

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Protinádorová imunita a význam autoprotilátek v eliminaci  
nádorových buněk

Tomáš Mikeš

Bakalářská práce

2020

University of Pardubice  
Faculty of Chemical Technology

Antitumor immunity and the importance of autoantibodies in the  
elimination of tumor cells

Tomáš Mikeš

Bachelor thesis

2020

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2019/2020

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Tomáš Mikeš**  
Osobní číslo: **C17191**  
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Zdravotní laborant**  
Téma práce: **Protinádorová imunita a význam autoprotilátek v eliminaci nádorových buněk**  
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

### Zásady pro vypracování

- 1) Nastudujte pomocí odborné literatury problematiku týkající se protinádorové imunity, zmapujte současný stav znalostí o fungování imunitního systému v boji proti nádorovým buňkám a zaměřte se na význam protilátek v procesu vyhledávání a eliminace nádorových buněk. Tyto informace stručně shrňte v úvodní kapitole teoretické části.
- 2) Detailněji popište vědecké, případně klinické studie, které zmiňují nebo ověřují význam protilátek a jejich podíl v rámci protinádorové imunity in vivo.
- 3) Uveďte a komentujte studie, kde byly protilátky s protinádorovou specifitou připravené in vitro použity pro terapeutické účely a to jako podpůrná adjuvantní léčba nádorů a zhodnoťte s jakým výsledkem.
- 4) Zaměřte se na popis a zhodnocení vědeckých výsledků dosažených v posledních 10 letech.
- 5) Vypracujte literární rešerši o těchto vlivech v členění do kapitol dle doporučené osnovy. Jako zdroj informací používejte odborné články z hodnotných odborných časopisů českých i zahraničních (anglický jazyk).
- 6) Informace přehledně zpracujte, použijte obrázky, schémata a grafy.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**  
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**  
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí bakalářské práce: **prof. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.**  
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **20. prosince 2019**

Termín odevzdání bakalářské práce: **3. července 2020**

L.S.

---

**prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.**  
děkan

---

**prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.**  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2020

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne .....

.....

Tomáš Mikeš

## **Poděkování:**

Tímto bych rád poděkoval paní prof. RNDr. Zuzaně Bílkové, Ph.D. za možnost pracovat pod jejím dohledem, za cenné rady a vstřícný přístup při vypracovávání mé bakalářské práce.

Dále bych rád poděkoval rodině a přátelům za jejich podporu a trpělivost při vypracovávání bakalářské práce, ale i během doby celého studia.

## Anotace:

Práce je věnována protilátkám a jejich využití při diagnostice a predikci nádorových onemocnění. Rozebrání konkrétních protilátek ve spojení s určitým typem nádorového onemocnění. Využití protilátek a složek imunitního systému při boji s nádorovými buňkami po imunizaci in vitro. Zahrnuty jsou i testy in vivo.

## Klíčová slova:

auto protilátky, nádorové buňky, dendritické buňky, imunizace, protinádorová terapie

## Annotation:

The work is devoted to antibodies and their use in the diagnosis and prediction of cancer. Analysis of specific antibodies in connection with a certain type of cancer. The use of antibodies and components of the immune system in the fight against cancer cells after immunization in vitro. But also, in vivo tests are included.

## Key words:

autoantibodies, tumor cells, dendritic cells, immunization, anticancer therapy

# Obsah

|   |    |
|---|----|
| Obsah.....  | 8  |
| Seznam obrázků a tabulek .....                            | 10 |
| Seznam zkratk .....                                       | 11 |
| 1 Úvod .....  | 14 |
| 2 Imunitní systém.....                                    | 15 |
| 2.1 Lymfatické orgány .....                               | 15 |
| 2.2 Buňky imunitního systému.....                         | 16 |
| 2.3 Nespecifická imunita.....                             | 17 |
| 2.4 Buněčné složky nespecifické imunity .....             | 17 |
| 2.4.1 Fagocyty .....                                      | 17 |
| 2.4.2 Dendritické buňky.....                              | 17 |
| 2.4.3 Žírné buňky.....                                    | 18 |
| 2.4.4 NK buňky .....                                      | 18 |
| 2.5 Humorální složka nespecifické imunity .....           | 18 |
| 2.5.1 Komplement .....                                    | 18 |
| 2.6 Specifická imunita.....                               | 19 |
| 2.7 Buněčné složky specifické imunity.....                | 19 |
| 2.7.1 T-lymfocyty .....                                   | 19 |
| 2.7.2 B-lymfocyty .....                                   | 20 |
| 2.8 Humorální složky specifické imunity .....             | 20 |
| 2.8.1 Protilátky .....                                    | 20 |
| 2.8.2 Cytokiny .....                                      | 20 |
| 3 Imunitní systém a interakce s vnitřním prostředím ..... | 20 |
| 3.1 Imunitní editace.....                                 | 21 |
| 3.2 Význam protilátek v detekci nádorových buněk .....    | 21 |
| 3.3 Přirozené protilátky proti rakovinným buňkám.....     | 26 |



|     |   |    |
|-----|---|----|
| 3.4 | Rozpoznání nádorových buněk.....                                | 30 |
| 3.5 | Způsoby likvidace nádorových buněk.....                         | 32 |
| 4   | Vliv dendritických buněk v protinádorové imunitě.....           | 33 |
| 4.1 | Únik nádorových buněk před imunitním systémem .....             | 33 |
| 4.2 | Imunizace využitím dendritických buněk.....                     | 34 |
| 4.3 | Výzkumy vakcín z imunizovaných dendritických buněk .....        | 36 |
| 4.4 | Klinické testy vakcín z imunizovaných dendritických buněk ..... | 36 |
| 5   | Závěr .....   | 39 |
| 6   | Zdroje:.....  | 40 |

## Seznam obrázků a tabulek

Obr. 1: Diferenciace různých druhů leukocytů z kmenové buňky

Obr. 2: Funkční analýza protilátek LM-1, PM-1, PM-2, CM-1, CM-2 in vitro

Obr. 3: Protilátkami zprostředkovaná apoptóza detekovaná ELISA<sup>PLUS</sup> kitem pro detekci apoptotické buněčné smrti s protilátkami LM-1, PM-1, PM-2, CM-1, CM-2

Obr. 4: Graf znázorňující aritmetický průměr, medián a rozmezí sérových titrů anti-Fas autoprotiátek u zdravých kontrol, pacientů s kolorektálním adenomem a pacientů s kolorektálním adenokarcinomem

Obr. 5: NK buňky rozpoznávají nádorové buňky, jež netvoří specifické bílkoviny a nemají ani molekuly HLA, ale mají na svém povrchu substance obsahující sacharidy

Obr. 6: NK buňky rozpoznávají buňky, které nemají na svém povrchu molekuly HLA, tím, že receptor pro molekuly HLA na NK buňkách není obsazen

Obr. 7: Identifikace nebezpečné buňky protilátkou

Obr. 8: Průběh vytváření vlastní vakcíny imunizovaných dendritických buněk

Obr. 9: Hodnoty času zdvojení prostatického specifického antigenu před (vlevo) a po (vpravo) léčbě pomocí DCVAC/PCa

Tab. 1: Seznam leukocytů a jejich konkrétních znaků využívaných při průtokové cytometrii

Tab. 2: Reaktivita monoklonálních protilátek třídy IgM se zdravými tkáněmi

Tab. 3: Aktivita monoklonálních protilátek třídy IgM s nádorovými tkáněmi

Tab. 4: Autoprotiátky a jejich cílové rakovinné antigeny

## Seznam zkratek

ADDC – protilátkou zprostředkovaná buněčná cytotoxicita (Antibody Dependent Cell Mediated Cytotoxicity)

AFP – alfa-fetoprotein

ANA – antinukleární protilátky (Antinuclear Antibodies)

Anti-dsDNA – protilátky proti nativní dvouvláknové DNA (Anti-Double Stranded DNA Antibody)

anti-CENPF – protilátky centromerního proteinu F (Centromere Protein-F Antibody)

TIF1 $\gamma$  – transkripční zprostředkující faktor 1 gama (Transcriptional Intermediary Factor 1-Gamma)

APC – antigen prezentující buňky (Antigen Presenting Cells)

BCR – receptor B-lymfocytů (B Cell Receptor)

CTLA-4 - cytotoxický T lymfocytární antigen 4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4)

DAMP – s poškozením/nebezpečím asociované molekulární vzory (Damage/Danger-Associated Molecular Patterns)

DC – dendritické buňky (Dendritic Cells)

DLBCL – difuzní velkobuněčný B-lymfom (Diffuse Large B-Cell Lymphoma)

DM – dermatomyositida (Dermatomyositis)

DTC – diferencovaná karcinomy štítné žlázy (Differentiated Thyroid Cancer)

ENA – protilátky proti extrahovatelným nukleárním antigenům (Extractable Nuclear Antigen Antibodies)

GM-CSF – faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor)

HAB1 – na histonové acetyltransferázy senzitivní heteromyelom (HAT-Sensitive Hereromyeloma)

HAT – histonové acetyltransferázy (Histone Acetyltransferase)

HER2 – humánní epidermální receptor 2 (Human Epidermal Receptor 2)

HLA – lidský leukocytární antigen (Human Leukocyte Antigen)

HSP70/90 – protein teplotního šoku (Heat Shock Protein 70/90)

IL – interleukin

IS – imunitní systém (Immune Systém)

KC – přirozený zabiják (Killer Cell)

KIR – imunoglobulinové receptory (Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptor)

LEMS – Lambert-Eatonův myastenický syndrom (Lambert–Eaton Myasthenic Syndrome)

MAGE-1 – s melanomem asociovaný antigen 1 (Melanoma Associated Antigen 1)

mCRPC – metastatický kastročně-rezistenční karcinom prostaty (Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer)

MHC – hlavní histokompatibilní komplex (Major Histocompatibility Complex)

MUC – mucin

MyD88 – protein primární odpovědi myeloidní diferenciaci 88 (Myeloid Differentiation Primary Response Protein 88)

IRAK4 – kináza 4 asociovaná s receptorem interleukinu-1 (Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase 4)

NAA – přirozené protilátky (Natural Auto-Antibodies)

NHL – nehodgkinův lymfom (Non-Hodgkin Lymphoma)

NK – přirození zabíječi (Natural Killers)

NT-LEMS – nerakovinný Lambert-Eatonův myastenický syndrom (Non Tumor Lambert–Eaton Myasthenic Syndrome)

PSA – prostatický specifický antigen (Prostate-Specific Antigen)

PSADT – čas zdvojení prostatického specifického antigenu (PSA Doubling Time)

SCLC – malobuněčný bronchogenní karcinom (Small Cell Lung Cancer)

TAA – s nádory asociované antigeny (Tumor Associated Antigen)

T<sub>c</sub> – cytotoxické T-lymfocyty (Cytotoxic T-lymphocyte)

TCR – receptor T-lymfocytů (T Cell Receptor)

TgAbs – protilátky thyroglobulinu (Thyroglobulin Antibodies)

TGF- $\beta$  - transformující růstový faktor  $\beta$  (Transforming Growth Factor  $\beta$ )

T<sub>H</sub> – pomocné T-lymfocyty (Helper T-lymphocyte)

TLR8 – receptor Toll-podobný 8 (Toll Like Receptor 8)

TNF- $\beta$  - tumor nekrotizující faktor  $\beta$  (Tumor Necrosis Factor)

Treg – regulační T-lymfocyty (Regulatory T Cells)

TSA – nádorově specifické antigeny (Tumor Specific Antigen)

U.S. FDA – Úřad pro kontrolu potravin a léčiv Spojených států amerických (Food and Drug Administration)

# 1 Úvod

Protilátky v našem těle zastávají mnoho funkcí. Jsou součástí velkého cyklu imunitních reakcí a chrání nás tak před ohromnou škálou onemocnění. Protilátky jsou však také slibným diagnostickým a prognostickým biomarkerem pro nádorová onemocnění. Průměrný věk dožití člověka se za posledních 150 let více než zdvojnásobil. S tím je spojený zvýšený výskyt nádorových onemocnění, který se při věku dožití kolem 35 let tolik nezaznamenával. Se stále narůstajícím procentem lidí, trpícím nádorovým onemocněním, se také rozvíjejí metody na jejich detekci a jejich léčbu. K diagnostice se využívá zobrazovacích technik. Mezi nejznámější patří ultrazvuk, rentgen, mamograf, počítačová tomografie a magnetická rezonance. Další možností jsou bioptické metody, kdy se odebírá tkáň, která se následně podrobí histologickému vyšetření. Využívá se i genetických metod, kdy se sledují změny v DNA. Provádějí se i biochemické testy, kdy se testují biologické materiály, jako krev, moč, stolice a sledují se nádorové markery ve větších koncentracích (obvykle bílkoviny produkované nádorem). V posledních letech se studia zaměřují na využití autoprotilátek k detekci časných stádií nádorových onemocnění. Využívají skutečnosti, nádorové buňky mají na svém povrchu nádorové specifické antigeny (TSA – Tumor Specific Antigens) a proti nim tělo vytváří protilátky. Každý druh nádorové buňky má určitý soubor těchto TSA. Některé jsou více specifické a některé se vyskytují u více druhů nádorových buněk. Také se využívá exprese s nádorem asociovaných antigenů (TAA – Tumor Associated Antigens), které se však vyskytují i na zdravých buňkách těla vlastních. Práce se zaměřuje na jednotlivé autoprotilátky využívané k diagnostice a možné prognóze různých nádorových onemocnění. V některých případech jsou totiž autoprotilátky produkovány dříve, než by bylo možné nádor odhalit jinými metodami. Dalším tématem je příprava a klinické využití vakcín připravených z dendritických buněk imunizovaných nádorovými antigeny. Ty poté stimulují imunitní systém a často doplňují běžné metody boje s rakovinou, jako je například radioterapie nebo chemoterapie.

