational challenges in cancer immunology. *Ann N Y Acad Sci*. 2009 Sep;1174:1-5.
16. Steinman RM, Idoyaga J. Features of the dendritic cell lineage. *Immunol Rev*. 2010 Mar; 234 (1): 5-17.
17. Spisek R, Brazova J, Rozkova D, Zapletalova K, Sediva A, Bartunkova J: Maturation of dendritic cells by bacterial immunomodulators . *Vaccine*. 2004 Jul 29; 22: 2761-8.
18. Bocchia M, Bronte V, Colombo MP, De Vincentiis A, Di Nicola M, Forni G, Lanata L, Lemoli RM, Massaia M, Rondelli D, Zanon P, Tura S. Antitumor vaccination: where we stand. *Haematologica*. 2000 Nov; 85(11): 1172-206.
19. Palena C, Schlom J. Vaccines against human carcinomas: strategies to improve antitumor immune responses. *J Biomed Biotechnol*. 2010; 2010:380697.

20. Parmiani G, Castelli C, Dalerba P, Mortarini R, Rivoltini L, Marincola FM, Anichini A. Cancer immunotherapy with peptide-based vaccines: what have we achieved? Where are we going? *J Natl Cancer Inst.* 2002 Jun 5; 94 (11): 805-18.
21. Meenakshi V, Hideki W, Nobuyasu T, Yoshihisa Y, Shuzo O, Shinji Y, Shoji F. Inhibitory Effects of S-Methylcysteine and Cysteine on the Promoting Potential of Sodium Phenobarbital on Rat Liver Carcinogenesis. *Jpn. J. Cancer Res.* 2000; 91, 780 -785.
22. Barbisan LF, Miyamoto M, Scolastici C, Salvadori DMF, Ribeiro LR, Eira AF, Camargo J. Influence of aqueous extract of *Agaricus blazei* on rat liver toxicity induced by different doses of diet hynitrosamine. *Journal of Ethnopharmacology* 2002; 83, 25 -32.
23. Rocha N, Barbisan L, Oliveira M, Camargo J. Effects of Fasting and Intermittent Fasting on rat Hepatocarcinogenesis Induced by Diethylnitrosamine. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*, 2002; 22, 129-138.
24. Ismail MF, Ali DA, Fernando A, Abdraboh ME, Gaur RL, Ibrahim WM, Raj MH, Ouhtit A. Chemoprevention of rat liver toxicity and carcinogenesis by *Spirulina*. *Int J Biol Sci.* 2009 Jun 2; 5 (4): 377-87.
25. Chakraborty T, Chatterjee A, Rana A, Srivastawa S, Damodaran S, Chatterjee M. Cell proliferation and hepatocarcinogenesis in rat initiated by diethylnitrosamine and promoted by phenobarbital: potential roles of early DNA damage and liver metallothionein expression. *Life Sci.* 2007 Jul 19; 81 (6): 489-99.
26. Merkulova TI, Kropachev KY, Timofeeva OA, Vasiliev GV, Levashova ZB, Ilnitskaya SI, Kobzev VF, Pakharukova MY, Bryzgalov LO, Kaledin VI. Species-specific effects of the hepatocarcinogens 3'-methyl-4-dimethyl-aminoazobenzene and ortho-aminoazotoluene in mouse and rat liver. *Mol Carcinog.* 2005 Dec; 44 (4): 223-32.

27. Sreepriya M, Bali G. Chemopreventive effects of embelin and curcumin against N-nitrosodiethylamine / phenobarbital - induced hepato - carcinogenesis in Wistar rats. *Fitoterapia*. 2005 Sep; 76 (6): 549-55.
28. Kushida M, Sukata T, Uwagawa S, Ozaki K, Kinoshita A, Wanibuchi H, Morimura K, Okuno Y, Fukushima S. Low dose DDT inhibition of hepatocarcinogenesis initiated by diethylnitrosamine in male rats: possible mechanisms. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2005 Nov 1; 208 (3): 285-94.
29. Fukushima S, Wanibuchi H, Morimura K, Nakae D, Tsuda H, Imaida K, Shirai T, Tatematsu M, Tsukamoto T, Hirose M, Furukawa F. Lack of potential of low dose N-nitrosodimethylamine to induce preneoplastic lesions, glutathione S-transferase placental form-positive foci, in rat liver. *Cancer Lett*. 2005 May 10; 222 (1): 11-5.
30. Yang FC, Zheng SS, Jiang TA. A modified rat model for hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2004 Nov; 3 (4): 585-7.
31. Ku era A, Šnajdauf J, Vyhnánek M, Morávek J, Kodet R, Stejskalová E, Dvo áková M. Lipoblastoma in Children: an Analysis of 5 Cases. *Acta Chir Belg*, 2008; 108, 580-582.
32. Mognato G, Cecchetto G, Carlim M. Is surgical treatment of lipo - blastoma always necessary ? *J Pediatr Surg*, 2000; 35 : 1511-1513.
33. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD . Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape . *Nat Immunol*. 2002 Nov; 3: 991-8.
34. Spisek R. Immunoprevention of cancer: time to reconsider timing of vaccination against cancer. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2006 Dec; 6(12): 1689-91.
35. Tobiášová Z, Pospíšilová D, Miller AM, Minárik I, Sochorová K, Spísek R, Rob L, Bart nková 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.