## 2 Imunitní systém

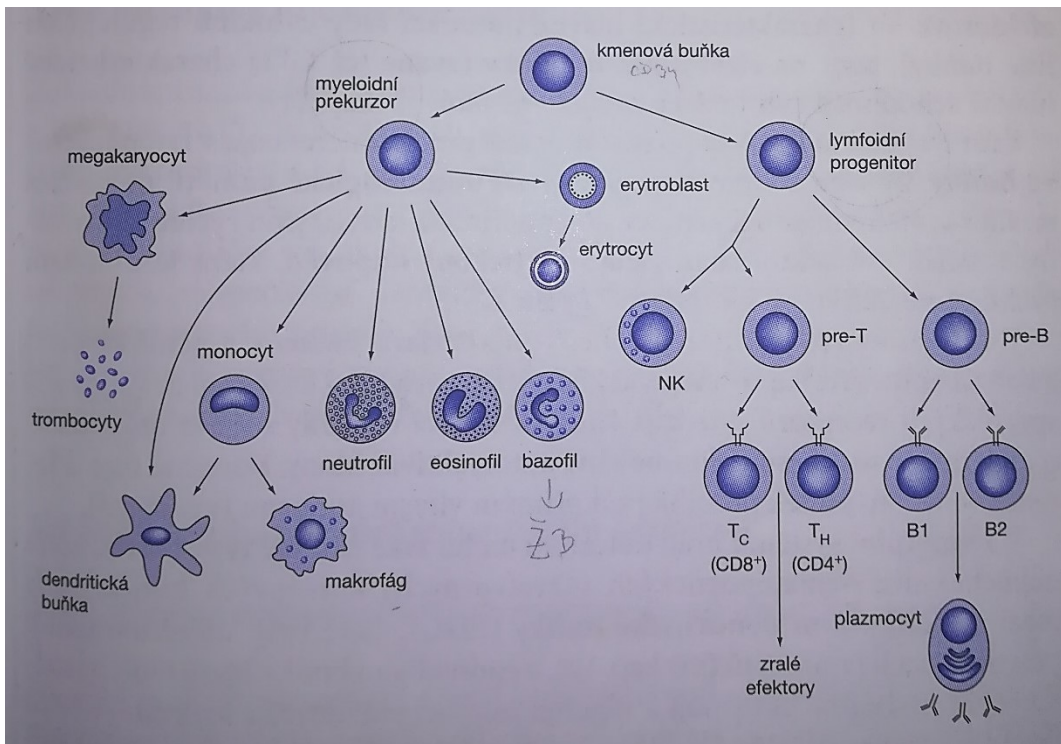
Imunitní systém (IS) je soubor mechanismů, který chrání naše tělo před různými vnějšími, ale i vnitřními vlivy, které by mohly poškodit náš organismus, nebo jakkoliv omezit jeho správnou funkci. IS je tvořen velkou škálou druhů buněk a molekul s interakcemi mezi nimi. Jedna část imunitního systému se stará o staré, poškozené buňky, které již neplní svou funkci. Také má za úkol kontrolovat správnou funkčnost a správné množení buněk. Problém nastává, pokud se buňka začne nekontrolovatelně množit a z toho důvodu ztratí svou funkčnost. Zároveň uniká dohledu imunitního systému a její dělení nepodléhá kontrole. Takové buňky se označují jako nádorové buňky. Za nádor, přesněji maligní nádor, považujeme soubor buněk, který v důsledku selhání různých mechanismů buněčného dělení, přestal plnit svou fyziologickou funkci, jelikož se začal nekontrolovaně množit. Zároveň se také může rozšiřovat do okolních tkání a uvolňuje malé fragmenty (metastázy), které putují po těle a tím se nádor šíří. Na takovéto buňky, nebo tkáně v ideálním případě tělo reaguje pomocí různých obranných mechanismů např. zvýšenou produkcí protilátek. Bohužel se tomu tak neděje u všech případech a mnohé nádorové buňky unikají imunitnímu systému a nekontrolovatelně se množí dál.

### 2.1 Lymfatické orgány

Obecně je dělíme na primární a sekundární. Mezi primární lymfatické orgány řadíme kostní dřeň, thymus. V těchto orgánech (kostní dřeň) vznikají, nebo se dále diferencují (kostní dřeň i thymus) imunokompetentní buňky. To jsou buňky, které zprostředkovávají imunitní odpověď. Rozlišují se 2 skupiny. Buňky nespecifické imunity (granulocyty a makrofágy) a buňky specifické imunity (B a T-lymfocyty). Sekundární lymfatické orgány jsou lymfatické (mízní) uzliny a jejich organizované shluky, jako jsou mandle (tonsily), apendix, nebo Peyeroovy pláty ve střevě, dále sem patří i slezina. Sekundární lymfatické orgány jsou místem, kde probíhají hlavní fáze antigenně specifických imunitních reakcí.

## 2.2 Buňky imunitního systému

Hlavními buňkami IS jsou leukocyty (bílé krvinky), a to v různých podobách. Všechny druhy leukocytů vznikají z kmenových buněk v kostní dřeni s charakteristickým znakem CD34. Vývoj bílé krevní řady probíhá dvěma liniemi. Jednou z nich je myeloidní a druhá lymfoidní. U myeloidní řady se kmenová buňka (CD34) mění na myeloidní prekursor a ten se může diferenciovat buď na monocyty, ze kterého se následně stane makrofág, nebo dendritická buňka. Tyto buňky se poté podílejí na fagocytóze. Z myeloidního prekursoru mohou vznikat i granulocyty. Těch jsou tři druhy. Neutrofil, eozinofil a bazofil (z nich vznikají dále žírné buňky neboli mastocyty). I granulocyty se podílejí na fagocytóze a díky tomu všechny tyto buňky vzniklé z myeloidních prekursorů můžeme zařadit do složky nespecifické (vrozené) imunity. Druhou linií je lymfoidní linie, ve které se z kmenové buňky (CD34) přes lymfoidní progenitor vyvíjejí buňky imunity specifické. Jedná se hlavně o B-lymfocyty a T-lymfocyty. Dále sem patří ještě NK buňky, což jsou tzv. přirození zabíječi.



Obr. 1: Diferenciace různých druhů leukocytů z kmenové buňky [52]



## 2.3 Nespecifická imunita

Nespecifická imunita, též imunita vrozená, přirozená je v organismu přítomna již ve fázi zygoty, jelikož její informace jsou zaprány v DNA jedince.

## 2.4 Buněčné složky nespecifické imunity

### 2.4.1 Fagocyty

Mezi fagocyty, které se starají o fagocytózu cizorodých, ale i vlastních buněk organismu řadíme granulocyty neutrofilní a eosinofilní, poté monocyty, které se po přestupu z krve do tkání mění na makrofágy. Granulocyty se zaměřují na ochranu před cizorodými extracelulárními patogeny.

### 2.4.2 Dendritické buňky

Dendritické buňky (DC) se řadí mezi fagocyty, avšak mezi fagocyty, které předkládají antigen (APC). Díky tomu jsou dendritické buňky jakýmsi spojovníkem mezi imunitou antigenně nespecifickou a imunitou antigenně specifickou. V organismu se vyskytují ve dvou formách. Zralé a nezralé. Nezralé DC během svého života pohlcují odumřelé části zdravých tkání. Poté je vystaví pomocí MHC (Major Histocompatibility Complex) pro T-lymfocyty. Zde však nedochází k aktivaci T-lymfocytů, ale spíše naopak. Dochází k útlumu, nebo se z T-lymfocytů stanou tzv. regulační T-lymfocyty (Treg), které aktivně potlačují imunologické akce proti tomuto typu buněk. Dendritické buňky prezentují T-lymfocytům především buňky těla vlastní a díky nim T-lymfocyty nepožírají vlastní zdravé tkáně. Pokud nastane situace, kdy dendritická buňka vyhodnotí pomocí receptorů, které má na povrchu, že pohltila patogen, dojde k takzvanému dozrání. Během zrání také dochází k tzv. přeprogramování na antigen prezentující buňku (APC). Především kvůli zvýšení exprese MHC proteinů. Po dozrání už DC nepohlcuje částice z okolí, pouze zpracuje patogen, který pohltila naposledy a prezentuje jej pomocí MHC pro T-lymfocyty. Hlavní význam zralých DC je ten, že dokážou aktivovat naivní T-lymfocyty, tedy lymfocyty, které nepřišly do kontaktu s antigenem. Při vystavení antigenů pomocí MHC I. třídy dochází k aktivaci Tc-lymfocytů a při vystavení antigenu MHC II. třídy se aktivují Th-lymfocyty. Po kontaktu s patogenem se zralé dendritické buňky přesouvají do lymfatických uzlin, kde dochází ke kontaktu s lymfocyty a jejich aktivaci. Dendritické buňky mají vliv na rozsah a intenzitu imunitní reakce. Pro každý patogen je imunitní reakce jiná. K dozrání DC může dojít i po pohlcení buňky těla

vlastní, která však zahynula neobvyklou smrtí. Zde se jedná o rozpoznání řízené buněčné smrti neboli apoptózy, při které nedochází k porušení buněčné stěny a nekrózy, kdy dojde například k mechanickému poškození buňky a vnitřek buňky se vylíje do okolí. Dalším způsobem aktivace DC je vliv okolních buněk, konkrétně pak vliv prozánětlivých cytokinů. Dozrání dendritických buněk je nevratné a po dozrání mají životnost 48-72 hodin. Za tuto dobu se snaží aktivovat co největší množství lymfocytů, ať už jsou to T<sub>c</sub>, T<sub>h</sub>, nebo paměťové T-lymfocyty.

### **2.4.3 Žírné buňky**

Žírné buňky jsou také nazývány mastocyty nebo heparinocyty. Jejich hlavní funkcí však není fagocytóza, ale vynikají spíše svou sekreční funkcí. Známe dva typy. Pojivové a slizniční. K jejich diferenciaci dochází podle vlivu prostředí, kde se vyskytují. Jejich hlavní úlohou je vyvolání alergické reakce, a to kvůli přítomnosti histaminu a heparinu uvnitř mastocytu. Uplatňují se však i při výskytu zánětu, nebo při napadení parazity. Dalším důležitou vlastností je uvolňování látek, jako jsou proteázy, zánětlivé cytokiny, růstové faktory a další. Ve studii bylo zjištěno, že mastocyty mají velký vliv při ochraně před přírodními živočišnými jedy. [1]

### **2.4.4 NK buňky**

NK buňky neboli natural killer cells, přirození zabíječi jsou důležitou složkou přirozené imunity. Tvoří přibližně 10-15 % všech lymfocytů. Jejich důležitost je hlavně díky schopnosti reagovat bez předchozí aktivace. Stačí pouze kontakt s poškozenou, napadenou buňkou. Na vyvolání reakce se tedy nepodílí antigeny MHC. Produkují řadu cytokinů a chemokinů, tím jsou schopny regulovat imunitní reakce.

## **2.5 Humorální složka nespecifické imunity**

### **2.5.1 Komplement**

Komplement je soubor přibližně 30 sérových a membránových proteinů. Je součástí nespecifické humorální imunitní odpovědi. Mezi 30 proteinů vyniká hlavních 9 sérových proteinů. Ty se označují C1-C9. Funkce komplementu jsou různé, ale mezi hlavní patří opsonizace, tedy zvýraznění/označení patologické částice nebo už napadené buňky a tím pomoci fagocytům ji rychleji detekovat a následně eliminovat (C3b). Dále je to chemotaxe, což je pohyb buněk IS směrem k oblasti, kde se vyskytují chemotaxiny (C3a, C3b). Jedná se o místa, kde je například zánět. Další funkcí jsou například osmotická lyze (komplex C3b-C9), aktivace B-lymfocytů (C3dg) a další.

## 2.6 Specifická imunita

Specifická imunita se od té nespecifické liší tím, že je fylogeneticky novější, je tedy mladší a vyskytuje se pouze u obratlovců. Bývá také označována jako imunita získaná. To hlavně kvůli tomu, že v genetické informaci jedince jsou zapsány pouze její základy a specifická imunita se rozvíjí během života. Například u savců se rozvíjí už s přijímáním mateřského mléka, poté hned po porodu při kontaktu s patogeny v okolním prostředí. Specifická imunita je tvořena buněčnou složkou, kam patří B-lymfocyty a T-lymfocyty. Druhou složkou je složka humorální, kam řadíme protilátky a cytokiny.

## 2.7 Buněčné složky specifické imunity

### 2.7.1 T-lymfocyty

T-lymfocyty jsou velmi významné v obraně proti virům, plísním i nádorovým buňkám a zodpovídají i za odmítnutí transplantovaných tkání. Jejich hlavním úkolem je regulovat činnost dalších imunocytů prostřednictvím cytokinů. Pomocí těchto látek aktivují B-lymfocyty, makrofágy a zprostředkovávají cytotoxicitu [2]. T-lymfocyty úzce spolupracují s MHC proteiny, které jim předkládají antigeny z buněk, nebo z blízkého okolí buněk. Vývoj T-lymfocytů probíhá v kostní dřeni a poté pokračuje v thymu. T-lymfocyty se poté diferencují. Známe například  $T_H$  pomocné lymfocyty,  $T_c$  cytotoxické lymfocyty, Treg a další. Tyto skupiny se od sebe liší funkcemi a rozlišujeme je podle specifických receptorů, koinhibitorů nebo kostimulačních molekul. Rozlišují se například v průtokovém cytometru, kde se využívá rozdílných znaků na každé skupině T-lymfocytů.

|                         |                 |
|-------------------------|-----------------|
| Plazmatické buňky       | CD38+           |
| Monocyty                | CD14+           |
| Granulocyty             | CD15+           |
| Zralé T lymfocyty       | CD3+            |
| Pomocné T lymfocyty     | CD4+            |
| Cytotoxické T lymfocyty | CD8+            |
| Aktivované T lymfocyty  | CD25+           |
| Zralé B lymfocyty       | CD19+, CD5+     |
| NK buňky                | CD56+,<br>CD16+ |

Tab. 1: Seznam leukocytů a jejich konkrétních znaků využívaných při průtokové cytometrii [58]

### **2.7.2 B-lymfocyty**

B-lymfocyty se podílejí hlavně na tvorbě protilátek a při vytváření imunitní paměti. Vznikají v kostní dřeni a odtud putují do periferie. Antigen rozpoznávají pomocí BCR (B Cell Receptor), kdy po navázání antigenu na tento receptor dojde k diferenciaci a pomnožení B-lymfocytu. Dělí se na plazmatické buňky, které vytvářejí protilátky a část z B-lymfocytů se přeměňuje na tzv. paměťové buňky, které při opakovanému vystavení stejnému patogenu urychlují imunitní reakci.

## **2.8 Humorální složky specifické imunity**

### **2.8.1 Protilátky**

Protilátky jsou bílkovinné látky, které jsou tvořeny plazmatickými buňkami. Protilátky se specificky váží na antigen. Protilátky jsou směřovány proti extracelulárním patogenům, jako jsou například bakterie, různí parazité, nebo toxiny. Dále také podporují ostatní složky IS. Zahajují zánětlivé reakce, nebo pomocí opsonizace usnadňují fagocytózu.

### **2.8.2 Cytokiny**

Cytokiny jsou skupina nízkomolekulárních proteinů a glykoproteinů. Jsou produkovány buňkami imunitního systému v závislosti na různých stimuly. Zajišťují především komunikaci mezi buňkami IS a také spojují složky nespecifické a specifické imunity. Dále se podílejí na aktivaci specifické imunity.

## **3 Imunitní systém a interakce s vnitřním prostředím**

Schopnost imunitního dohledu má každý člověk. Jedná se o složku autoimunitního systému, který slouží ke kontrole povrchu buněk těla. O tuto kontrolu se zaslouhují především lymfocyty T a NK buňky. Buňky jsou kontrolovány buď přímo, nebo se kontrolují prostřednictvím vzorků přinesených dendritickými buňkami. Vliv autoimunity je prokázán na příkladech lidí, které trpí oslabeným imunitním systémem buď nemocemi postihující IS, např. AIDS, nebo vlivem imunosupresiv (látky oslabující IS). U takových to lidí byl prokázán vyšší výskyt nádorových onemocnění vyvolaných viry. Nádorové buňky vznikají v těle každého člověka, je pouze otázkou, pokud je náš imunitní systém natolik schopný všechny tyto buňky odhalit a eliminovat.

### 3.1 Imunitní editace

V poslední době je všeobecně přijímaná rozšířená modifikace hypotézy o imunitním dohledu, označovaná jako imunitní editace nádorů. Podle ní má vývoj nádoru tři fáze – eliminace, rovnováha a únik (anglicky „3 E – Elimination, Equilibrium, Escape“). V první fázi imunitní systém rozpozná a ničí nádorové buňky. Důležitou podmínkou pro aktivaci eliminačních imunitních protinádorových mechanismů je, aby nádorové buňky hynuly tzv. imunogenní buněčnou smrtí. K tomu dochází, pokud se např. nacházejí v hypoxickém prostředí. Na povrchu takové umírající buňky se poté prezentují molekuly, které především dendritické buňky vnímají jako signály nebezpečí a reagují na ně aktivací. Souhrnně se označují jako DAMPs (Danger Associated Molecular Patterns) a patří mezi ně například tzv. proteiny teplotního šoku (HSP70 a HSP90), nebo protein kalretikulin, normálně přítomný v endoplazmatickém retikulu. Z těchto umírajících buněk jsou ale uvolňovány i rozpustné aktivační DAMPs, jako ATP nebo kyselina močová. V případě, že nedochází k prezentování DAMPs, kvůli genetickým mutacím, nejsou DC schopny tyto nádorové buňky včas detekovat a IS je nemůže tímto způsobem eliminovat. Nastává druhá fáze procesu imunitní editace – rovnováha. V této fázi imunitní systém sice ještě dokáže kontrolovat růst nádoru, ale nedokáže jej zcela eliminovat. Tato fáze někdy odpovídá tomu, co se klinicky označuje jako preneoplastické onemocnění, které ve velké většině případů zůstává neodhalené a může trvat i mnoho let. V některých případech ale dojde k dalším genetickým změnám v některých nádorových buňkách, které jim přinesou růstovou výhodu nebo zvýší odolnost vůči imunitní kontrole, nebo je imunitní systém oslaben (např. vlivem stárnutí nebo některých nemocí). Potom mohou nádorové buňky imunitní kontrole zcela uniknout a začít se nekontrolovaně množit, unikat z primárního nádoru a vytvářet metastázy (třetí fáze – únik) [3].

### 3.2 Význam protilátek v detekci nádorových buněk

Protilátky k dnešnímu dni prokázaly velký význam při ochraně organismu před virovými, bakteriálními i parazitickými infekcemi. Nicméně jejich význam v boji proti nádorovým onemocněním teprve pomalu odkrýváme.

Jedním z využití protilátek v protinádorové léčbě a prevenci před vznikem nádorového onemocnění je sledování hladin určitých protilátek, které slouží jako indikátor možného propuknutí rakovinotvorného bujení. Ty se dají po izolaci z nádoru

použit i při dalším boji s nádorovými buňkami. Tyto protilátky totiž vznikají i několik let, před diagnostikou rakoviny [4].

Jednou z prvních takto sledovaných protilátek byly protilátky anti-p-53. Již v roce 1982 byla publikována studie, která spojovala protilátky proti proteinu p-53 a rakovinu prsu [5]. V roce 1987 byly protilátky proti p-53 objeveny u dětí s B-buněčným lymfomem, ale také u dětí s jinými druhy nádorů [6]. Došlo se tedy k závěru, že protilátky anti-p-53 nemají specifickou diagnostickou funkci, protože se vyskytují u velkého počtu nádorových onemocnění, jako je například rakovina plic, močového měchýře, slinivky, prsu, a vaječníků [7].

Skupinou, s diagnostickou funkcí, takto sledovaných protilátek je například rodina protilátek IgM. Pomocí hybridomové metody bylo izolováno 5 skupin takových protilátek. Jedná se o skupinu LM-1, která byla izolována z pacienta s rakovinou plic. Protilátky PM-1 a PM-2 izolované z pacienta s rakovinou pankreatu a protilátky CM-1 a CM-2, které byly izolovány z pacienta s karcinomem tlustého střeva. Všechny tyto protilátky byly izotypy IgM/ $\lambda$ . Pro izolaci těchto monoklonálních protilátek s nádorovou reaktivitou, byly lymfocyty z mízních uzlin nebo sleziny znesmrtelněny somatickou hybridizací společně s heteromyelomem HAB-1. Tyto protilátky byly zjištěny metodou ELISA, kdy byly testovány supernatanty hybridomů na jejich přítomnost a následně byla provedena další ELISA, kde byly protilátky primárně testovány imunohistochemicky proti jejich autolognímu nádoru, pro zjištění jejich specifické nádorové reaktivity. Během testování bylo prokázáno, že dochází k silné interakci mezi protilátkami (LM-1, PM-1, PM-2, CM-1 a CM-2) a nádorovými tkáněmi. Pouze u CM-1 byla prokázána slabá interakce s tkání dlaždicových buněk jícnu (Tab. 2). U protilátek LM-1 a PM-2 byla prokázána specifita k více nádorovým tkáním, ale například skupina CM-2 je specifická pouze k nádorovým buňkám tlustého střeva (Tab. 3) [8].

Reaction pattern of the monoclonal IgM antibodies on normal tissues

| Tissue          | LM-1 | PM-1 | PM-2 | CM-1 | CM-2 |
|-----------------|------|------|------|------|------|
| Stomach         | -    | -    | -    | -    | -    |
| Colon           | -    | -    | -    | -    | -    |
| Lung            | -    | -    | -    | -    | -    |
| Esophagus       | -    | -    | -    | +    | -    |
| Thyroid         | -    | -    | -    | -    | -    |
| Urinary bladder | -    | -    | -    | -    | -    |
| Kidney          | -    | -    | -    | -    | -    |
| Prostate        | -    | -    | -    | -    | -    |
| Testis          | -    | -    | -    | -    | -    |
| Breast          | -    | -    | -    | -    | -    |