36. Steinman RM, Banchereau J: Taking dendritic cells into medicine . *Nature*. 2007 Sep 27; 449: 419-26.
37. Rosenberg SA, Yang JC, Restifo NP. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med*. 2004 Sep; 10: 909-15.
38. Masse D, Ebstein F, Bougras G, Harb J, Meflah K, Gregoire M. Increased expression of inducible HSP70 in apoptotic cells is correlated with their efficacy for antitumor vaccine therapy . *Int J Cancer*. 2004 Sep 10; 111: 575-83.
39. Spisek R, Charalambous A, Mazumder A, Vesole DH, Jagannath S, Dhodapkar MV. Bortezomib enhances dendritic cell (DC)-mediated induction of immunity to human myeloma via exposure of cell surface heat shock protein 90 on dying tumor cells: therapeutic implications . *Blood*. 2007 Jun 1; 109: 4839-45.
40. Novakovi S, Ihan A, Jezersek B. Effectiveness of a simply designed tumor vaccine in prevention of malignant melanoma development. *Jpn J Cancer Res*. 1999 Oct; 90(10): 1130-8.
41. Spisek R, Chevallier P, Morineau N et al. Induction of leukemia-specific cytotoxic response by cross -presentation of late-apoptotic leukemic blasts by autologous dendritic cells of nonleukemic origin . *Cancer Res*. 2002 May 15; 62: 2861-8.
42. Hsu FJ, Benike C, Fagnoni F, Liles TM, Czerwinski D, Taidi B, Engleman EG, Levy R. Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nat Med*. 1996 Jan; 2(1): 52-8.
43. Fong L, Engleman EG. Dendritic cells in cancer immunotherapy. *Annu Rev Immunol*. 2000; 18: 245-73.
44. Nestle FO, Farkas A, Conrad C. Dendritic-cell-based therapeutic vaccination against cancer. *Curr Opin Immunol*. 2005 Apr; 17(2): 163-9.

45. Rosenberg SA, Yang JC, Sherry RM, Hwu P, Topalian SL, Schwartzentruber DJ, Restifo NP, Haworth LR, Seipp CA, Freezer LJ, Morton KE, Mavroukakis SA, White DE. Inability to immunize patients with metastatic melanoma using plasmid DNA encoding the gp100 melanoma-melanocyte antigen. *Hum Gene Ther.* 2003 May 20; 14(8): 709-14.
46. Lubaroff DM, Konety BR, Link BK, Ratliff TL, Madsen T, Williams R. Outcomes from a phase I trial of an adenovirus/PSA vaccine for prostate cancer. *J Urol, suppl.*, 2008; 179: 184.
47. Avigan D. Dendritic cell – Tumor Vision Vaccines for Renal Cell Carcinoma *Clinical Cancer Research*, 2004; Vol. 10, 6347–52.
48. Gilboa E: The promise of cancer vaccines. *Nat Rev Cancer.* 2004 May; 4: 401-11.
49. Spisek R. Immunoprevention of cancer: time to reconsider timing of vaccination against cancer. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2006 Dec; 6: 1689-91.
50. Spisek R, Dhodapkar MV. Immunoprevention of cancer. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2006 Jun; 20: 735-50.
51. Tobiasova Z, Pospisilova D, Miller AM et al. In vitro assessment of dendritic cells pulsed with apoptotic tumor cells as a vaccine for ovarian cancer patients. *Clin Immunol.* 2007 Jan; 122: 18-27.
52. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity.* 2004 Aug; 21: 137-48.
53. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol.* 2004; 22: 329-60.
54. Koebel CM, Vermi W, Swann JB et al. Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature.* 2007 Dec 6; 450: 903-7.

55. Aspod C, Pedroza-Gonzalez A, Gallegos M et al. Breast cancer instructs dendritic cells to prime interleukin 13-secreting CD4+ T cells that facilitate tumor development. *J Exp Med*. 2007 May 14; 204: 1037-47.
56. Ghiringhelli F, Puig PE, Roux S et al. Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF-beta-secreting cells inducing CD4+CD25+ regulatory T cell proliferation. *J Exp Med*. 2005 Oct 3; 202: 919-29.
57. Marincola FM, Jaffee EM, Hicklin DJ, Ferrone S. Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance. *Adv Immunol*. 2000; 74: 181-273.
58. Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F et al. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med*. 2007 Jan; 13: 54-61.
59. Spisek R, Dhodapkar MV. Towards a better way to die with chemotherapy: role of heat shock protein exposure on dying tumor cells. *Cell Cycle*. 2007 Aug 15; 6: 1962-5.
60. Zitvogel L, Apetoh L, Ghiringhelli F, Kroemer G. Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2008 Jan; 8: 59-73.
61. Antonia SJ, Mirza N, Fricke I et al. Combination of p53 cancer vaccine with chemotherapy in patients with extensive stage small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2006 Feb 1; 12: 878-87.
62. Heeler CJ, Das A, Liu G, Yu JS, Black KL. Clinical responsiveness of glioblastoma multiforme to chemotherapy after vaccination. *Clin Cancer Res*. 2004 Aug 15; 10: 5316-26.
63. Yu JS, Wheeler CJ, Zeltzer PM et al. Vaccination of malignant glioma patients with peptide-pulsed dendritic cells elicits systemic cytotoxicity and intracranial T-cell infiltration. *Cancer Res*. 2001 Feb 1; 61: 842-7.
64. Viviani S, Jack A, Hall AJ, Maine N, Mendy M, Montesano R and Whittle HC. Hepatitis B vaccination in infancy in The Gambia: protection against carriage at 9 years of age. *Vaccine* 1999; 17: 2946-50.