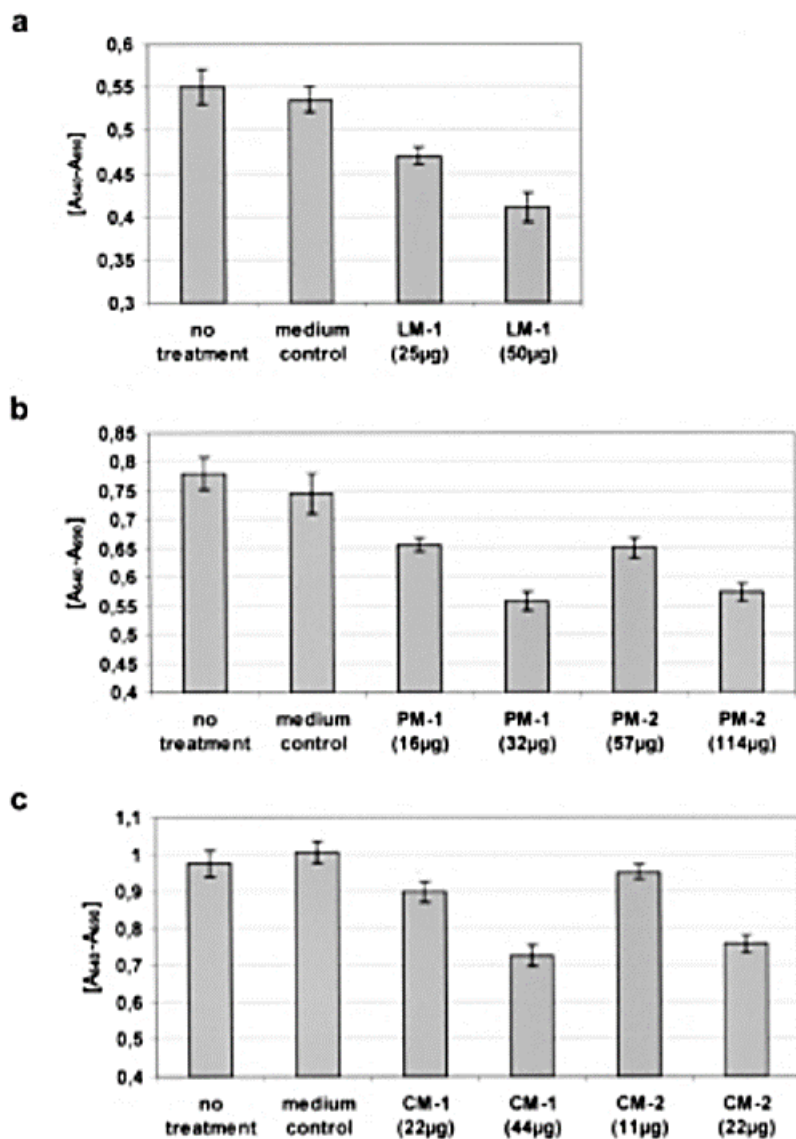
Tab. 2: Reaktivita monoklonálních protilátek třídy IgM se zdravými tkáněmi [59]

Reaction pattern of the monoclonal IgM antibodies on tumor tissues

| Tissue          | Carcinoma type     | LM-1 +/- | PM-1 +/- | PM-2 +/- | CM-1 +/- | CM-2 +/- |
|-----------------|--------------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Stomach         | Adeno              | 2/1      | 3/1      | 3/0      | 1/2      | 0/3      |
| Colon           | Adeno              | 3/0      | 2/1      | 3/0      | 25/2     | 11/16    |
| Lung            | Adeno              | 2/1      | 3/1      | 3/0      | 3/1      | 0/4      |
|                 | Squamous cell      | 3/0      | 2/2      | 3/0      | 2/1      | 0/3      |
| Esophagus       | Squamous cell      | 3/0      | 3/0      | 3/0      | 3/0      | 0/3      |
| Pancreas        | Adeno              | 5/0      | 5/1      | 6/0      | 1/5      | 0/6      |
| Urinary bladder | Urothel            | 1/0      | 0/1      | 1/0      | 0/1      | 0/1      |
| Kidney          | Renal cell         | 1/0      | 0/1      | 1/0      | 0/1      | 0/1      |
| Prostate        | Adeno              | 4/0      | 1/4      | 4/1      | 4/3      | 0/5      |
| Breast          | Invasive (ductal)  | 2/0      | 2/1      | 3/0      | 3/0      | 0/3      |
|                 | Invasive (lobular) | 2/0      | 2/1      | 3/0      | 1/2      | 0/3      |
| Ovary           | Adeno              | 3/0      | 1/1      | 3/0      | 2/1      | 0/2      |
| Uterus          | Adeno              | 3/0      | 1/2      | 3/0      | 2/0      | 0/3      |

Tab. 3: Aktivita monoklonálních protilátek třídy IgM s nádorovými tkáněmi [59]

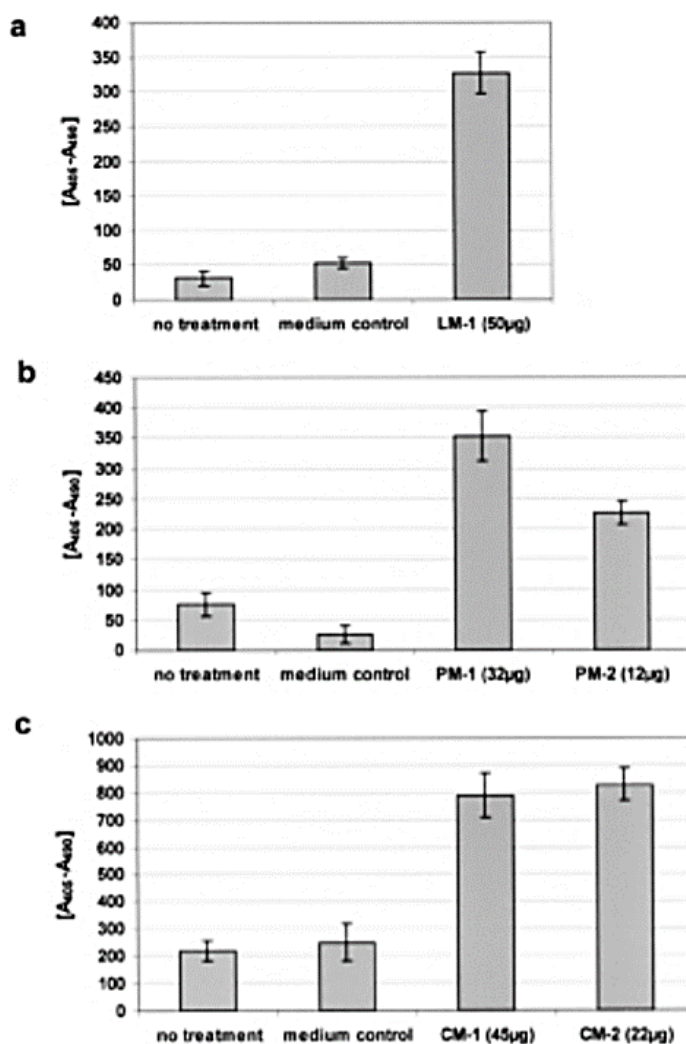
Pro zjištění možné funkční aktivity protilátek in vitro byla použita metoda MTT (Colorimetric Mitochondrial Hydroxylase Assay), což je běžná metoda při stanovení proliferace [9]. Jednalo se o inkubaci nádorových buněk s různými koncentracemi různých protilátek (LOU-NH91 pro LM-1, BXPC-3 pro PM-1 a PM-2, Colo-206F pro CM-1 a CM-2). Po 24 hodinách všech 5 skupin protilátek dokázalo inhibovat buněčnou proliferaci v závislosti na koncentraci, zatímco kontrolní vzorky bez protilátek zůstaly nezměněny [16]. (Obr. 4)



Obr. 2: Funkční analýza protilátek LM-1, PM-1, PM-2, CM-1 CM-2 in vitro. a) na koncentraci závislá inhibice buněčné proliferace protilátkou LM-1 na buněčnou linii rakoviny plic LOU-NH91. b) na koncentraci závislá inhibice buněčné proliferace protilátkou PM-1 a PM-2 na buněčnou linii rakoviny pankreatu BXPC-3. c) na koncentraci závislá inhibice buněčné proliferace protilátkou CM-1, CM-2 na buněčnou linii rakoviny tlustého střeva Colo-206F. Kontrolní médium: supernatant ochuzené buněčné kultury jiných (než zkoumaných) IgM protilátek byl přidán ve stejných koncentracích [53]



Dalším předmětem zkoumání byl vliv protilátek na růst a usmrcení nádorových buněk. K tomu byl použit ELISA<sup>PLUS</sup> Kit pro detekci buněčné smrti (Cell Death Detection ELISA<sup>PLUS</sup> Apoptosis Assay). Tento test dokáže rozlišit rozdíl mezi buňkou zahynutou nekrotózou, nebo buňkou usmrcenou řízenou apoptózou. Test po 24 hodinové inkubaci prokázal schopnost protilátek hubit nádorové buňky apopticky (Obr. 5).



Obr. 3: Protilátkami zprostředkovaná apoptóza detekovaná ELISA<sup>PLUS</sup> kitem pro detekci apoptotické buněčné smrti s protilátkami LM-1, PM-1, PM-2, CM-1, CM-2. a) protilátkou zprostředkovaná apoptóza s protilátkou LM-1 na buněčnou linii karcinomu plic LOU-NH91. b) protilátkou zprostředkovaná apoptóza s protilátkou PM-1 a pm-2 na buněčnou linii karcinomu pankreatu BXPC-3. c) protilátkou zprostředkovaná apoptóza s protilátkou CM-1 a CM-2 na buněčnou linii tlustého střeva CACO-2. Kontrolní médium: supernatant ochuzené buněčné kultury jiných (než zkoumaných) IgM protilátek byl přidán ve stejných koncentracích [53]

Tyto testy dokázaly vliv izolovaných protilátek na proliferaci, ale také na jejich schopnost indukovat apoptózu u rakovinných buněk [8].

### 3.3 Přirozené protilátky proti nádorovým buňkám

Přirozené polyreaktivní autoprottilátky (NAA - Natural Auto-Antibodies), převážně se jedná o izotypy IgM, kódované nemutovanými zárodečnými liniemi IgV geny, představují velkou část cirkulujících protilátek. Neváží se k různým proteinovým strukturám, ale rozpoznávají specifické vzory konzervativních molekul [10]. Jednou skupinou protilátek sledovanou při brzkých stádiích rakoviny prsu jsou MUC1 protilátky [11]. MUC1 (polymorfni epiteliální mucin) byl zkoumán jako vakcína pro imunoterapii pro pacienty s adenokarcinomem. Sledovaly se tedy hodnoty přirozeně se vyskytujících MUC1 protilátek. Pozitivní výsledek MUC1 IgG a IgM protilátek v séru před léčbou byl spojený s velkou výhodou pro přežití stádia I a II pro pacienty trpící rakovinou prsu. Dále se podle hladin MUC1 IgG a IgM protilátek lépe určit stádium už propuklého nádorového onemocnění. Pacienti s přirozeným výskytem MUC1 IgG a IgM v séru mají vyšší šanci na kompletní vyléčení nádoru prsu [10].

Během mnoha let výzkumu bylo zjištěno, že přirozená imunita a přirozené protilátky IgM hrají velkou roli při imunitním dohledu na rakovinné buňky. Pochopení těchto, v těle se přirozeně vyskytujících, autoimunitních odpovědí, které vznikají v přítomnosti nádorových buněk je klíčové k vytvoření postupů při prevenci u nádorových onemocnění (Tab. 4).

| Autoantibody   | Target antigen                       | Function                 | References |
|--|--------------------------------------|--------------------------|------------|
| Anti-CENP-B<br>anti-SS-B                               | Breast cancer                        | Unknown                  | (25)       |
| Anti-survivin<br>anti-livin                            | Breast cancer                        | Unknown/diagnostic       | (26)       |
| Anti-thyroglobulin                                     | Thyroid cancer                       | Unknown                  | (28)       |
| Anti-melanocytes                                       | Melanoma cell lines                  | Proliferation inhibition | (29)       |
| Antibody mediated Lambert-<br>Eaton myastenic syndrome | Small cell lung cancer               | Diagnostic               | (30)       |
| Natural IgM-autoAbs                                    | Leukemia cells                       | Apoptosis                | (31)       |
| Anti-Fas Abs   | Colorectal adeno-<br>carcinoma cells | Apoptosis                | (32)       |
| Anti-dsDNA   | SP2/0 and Wehi 164<br>tumor cells    | Apoptosis                | (34)       |

Tab. 4: Autoprottilátky a jejich cílové rakovinné antigeny [60]

Zvýšené hladiny konkrétních autoprottilátek byly spojeny s výskytem určitého druhu nádorového onemocnění (Tab. 4).

Při sledování hladin autoprottilátek u rakoviny prsu byla vytvořena skupina pacientů k testování hladin autoprottilátek anti-SS-B a anti-CENP-B. Předmětem testů

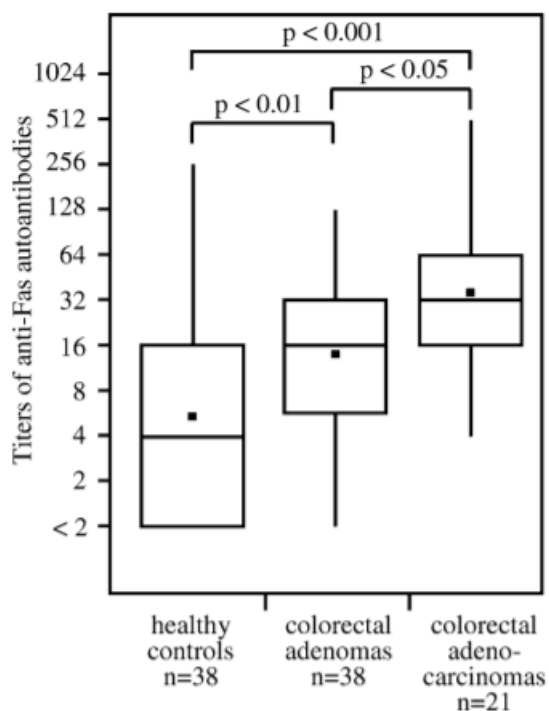
bylo 55 pacientů s rakovinou prsu a 25 pacientů s jiným benigním onemocněním. Bylo zjištěno, že hladina anti-CENP-B byla u pacientů s rakovinou prsu o 25 % vyšší (33 vs 8 %) než u kontrolní skupiny hladiny anti-SS-B o 20 % vyšší (44 vs 24 %) než u kontrolní skupiny [12].

Dalšími sledovanými autoprotilátkami jsou anti-survivin a anti-livin. Survivin a livin se totiž hojně vyskytují na rakovinných a na transformovaných buňkách. Na zdravých tkáních se téměř nevyskytují. Jejich zkoumání probíhalo ve spojení s rakovinou plic. Pacienti s rakovinou plic byli stanoveni s použitím cut-off hodnoty pro pozitivitu stanovenou jako průměrnou absorbance + 2SD pro zdravé kontrolní vzorky. 19 z 37 pacientů s rakovinou plic (51,3 %) byli pozitivní na přítomnost anti-livin protilátek v těle. 18 z 31 (58,1 %) z té samé skupiny pacientů byli pozitivní na přítomnost anti-survivin protilátky. U 21 z 31 (71 %) pacientů s rakovinou plic byla prokázána při kombinovaném testu přítomnost alespoň jedné, nebo obou autoprotilátek. Z testu lze usoudit, že kombinovaný test séra na anti-livin a anti-survivin se dá využít k diagnostice rakoviny plic [13].

U pacientů s malobuněčným bronchogenním karcinomem (SCLC – Small Cell Lung Cancer) bylo prokázáno delší přežití, pokud jim zároveň byl diagnostikován Lambert-Eatonův myastenický syndrom (LEMS). Předmětem testů bylo prověřit imunogenní faktory u SCLC-LEMS v porovnání s NT-LEMS (Non Tumor LEMS) a zjistit jejich roli v prodloužení přežití u pacientů s SCLC [14].

U pacientů s diferencovanými karcinomy štítné žlázy (DTC) byly sledovány hladiny cirkulujících protilátek thyroglobulinu (TgAbs). Prevalence TgAbs na počátku výzkumu u pacientů s DTC byla 29 %. U jedné desetiny pacientů v průběhu nemoci hladiny TgAbs ještě rostly. Po 3 letech od propuknutí nemoci se hladiny TgAbs začaly snižovat přibližně o 10 % [15].

Při zkoumání rakoviny tlustého střeva byl prokázán přímý účinek receptoru Fas (Apo-1, CD 95) spojený s apoptózou. Byly zkoumány autoprotilátky proti Fas u pacientů s kolorektálním adenomem a u pacientů s kolorektálním adenokarcinomem. Porovnávalo se se zdravými kontrolami. Anti-Fas titry byly značně vyšší u pacientů s kolorektálním adenomem než u zdravých kontrol. Avšak ještě vyšší byli u pacientů s kolorektálním adenokarcinomem. To dokazuje, že Anti-Fas hraje obranou roli při karcinogenezi a dokazují značný vliv autoprotilátkových obranných mechanismů [16].



Obr. 4: Graf znázorňující aritmetický průměr, medián a rozmezí sérových titrů anti-Fas autoprotílátek u zdravých kontrol, pacientů s kolorektálním adenomem a pacientů s kolorektálním adenokarcinomem [54]

Anti-dsDNA autoprotílátka mají diagnostickou hodnotu u různých nemocí, jako je erytematózní lupus, AIDS, ale i nádorová onemocnění [17]. Technikou nepřímé imunofluorescence bylo prokázáno, že anti-dsDNA autoprotílátka se mohou vázat na povrch rakovinných buněk. In vitro test imunoseru myši, která dostala anti-dsDNA autoprotílátka izolované z nádorové buňky, byla pozorovatelná v 6. týdnu významná cytotoxicita proti nádorové tkáni v porovnání s myší nenačkovanou. Navíc bylo zjištěno, že nádorové buňky jsou hubeny apoptózou. To samé poté prokázal i test in vivo. Tento test prokázal schopnost ANA (Antinuclear Antibodies) protílátek chovat se jako protirakovinné agens [18].

V souvislosti a ANA protilátkami byla provedena studie na 82 pacientech s diagnostikovaným difúzním velkobuněčným B lymfomem (DLBCL) v různých stádiích a 120 zdravými kontrolami. DLBCL je nejčastější formou (30-40 %) non Hodgkinova lymfomu, což je forma rakoviny lymfatického systému [19]. Hladiny ANA protilátek u pacientů trpících DLBCL byly jasně vyšší. Neprojevíly se však u všech pacientů, ale pouze u 25 (30,5 %). I u 9 (7,5 %) zdravých kontrol se objevily zvýšené hladiny ANA protilátek. Během testování se ukázalo, že většina pacientů si nevytvořila autoimunitní onemocnění, tedy lze předpokládat, že hladiny ANA protilátek nesouvisí a autoimunitními nemocemi, ale souvisí s nádorovým onemocněním DLBCL. Zároveň se prokázalo, že hladiny ANA protilátek se nelišily u pacientů v různých stádiích DLBCL. Nejedná se tedy o ukazatel průběhu a závažnosti onemocnění. Nicméně pacienti s ANA protilátkami v séru měli větší míru přežití [20].

Dále se sledovaly hladiny anti-ENA protilátek (Anti-Extractable Nuclear Antigen Antibodies) u pacientů s non-Hodgkinovým lymfomem před, během a po chemoterapii a tyto výsledky byly porovnávány se zdravými pacienty. Hodnoty ENA byly výrazně vyšší u neléčených pacientů v porovnání se zdravými kontrolami. U pacientů, kteří měli pozitivní odezvu na chemoterapii, byl zaznamenán vysoký nárůst titrů ENA protilátek v porovnání s pacienty, u kterých nenastala pozitivní odezva na léčbu [21].

V roce 2018 byl v Japonsku hospitalizován 72 letý muž s bolestivými vyrážkami na kůži kloubů ruky a očních víčkách a svalovou slabostí. Byla mu diagnostikována dermatomyositida (DM), tedy idiopatické chronické zánětlivé onemocnění. Pacient podstoupil testy zjištění hladin autoprottilátek. Byly nalezeny vyšší hladiny anti-TIF1 $\gamma$  (transkripční zprostředkující faktor 1 gama) protilátek. Po dalších vyšetřeních byla nalezena cysta na thymu., která se potvrdila být nádorového původu. U 20 % pacientů s diagnostikovaným DM se setkáváme s vyššími hodnotami anti-TIF1 $\gamma$  protilátek. Až u 80 % těchto pacientů se vyskytla maligní onemocnění [22].

Ve studii z minulých let se prokázalo, že zvýšené hladiny anti-centromerního proteinu F (CENPF) protilátek byly zaznamenány u pacientů s hepatocelulárním karcinomem. Tyto protilátky byly produkovány, jako odpověď na velkou expresi tohoto proteinu právě na rakovinných buňkách [23].

Podobným mechanismem tělo reaguje i na velkou expresi receptoru HER2/neu, který je detekovatelný u 30 % adenokarcinomů [24]. U rakoviny prsu s nízkým výskytem receptoru HER2/neu nebyly zaznamenány žádné protilátky. Naopak u rakovin prsu, kde byl receptor HER2/neu vysoce exprimován na rakovinných buňkách, byly protilátky v 82 % případů [25].

Jednou z možností léčby rakoviny prsu je využití přípravku Herceptin<sup>TM</sup> s účinnou látkou Trastuzumab. Jedná se o lék proti rakovině prsu typu HER2 pozitivní. Trastuzumab je rekombinantní humanizovaná monoklonální protilátka IgG1, která se selektivně váže na extracelulární doménu receptoru 2 pro lidský epidermální růstový faktor (HER2). Avšak výsledky léčby samotným přípravkem byly úspěšny pouze z 11-15 %. Při kombinaci léčby přípravkem Trastuzumab a chemoterapie byl prodloužen čas progresse nemoci ze 4,6 měsíců na 7,4 měsíce. Bylo dosaženo vyššího procenta pozitivní odpovědi na léčbu až na 50 % a snížení procenta úmrtnosti v průběhu jednoho roku z 33 % na 22 % [26].

### **3.4 Rozpoznání nádorových buněk**

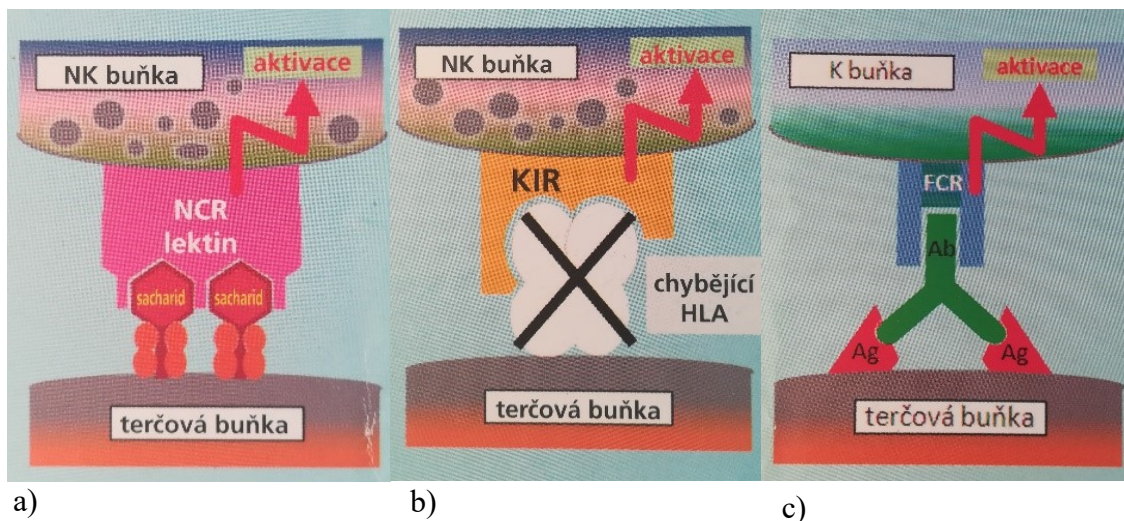
V případě napadení buňky virovou infekcí začne buňka syntetizovat virové bílkoviny a nukleové kyseliny. Ty jsou poté prezentovány prostřednictvím HLA molekul I. třídy cytotoxickým T lymfocytům ( $T_c$ ). Ty ji podle těchto vystavených molekul analyzují a v případě rozeznání patogenity zařídí vyřazení buňky z organismu, tedy její zničení.

Podobně je tomu u nádorových buněk. Zde se však uplatňuje více mechanismů sloužících k identifikaci a všechny nejsou ještě popsány. Pokud dochází k nádorovému bujení vlivem viru, bavíme se poté o infekci onkogenním virem. Je zde využíváno stejného mechanismu, jako u normální virové infekce. Cytotoxické T lymfocyty reagují i na přítomnost specifických bílkovin tzv. nádorových antigenů neboli tumor markerů. Sem patří glykoproteiny, fragmenty produktů mutovaných genů, které jsou produkovány pouze nádorovými buňkami (TSA – Tumor-Specific Antigen). Kromě těchto specifických nádorových antigenů se k identifikaci nádorových buněk hojně využívá antigenů asociovaných s nádory (TAA – Tumor-Associated Antigen). Jedná se o látky tělu ne úplně cizí. Jelikož se fyziologicky vyskytují na embryonálních buňkách. Avšak jejich výskyt na nádorových buňkách je několikanásobně vyšší. Nejedná se tedy o látky zcela specifické pro nádory, ale jejich přítomnost v dospělém

věku se dá použít jako marker nádorového onemocnění. Mezi hlavní zástupce TAA patří onkofetální antigeny. Které se v postnatálním období již v těle nevyskytují a lze je objevit na nádorových buňkách. Konkrétně se poté jedná o  $\alpha$ -fetoprotein (AFP) produkováný buňkami hepatomů a karcinoembryonální antigen karcinomu tlustého střeva. Některé melanomové antigeny (MAGE-1, Melan-A) jsou přítomny v malém množství na normálních melanocytech, ale mnohem více se jich vyskytuje na melanomových buňkách. Jako další je antigen HER2/neu, receptor růstového faktoru epiteliálních buněk, který se v malém množství objevuje na normálních epiteliálních buňkách, kdežto jeho exprese na buňkách některých karcinomů mléčné žlázy je velmi silná.