65. Plymoth A, Viviani S, Hainaut P. Control of hepatocellular carcinoma through hepatitis B vaccination in areas of high endemicity: perspectives for global liver cancer prevention. *Cancer Lett.* 2009 Dec 1;286(1):15-21.
66. Chang MH, You SL, Chen CJ, Liu CJ, Lee CM, Lin SM, Chu HC, Wu TC, Yang SS, Kuo HS, Chen DS. Decreased incidence of hepatocellular carcinoma in hepatitis B vaccinees: a 20-year follow-up study. *J Natl Cancer Inst.* 2009 Oct 7;101(19):1348-55.
67. Simoens C, Sabbe M, Van Damme P, Beutels P, Arbyn M. Introduction of human papillomavirus (HPV) vaccination in Belgium, 2007 -2008. *Euro Surveill.* 2009 Nov 19;14(46).
68. Harper DM, Franco EL, Wheeler C, Ferris DG, Jenkins D, Schuind A, Zahaf T, Innis B, Naud P, De Carvalho NS, Roteli - Martins CM, Teixeira J, Blatter MM, Korn AP, Quint W and Dubin G. Efficacy of a bivalent L1 virus-like particle vaccine in prevention of infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: a randomised controlled trial. *Lancet* 2004; 364: 1757-65.
69. Fučíková J, Kurešová A, Bartoňková J, Špištek R: Role imunitního systému v obraně proti nádorům a strategie protinádorové imunoterapie, *Alergie*, 2008; 2, str. 119.
70. Kyle RA, Rajkumar SV. Monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Hematol Oncol Clin North Am* 1999; 13: 1181 – 202.
71. Špištek R, Kukreja A, Chen LC, Matthews P, Mazumder A, Vesole D, Jagannath S, Zebroski HA, Simpson AJ, Ritter G, Durie B, Crowley J, Shaughnessy JD, Jr., Scanlan MJ, Gure AO, Barlogie B and Dhodapkar MV. Frequent and specific immunity to the embryonal stem cell-associated antigen SOX2 in patients with monoclonal gammopathy. *J Exp Med* 2007; 204: 831-40.

72. Kucera A, Pýcha K, Pajer P, Spísek R, Skába R. Dendritic cell-based immunotherapy induces transient clinical response in advanced rat fibrosarcoma - comparison with preventive anti-tumour vaccination. *Folia Biol (Praha)*. 2009; 55(4): 119-25.
73. Kucera A, Skába R, Spísek R, Pajer P, Cervinková M: Experimental tumor therapy using intratumoral injection of dendritic cells *Rozhl Chir*. 2009 Jul; 88(7): 368-72.

11. Seznam zkratk

AFP	- alfa fetoprotein
APC	- bu ky p edkládající antigen
BRCA	- název genu (breast cancer)
CEA	- karcinoembryonální antigen
CD	- diferencia ní antigen (cluster of differentiation)
DC	- dendritická bu ka
EDTA	- kyselinu ethylendiamintetraoctovou
FASL	- Fas ligand (CD95L), transmembránový protein
FITC	- fluorescein isothiocyanate
GM-CSF	- faktor stimujícího kolonie granulo cyt a makrofág (granulocyte macrophage colony stimulating factor)
IARC	- Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny
IFN	- interferon
IL	- interleukin
LPS	- lipopolysacharid
mDC	- myeloidní dendritické bu ky
MHC	- hlavní histokompatibilní komplex
MM	- mnoho etný myelom
MGUS	- monoklonání gammopathie nejasného významu (monoclonal gammopathy of unknown significance)
MRN	- minimální reziduální nemoc
NK bu ky	- p irození zabíje i (natural killers)
NKT bu ky	- typ T lymfocyt (natural killers)
pDC	- plasmocytoidní dendritické bu ky
Poly (I:C)	- polyinosinic-polycytidylic acid
PPM	- parts per milion

PRR	- receptory asociované s patogeny
PSA	- prostatický specifický antigen
RNA	- kyselina ribonukleová
RPMI	- název media podle Roswell Park Memorial Institute
TAA	- antigeny asociované s nádory
TGF	- transformující r stový faktor
TLR	- toll like receptor
TNF	- faktor nekrotizující nádory
Treg	- T regula ní lymfocyty
TSA	- antigeny specifické pro nádory
UV zá ení	- ultrafialové (z anglického ultraviolet)