Může však nastat situace, že nádorová buňka nemá, nebo netvoří žádné specifické bílkoviny. Může nastat situace, že na membráně buňky se nevyskytují ani HLA molekuly, které umožňují funkčnost cytotoxických T lymfocytů. V tomto případě zastoupí  $T_c$  tzv. NK buňky a cytotoxické monocyty. Zde se neuplatňuje schopnost rozpoznávat antigeny, jako u  $T_c$ , ale dochází k rozlišení nádorové buňky od zdravé na základě přítomnosti většího počtu významných substancí obsahujících sacharidy. Jejich výskyt je zřetelně větší než u buněk zdravých. NK buňky využívají receptorů typu lektinových bílkovin, pomocí kterých NK buňky pevně přilnou k nádorovým buňkám s vyšším počtem sacharidových substancí (Obr. 5). V případě úplné absence HLA molekul na membráně nádorové buňky se také uplatňují NK buňky, a to z důvodu že v přítomnosti HLA molekul na membráně jsou cytotoxické účinky NK buněk inhibovány a nechávají tak prostor  $T_c$ . Vedle receptorů typu lektinových bílkovin, mají NK buňky také tzv. KIR (Killing Inhibitory Receptor). KIR se uplatňuje právě při inhibici NK buněk, a to tak, že se na KIR naváže ligand, tedy HLA molekula (Obr. 6). Pokud však nastane situace, kdy nádorová buňka, jako mechanismus obrany proti autoimunitě, nemá HLA molekuly, účinek KIR se neuplatní a NK buňka je schopna na takové nádorové buňky reagovat. Dalším mechanismem v rozpoznání nádorových buněk je rozpoznání pomocí protilátek. Po navázání protilátky na nádorovou buňku dojde k vystavení Fc konce těžkého řetězce protilátky (Obr. 7). Na ten reagují cytotoxické buňky s Fc receptory (FcR), konkrétně pak monocyty a NK buňky. Tento způsob rozeznávání a následné likvidace se označuje jako buňkami zprostředkovaná cytotoxicita závislá na protilátce (ADDC – Antibody-

Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity). Buňky, které umí využít k identifikaci protilátek, tedy schopné provést ADCC, se označují jako buňky K (killer).



Obr. 5: a) NK buňky rozpoznávají nádorové buňky, jež netvoří specifické bílkoviny a nemají ani molekuly HLA, ale mají na svém povrchu substance obsahující sacharidy, b) NK buňky rozpoznávají buňky, které nemají na svém povrchu molekuly HLA, tím, že receptor pro molekuly HLA na NK buňkách není obsazen, c) Identifikace nebezpečné buňky protilátkou [55]

### 3.5 Způsoby likvidace nádorových buněk

Po rozpoznání nádorové buňky buňkou cytotoxickou dojde k její aktivaci. To způsobí zvýšení počtu adhezních molekul, díky kterým je cytotoxická buňka schopna lépe přilnout k nádorové buňce. Zároveň dochází k zmnožení cytokinových receptorů, díky tomu je možný lepší příjem aktivačních signálů. Existuje několik způsobů, jak likvidovat nežádoucí buňky. Jednou z možností je proděravění membrán pomocí perforinů. Jedná se o látky bílkovinné povahy, ale nejedná se o enzymy. Perforiny jsou tvořené a uvolňované po kontaktu s nádorovou buňkou cytotoxickými buňkami. Důležitou schopností perforinů je polymerizace v membráně cílové buňky. Polymerizuje přibližně 10-20 molekul a vytvoří tak válcový dutý útvar, kterým poté uniká cytoplazma z cílové buňky do extracelulárního prostoru a dochází k rozhození iontové rovnováhy a poté k následné buněčné smrti. Další látky pomáhající při likvidaci nádorových buněk jsou granzymy, tedy granulární enzymy. Jedná se o proteolytické enzymy, které se nacházejí v granule cytotoxických buněk. Granzymy poškozují nitrobuněčné děje v nádorové buňce a zároveň podporují funkci perforinů. Další možností je vyvolat v cílové buňce apoptózu, a to přesně obsazením receptoru



pro  $\text{TNF}\beta$ , nebo obsazením molekuly Fas (CD95). Tento způsob buněčné smrti nevyžaduje spotřebu energie od cytotoxické buňky.

## 4 Vliv dendritických buněk v protinádorové imunitě

Pro rozvoj protinádorové imunity, konkrétně pak specifické imunity, jsou nezbytné dendritické buňky. Nádorové antigeny jsou pohlcovány dendritickými buňkami pomocí makropinocytózy, která umožní pohlcení částic velkých 0,5 až 3  $\mu\text{m}$ , a fagocytózou, jíž jsou pohlcovány menší částice. Aby byla schopnost rozpoznat antigeny zesílena, je třeba působení receptorů pro Fc fragment imunoglobulinů IgG (Fc $\gamma$ RII/CD32, Fc $\gamma$ RI/CD64) a receptoru pro manózu [45]. Nediferencované DC si mohou osvojovat i apoptotické buňky, a to prostřednictvím integrinových heterodimerů  $\alpha\beta$ 5,  $\alpha\beta$ 3 a vycytávacích receptorů CD36 [46]. Po vystavení nádorových antigenů na povrchu DC (nyní už zralé DC) pomocí MHC dochází k zastavení pohlcování dalších antigenů a takto zralá DC putuje do lymfatických uzlin. Zde přichází do kontaktu s dalším druhem bílých krvinek s tzv. naivními T-lymfocyty. Při kontaktu DC s naivním T-lymfocytom dochází k předání schopnosti rozpoznat antigeny nádorových buněk. Takové naivní T-lymfocyty se dělí (proliferují) a mění se na lymfocyty efektorové. Ty jsou poté schopné cíleně rozpoznat a eliminovat nádorové buňky [47].

### 4.1 Únik nádorových buněk před imunitním systémem

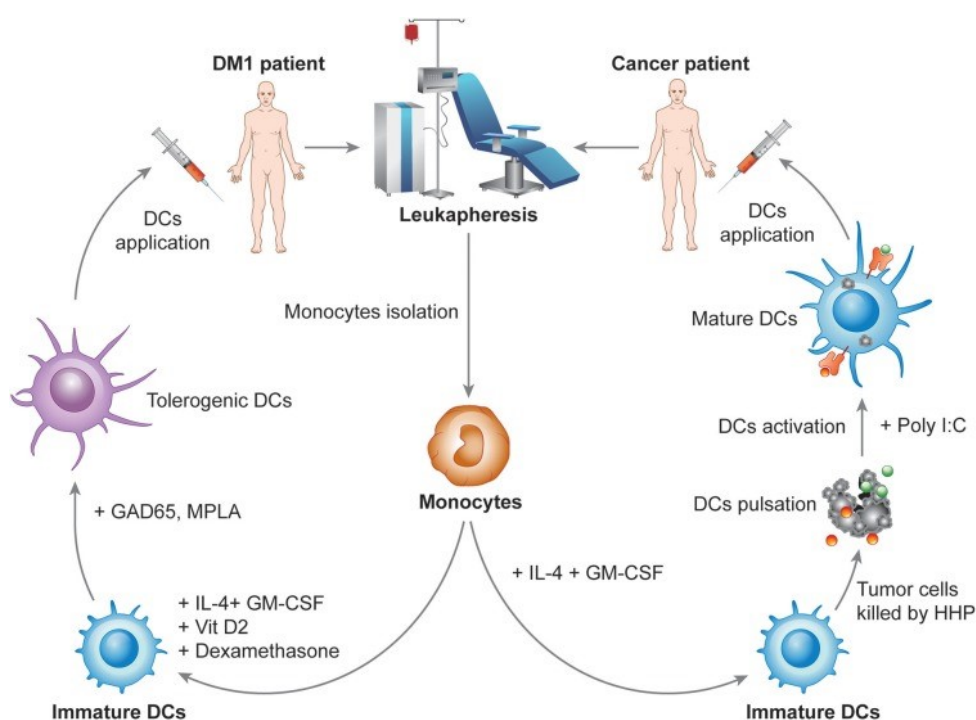
Nádorové buňky jsou, jak už bylo zmíněno, v některých případech velmi podobné buňkám tělu vlastních. Už kvůli tomu je pro IS velmi obtížné rozlišit, proti kterým buňkám zahájit imunitní reakci. Výše popsané mechanismy však fungují pouze při situaci, kdy jsou APC schopny rozpoznat nádorové buňky. Ty ale mají velkou škálu mechanismů, jak se před IS „schovat“. Řada mechanismů je obdobná jako u infekčních mikroorganismů, ale některé se liší. Například vznikají mutagenní formy bez nádorového antigenu. Nebo je jejich hustota exprese velmi nízká a APC je nejsou schopny nalézt, nebo je ignorují [41]. Další vlastností, která komplikuje rozpoznání nádorových buněk je fakt, že nádorové buňky nefungují jako profesionální APC, kvůli nepřítomnosti kostimulačních molekul CD80 a CD86 na jejich povrchu. Z toho důvodu jsou prekurzory T<sub>c</sub> a T<sub>h</sub> utlumeny a nikoli aktivovány. Některé nádorové buňky snižují expresi MHC glykoproteinů I. třídy a tím znemožňují jejich rozpoznání cytotoxickými T-lymfocyty. Obdobně je tomu s expresí MHC glykoproteinů II. třídy,

ale ty by reagovaly s pomocnými T-lymfocyty [42]. Dalším mechanismem k utlumení Tc a Th buněk je i produkce určitých látek nádorovými buňkami. Jedná se o látky, které inhibují klíčové buňky IS (T-lymfocyty). Takto produkováné látky jsou například cytokiny TGF- $\beta$  a IL-10 [28] nebo enzymy, jako je například IDO (Indoleamin 2,3-dioxygenáza) [43]. Tyto látky také inhibují DC, respektive jejich dozrávání a tím i možnost prezentování antigenů na jejich povrch. DC dále inhibuje přítomnost oxidu dusnatého, který produkují některé nádorové buňky, tím že způsobuje jejich apoptózu. Velký význam pro nechtěnou ochranu nádorových buněk mají regulační (tlumivé) T-lymfocyty Treg (CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>) [29]. Ty ochraňují nádorové buňky stejně jako tělu vlastní. V nedávné studii bylo prokázáno spojení mezi Toll-like receptory a Treg lymfocyty, kdy Toll-like receptor 8 (TLR8) údajně dokáže eliminovat změny způsobené Treg a zabránit tak inaktivaci autoimunitní eliminaci nádorových buněk. Tento efekt není závislý na ostatních buňkách (např. DC), ale je závislý na přítomnosti funkční signalizaci TLR8-MyD88-IRAK4 v Treg lymfocytu [10]. Občas dochází k útlumu Tc (CD8<sup>+</sup>) vlivem aktivity NK buněk, které produkují IL-13, který poté iniciuje aktivaci myeloidních buněk. Ty poté produkují TGF- $\beta$ , který následně tlumí funkčnost Tc. Bylo prokázáno, že při blokaci produkce IL-13, nebo TGF- $\beta$  byla funkčnost Tc při eliminaci nádorových buněk zvýšena. [30] Nádory chrání a podporují i tzv. M2 makrofágy (protizánětlivé). Ty se projevují při hojení ran a zotavování tkání poškozených zánětem. Podporují také tvorbu nových cév (angiogenezi), což je ovšem pro rostoucí nádor životně důležité. Nádor je tedy mylně považován některými komponentami imunitního systému za jakousi hojící se ránu, která zasluhuje pomoc [31]. M2 makrofágy jsou aktivovány IL-4 a IL-13 a sekretují IL-10, tím inhibují diferenciaci T-lymfocytů [44].

## 4.2 Imunizace využitím dendritických buněk

Jedním z novějších typů léčby rakoviny je imunizace pomocí dendritických buněk. Přípravuje se léčivý přípravek, který je vyhotoven přímo z krve pacienta. Pacient prochází přes transfúzní stanoviště, kde se mu odebere leukocytární frakce z jeho krve při procesu zvaném leukaferéza. V laboratoři se poté z leukocytů separují monocyty, ze kterých se poté vyvinou v inkubátoru nezralé dendritické buňky účinkem cytokinů GM-CSF a IL-4 [48]. Poté se k nim přidávají usmrcené nádorové buňky, které poskytují velké spektrum nádorových antigenů. Takto usmrcené buňky s velkým počtem antigenů na povrchu aktivují dendritické buňky. Ty po kontaktu s nádorovými

antigeny začínají během několika hodin na svém povrchu vystavovat antigeny z usmrcených nádorových buněk. Takto vzniklé dendritické buňky představují vlastní imunoterapeutický přípravek. Tento proces vytvoření vlastní imunoterapeutického přípravku trvá přibližně 4 týdny a poté je uchováván v tekutém dusíku. Terapie probíhá vpichováním přípravku jednou měsíčně po dobu přibližně jednoho roku. Po aplikaci přípravku vpíchnuté imunizované dendritické buňky putují do mýzních uzlin, kde se setkávají s naivními T-lymfocyty [49]. Zde dochází k přeměně naivního T-lymfocytu na lymfocyt efektorový po navázání protinádorových antigenů. Protinádorově specifické T-lymfocyty putují krví po těle a vyhledávají a následně likvidují nádorové buňky. Výhody této metody jsou například fakt, že se imunitní systém pacienta stimuluje DC během delšího časového období. Použitím velkého spektra nádorových antigenů z usmrcených nádorových buněk se zvyšuje pravděpodobnost rozpoznání nádorových buněk v těle pacienta. Další výhodou je možnost kombinace metody imunizace pomocí dendritických buněk a dalších metod, jako jsou například chemoterapie nebo radioterapie. Všechny tyto faktory zvyšují šance na uzdravení pacienta [32].



Obr. 6: Průběh vytváření vlastní vakcíny imunizovaných dendritických buněk [56]

### **4.3 Výzkumy vakcín z imunizovaných dendritických buněk**

První imunoterapií, která byla oficiálně schválena U.S. FDA (Food And Drug Administration Of United States), je vakcína Provenge (Sipuleucel-T). Jedná se o vakcínu proti rakovině prostaty v pokročilém stádiu. Fáze III. byla testována na 512 pacientech. Do testů byly zařazeny i placebo, a to v poměru 2:1. 341 pacientů dostávalo intravenózně po dobu 2 týdnů v třech dávkách Sipuleucel-T a 171 pacientů pouze placebo. Sledovaly se hladiny PSA a laktát dehydrogenázy. Výsledky u skupiny, které byla poskytnuta vakcína, se projevíly redukcí riziku smrti o 22 %, což znamenalo prodloužení života v průměru o 4,1 měsíce (z 21,7 měsíce na 25,8 měsíce). Pravděpodobnost přežití 36 měsíců u léčené skupiny byla 31,7 %, místo 23 % u skupiny s placebem. U skupiny s Sipuleucel-T se vyskytovaly mírné vedlejší účinky, jako například bolest hlavy, husí kůže, teplota. [33]

V současné době se vývoji vakcín pro imunizaci dendritickými buňkami zabývá hned několik studií v rámci několika různých organizací. Jednou z nich je mezinárodní biotechnologická společnost Sotio a.s. se sídlem v Praze. Zabývají se jak preklinickou přípravou, tak i klinickým využitím DC v boji proti nádorovým onemocněním. Využívají vlastní léčivý přípravek DCVAC, který právě funguje na základě aktivní buněčné imunoterapie [50].

### **4.4 Klinické testy vakcín z imunizovaných dendritických buněk**

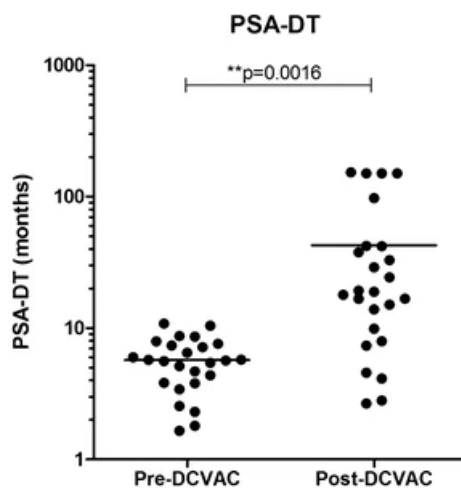
Mezi lety 1995 a 2004 proběhlo několik klinických testů ve fázi 1 i 2. Ve fázi 2 se testoval účinek autologních dendritických buněk imunizovaných pomocí nádorových antigenů k vyvolání odpovědi T-buněk. Výsledky byly přívětivé, avšak nebyly 100%. Výsledky se projevíly především u melanomů a nádorů prostaty [34, 35, 36]. Na ty se poté biotechnologické firmy zaměřily.

V roce 2006 ve Fakultní nemocnici v Brně na oddělení klinické hematologie odstartovala II. fáze výzkumu pro použití dendritických buněk proti mnohočetnému myelomu. Do testování byli zařazeni 4 pacienti, kteří dostávali vakcínu složenou z dendritických buněk a monoklonálních imunoglobulinů, a to 6 dávek v průběhu jednoho měsíce. Imunitní odpověď se projevíla u tří pacientů ze čtyř. Měřila se hladina monoklonálních imunoglobulinů v séru. Koncentrace monoklonálních imunoglobulinů se měřila metodou ELISpot a hodnoty kolísaly v průběhu celého roku,

ale nikdy nepřekročily 25% rozmezí pro minimální klinickou odpověď. Pacienti během testování nepociťovali žádné vedlejší účinky. [37]

Aktuálně společnost Sotio vede výzkumy na 3 konkrétní druhy nádorových onemocnění. Jedná se o DCVAC/PCa pro pacienty s karcinomem prostaty, DCVAC/OvCa pro pacientky s karcinomem vaječníku a DCVAC/LuCa pro pacienty s karcinomem plic.

V roce 2009 bylo odstartováno klinické testování DCVAC/PCa ve fázi I/II. Testy se prováděly od 2010 do 2014 na 27 let pacientech (ve věku od 47-77) se zvýšeným PSA (Prostate-Specific Antigen), který indikuje nádorové onemocnění prostaty. Všichni pacienti se zvýšeným PSA podstoupili léčbu pomocí DCVAC/PCa. Zde se jednalo o dendritické buňky imunizované usmrcenými LNCaP, což jsou lidské androgen senzitivní buňky adenokarcinomu prostaty. U 12 pacientů ve vyskytla příznivá odezva, která vedla se snížení hladin PSA bez přítomnosti vedlejších účinků. Ti pokračovali do další fáze testování. Cílem této studie bylo zjistit bezpečnost a stanovit PSADT (PSA Doubling Time), což je čas, za který se zvýší hodnota PSA na dvojnásobek. Medián PSADT se u všech léčených pacientů zvýšil z 5,67 měsíce na 18,85 měsíce po 12 měsíční léčbě. 12 pacientů, kteří pokračovali do dalších fází testů se medián zvýšil až na 58 měsíců a zůstal stabilní v průběhu celých testů. [38]



Obr. 7: Hodnoty času zdvojení prostatického specifického antigenu před (vlevo) a po (vpravo) léčbě pomocí DCVAC/PCa [57]

V dalších letech pokračovaly klinické testy ve II. fázi u pacientů s melanomy. Testováno bylo 39 pacientů s pokročilými melanomy. Byli léčeni kombinovanou léčbou imunizovaných dendritických buněk a CTLA-4 blokádou (cytotoxický T lymfocytární antigen 4). Celkem u osmi pacientů došlo k úplné terapeutické odpovědi a u sedmi k částečné terapeutické odpovědi. Tato kombinace, tedy využití imunizovaných DC a CTLA-4 blokády, se jeví jako slibný postup při budoucím snažení v boji proti metastazujícím melanomům [39].

Produkt DCVAC/PCa je autologní imunoterapie momentálně testována ve III. fázi klinického hodnocení (studie s názvem VIABLE - ActiVe ImmunotherApy Using Dendritic Cell-Based Treatment For Late Stage ProstatE Cancer), zaměřeného na pacienty s metastatickým kastročně-rezistenčním karcinomem prostaty (mCRPC) a v několika studiích fáze II určených pacientům s různým stádiem karcinomu prostaty. Fáze III klinického hodnocení zaměřeného na pacienty s mCRPC byla zahájena 2.6.2014 a skončila 23.3.2020. Do této studie bylo zapojeno 1182 pacientů trpících karcinomem prostaty z 21 evropských zemí a USA. Cílem studie bylo dokázat účinnost DCVAC/PCa v kombinaci se standardní chemoterapeutickou léčbou docetaxelem a prednisonem. Z této studie doposud nebyly zveřejněny výsledky [51].

Další možností, která se používá ke zvýšení protinádorové imunity, je využití různých maturačních stimulátorů DC. Z několika studií vyplývá, že při maturaci DC spolu s anti-CD40, IL-12 a IL-18, dochází k vyšší stimulaci protinádorové odpovědi, což může zvyšovat účinek takto připravených protinádorových vakcín [40].

## 5 Závěr

Využití autoprotilátek k diagnostice různých stádií nádorových onemocnění se v průběhu let posouvá značně dopředu. S čím dál častějším výskytem nádorových onemocnění v moderní době jsou veškeré diagnostické postupy v boji proti nádorovým onemocněním vítány. Jsou odhalovány další a další specifické autoprotilátky proti konkrétním druhům nádorových onemocnění, přesněji tedy proti jejich TSA nebo TAA. Jejich spolehlivost není 100%, kvůli početným mechanismům úniku nádorových buněk, které je znemožňují rozeznat, ale určitou váhu v diagnostice již dneska mají a určitě dál poroste. Klinické využití protilátek je už dneska zavedeno v praxi. Přípravek Herceptin s účinnou látkou Trastuzumab, což je monoklonální protilátka, která se selektivně váže na extracelulární doménu receptoru 2 pro lidský epidermální růstový faktor (HER2). Dnes se využívá i jiných způsobů, jak podpořit protinádorovou imunitu. Jedním z nejlepších způsobů dnešní doby je využití vakcín, které se v laboratořích připravují imunizací dendritických buněk. Výhodou této vakcíny je, že se vytváří z buněk pacienta a je tedy připravená přímo pro něj. Princip je poměrně jednoduchý a kopíruje děje, které se v těle odehrávají běžně. Přípravou a podáním takovéto vakcíny se předchází situaci, kdy imunitní systém pacienta není schopný rozlišit nádorové buňky. Při imunizaci dendritické buňky velkým spektrem nádorových antigenů se zvyšuje šance na odhalení a následnou eliminaci nádorových buněk. V současné době je na trhu jediná oficiálně uznaná takto připravovaná vakcína. Jedná se o vakcínu Provenge, která má výborné výsledky v boji proti rakovině prostaty. I na území České republiky máme výsledky v této oblasti. Společnost Sotio v této době dokončuje III. fázi klinických testů přípravku DCVAC/PCa, která bude také sloužit pro léčbu rakoviny prostaty. Zároveň vyvíjí přípravky pro léčbu karcinomu vaječníků DCVAC/OvCa a pro léčbu rakoviny plic DCVAC/LuCa. Tyto dva přípravky jsou v II. fázi klinických testů.

Všechny tyto metody boje s nádorovými buňkami však stále nejsou natolik účinné, aby se dali aplikovat samostatně. Proto se léčby kombinují s už dobře známými radioterapiemi a chemoterapiemi. Těmito kombinacemi je však dosaženo maximálního účinku, který byl už v mnoha studiích prokázán.

## 6 Zdroje:

1. Metz M, et al. "Mast Cells Can Enhance Resistance to Snake and Honeybee Venoms." *Science*, vol. 313, no. 5786, 2006, pp. 526–530. *JSTOR*, [www.jstor.org/stable/3846818](http://www.jstor.org/stable/3846818). Accessed 28 June 2020.
2. Trojan S, Langmeier M, Hrachovina V, Kittnar O, Koudelková J, Kuthan V, Mareš J, Marešová D, Mourek J, Pokorný J, Sedláček J, Schreiber M, Trávníčková E, Wunsch Z. (1996) *Lékařská fyziologie*. 2 end. Praha. Grada Publishing.
3. Hořejší V. *Onkologická revue: Supplementum/Imunoterapie* [online]. 2019, 6 (1-4), Praha [cit. 2020-07-14]. ISSN 2694-7722.
4. Tomkiel JE, Alansari H, Tang N, et al. Autoimmunity to the M(r) 32,000 subunit of replication protein A in breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2002;8(3):752-758.
5. Crawford LV, Pim DC, Bulbrook RD. Detection of antibodies against the cellular protein p53 in sera from patients with breast cancer. *Int J Cancer*. 1982;30(4):403-408. doi:10.1002/ijc.2910300404.
6. Caron de Fromentel C, May-Levin F, Mouriesse H, Lemerle J, Chandrasekaran K, May P. Presence of circulating antibodies against cellular protein p53 in a notable proportion of children with B-cell lymphoma. *Int J Cancer*. 1987;39(2):185-189. doi:10.1002/ijc.2910390211.
7. Soussi T. p53 Antibodies in the sera of patients with various types of cancer: a review. *Cancer Res*. 2000;60(7):1777-1788.
8. Brändlein S, et al. 'Human Monoclonal IgM Antibodies with Apoptotic Activity Isolated from Cancer Patients'. 1 Jan. 2002 : 107 – 119.
9. Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res*. 1987;47(4):936-942.
10. Toubi E, Shoenfeld Y. "Protective autoimmunity in cancer (Review)". *Oncology Reports* 17, no. 1 (2007): 245-251. <https://doi.org/10.3892/or.17.1.245>.
11. Mensdorff-Pouilly von S, Verstraeten A.A, Kenemans P, Snijdwint F.G. M, Kok A, Van Kamp G.J, Paul M.A, Van Diest P.J, Meijer S, Hilgers J. *Journal of Clinical Oncology* 2000 18:3, 574-574.
12. Atalay C, Atalay G, Yilmaz KB, Altinok M. The role of anti-CENP-B and anti-SS-B antibodies in breast cancer. *Neoplasma*. 2005;52(1):32-35.



13. Yagihashi A, Asanuma K, Kobayashi D, et al. Detection of autoantibodies to livin and survivin in Sera from lung cancer patients. *Lung Cancer*. 2005;48(2):217-221. doi:10.1016/j.lungcan.2004.11.002.
14. Wirtz PW, Willcox N, van der Slik AR, et al. HLA and smoking in prediction and prognosis of small cell lung cancer in autoimmune Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *J Neuroimmunol*. 2005;159(1-2):230-237.
15. Gorges R, Maniecki M, Jentzen W, et al. Development and clinical impact of thyroglobulin antibodies in patients with differentiated thyroid carcinoma during the first 3 years after thyroidectomy. *Eur J Endocrinol* 153: 49-55, 2005.
16. Reipert B.M, Tanneberger S, Pannetta A, et al. Increase in autoantibodies against Fas (CD95) during carcinogenesis in the human colon: a hope for the immunoprevention of cancer?. *Cancer Immunol Immunother*. 2005;54(10):1038-1042. doi:10.1007/s00262-005-0679-0.
17. Torchilin V.P, Iakoubov L.Z, Estrov Z. Antinuclear autoantibodies as potential antineoplastic agents. *Trends Immunol*. 2001;22(8):424-427. doi:10.1016/s1471-4906(01)01984-6.
18. Lv S, Zhang J, Wu J, Zheng X, Chu Y, Xiong S. Origin and anti-tumor effects of anti-dsDNA autoantibodies in cancer patients and tumor-bearing mice. *Immunol Lett*. 2005;99(2):217-227. doi:10.1016/j.imlet.2005.03.019.
19. Wang E.S, Teruya-Feldstein J, Wu Y, Zhu Z, Hicklin DJ, Moore MA. Targeting autocrine and paracrine VEGF receptor pathways inhibits human lymphoma xenografts in vivo. *Blood*. 2004;104(9):2893-2902. doi:10.1182/blood-2004-01-0226.
20. Lang J, Ma K, Guo J, Zhang J, Wang Q, Sun H. Clinical significance of elevated antinuclear antibodies in patients with diffuse large B-cell lymphoma: A single center study. *J Cancer Res Ther*. 2018;14(1):213-219. doi:10.4103/0973-1482.183559.
21. Gergely L, Dankó A, Csípő I, et al. Antibodies against extractable nuclear antigen in non-Hodgkin lymphoma patients. *Scand J Immunol*. 2005;61(4):343-346. doi:10.1111/j.1365-3083.2005.01567.x.
22. Karino K, Fujieda Y, Kawamura T, et al. Anti-TIF1 $\gamma$  antibody predicted malignancy of thymic tumor with dermatomyositis as an "autoimmune tumor marker": A case report. *Medicine (Baltimore)*. 2018;97(49):e13563. doi:10.1097/MD.00000000000013563.

23. Hong Y, Zhang B, Jia JD, Huang J. Identification of autoantibody based serological marker for early diagnosis of hepatocellular carcinoma by serological proteome analysis combined with protein microarray. *Hepatology* 2013;58(Suppl. 1).
24. Menard S, Casalini P, Campiglio M. Role of HER2/neu in tumor progression and therapy. *Cell Mol Life Sci* 2004;61:2965–78.
25. Goodell V, Waisman J, Salazar JG. Level of HER-2/neu protein expression in breast cancer may affect the development of endogenous HER-2/neu-specific immunity. *Mol Cancer Ther* 2008;7:449–54.
26. Baselga J, Norton L, Albanell J, Kim YM, Mendelsohn J. Recombinant humanized anti-HER2 antibody (Herceptin) enhances the antitumor activity of paclitaxel and doxorubicin against HER2/neu overexpressing human breast cancer xenografts [published correction appears in *Cancer Res* 1999 Apr 15;59(8):2020]. *Cancer Res.* 1998;58(13):2825-2831.
27. Mukherji B, Chakraborty NG, Yamasaki S, et al. Induction of antigen-specific cytolytic T cells in situ in human melanoma by immunization with synthetic peptide-pulsed autologous antigen presenting cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(17):8078-8082. doi:10.1073/pnas.92.17.8078.
28. Peng G, Guo Z, Kiniwa Y, et al. Toll-like receptor 8-mediated reversal of CD4+ regulatory T cell function. *Science.* 2005;309(5739):1380-1384. doi:10.1126/science.1113401.
29. Maker A.V, Attia P, Rosenberg S.A. Analysis of the cellular mechanism of antitumor responses and autoimmunity in patients treated with CTLA-4 blockade. *J Immunol.* 2005;175(11):7746-7754. doi:10.4049/jimmunol.175.11.7746.
30. Terabe M, Matsui S, Park J.M, et al. Transforming growth factor-beta production and myeloid cells are an effector mechanism through which CD1d-restricted T cells block cytotoxic T lymphocyte-mediated tumor immunosurveillance: abrogation prevents tumor recurrence. *J Exp Med.* 2003;198(11):1741-1752. doi:10.1084/jem.20022227.
31. Chanmee T, Ontong P, Konno K, et al. Tumor-associated macrophages as major players in the tumor microenvironment. *Cancers (Basel)* 2014;6:1670–1690.
32. Sabado R.L, Balan S, Bhardwaj N. Dendritic cell-based immunotherapy. *Cell Res.* 2017;27(1):74-95. doi:10.1038/cr.2016.157.

33. Kantoff P.W, Higano C.S, Shore N.D, et al. Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *N Engl J Med*. 2010;363(5):411-422. doi:10.1056/NEJMoa1001294.
34. Mukherji B, Chakraborty N.G, Yamasaki S, et al. Induction of antigen-specific cytolytic T cells in situ in human melanoma by immunization with synthetic peptide-pulsed autologous antigen presenting cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(17):8078-8082. doi:10.1073/pnas.92.17.8078.
35. Nestle F.O, Alijagic S, Gilliet M, et al. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med*. 1998;4(3):328-332. doi:10.1038/nm0398-328.
36. Beer T.M, Bernstein G.T, Corman J.M, et al. Randomized trial of autologous cellular immunotherapy with sipuleucel-T in androgen-dependent prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2011;17(13):4558-4567. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-3223.
37. Ocadlíková D, Zahradová L, Kovárová L, et al. [The preparation of anticancer vaccine for patients with multiple myeloma on the base of monoclonal immunoglobulin loaded dendritic cells] *Klinicka Onkologie : Casopis Ceske a Slovenske Onkologicke Spolecnosti*. 2009 ;22(2):67-72.
38. Fucikova J, Podrazil M, Jarolim L, et al. Phase I/II trial of dendritic cell-based active cellular immunotherapy with DCVAC/PCa in patients with rising PSA after primary prostatectomy or salvage radiotherapy for the treatment of prostate cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 2018;67(1):89-100. doi:10.1007/s00262-017-2068-x.
39. Wilgenhof S, Corthals J, Heirman C, et al. Phase II Study of Autologous Monocyte-Derived mRNA Electroporated Dendritic Cells (TriMixDC-MEL) Plus Ipilimumab in Patients With Pretreated Advanced Melanoma. *J Clin Oncol*. 2016;34(12):1330-1338. doi:10.1200/JCO.2015.63.4121.
40. Balkow S, Loser K, Krummen M, et al. Dendritic cell activation by combined exposure to anti-CD40 plus interleukin (IL)-12 and IL-18 efficiently stimulates anti-tumor immunity. *Exp Dermatol*. 2009;18(1):78-87. doi:10.1111/j.1600-0625.2008.00800.x.
41. Schreiber R.D, Old L.J, Smyth M.J. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*. 2011;331(6024):1565-1570. doi:10.1126/science.1203486.

42. Jäger E, Ringhoffer M, Altmannsberger M, et al. Immunoselection in vivo: independent loss of MHC class I and melanocyte differentiation antigen expression in metastatic melanoma. *Int J Cancer*. 1997;71(2):142-147. doi:10.1002/(sici)1097-0215(19970410)71:2<142::aid-ijc3>3.0.co;2-0.
43. Uyttenhove C, Pilotte L, Théate I, et al. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat Med*. 2003;9(10):1269-1274. doi:10.1038/nm934.
44. Italiani P, Boraschi D. From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. *Front Immunol*. 2014;5:514. Published 2014 Oct 17. doi:10.3389/fimmu.2014.00514.
45. Clynes R, Takechi Y, Moroi Y, Houghton A, Ravetch JV. Fc receptors are required in passive and active immunity to melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(2):652-656. doi:10.1073/pnas.95.2.652.
46. Oh D.S, Lee H.K. Autophagy protein ATG5 regulates CD36 expression and anti-tumor MHC class II antigen presentation in dendritic cells. *Autophagy*. 2019;15(12):2091-2106. doi:10.1080/15548627.2019.1596493.
47. Hořejší V, Bartůňková J, Brdička T, Špíšek R. *Základy imunologie*. 6., aktualizované vydání. V Praze: Stanislav Juhaňák - Triton, 2017. ISBN 978-80-7553-250-3.
48. Posch W, Lass-Flörl C, Wilflingseder D. Generation of Human Monocyte-derived Dendritic Cells from Whole Blood. *J Vis Exp*. 2016;(118):54968. Published 2016 Dec 24. doi:10.3791/54968.
49. Constantino J, Gomes C, Falcão A, Neves BM, Cruz M.T. Dendritic cell-based immunotherapy: a basic review and recent advances. *Immunol Res*. 2017;65(4):798-810. doi:10.1007/s12026-017-8931-1.
50. Cordes L.M, Gulley J.L, Madan R.A. The evolving role of immunotherapy in prostate cancer. *Curr Opin Oncol*. 2016;28(3):232-240. doi:10.1097/CCO.0000000000000281.
51. Rexer H. Studie zur Therapie beim metastasierten kastrationsresistenten Prostatakarzinom : Parallelgruppendesign zur Analyse der Wirksamkeit und Sicherheit von DCVAC/PCa vs. Placebo bei Männern mit metastasiertem kastrationsresistentem Prostatakarzinom und Eignung für die Erstlinienchemotherapie (VIABLE) - AUO-Studie AP 78/13 [Study and therapy of metastatic castration-resistant prostate cancer: A randomized, double blind,

- multicenter, parallel-group, phase III study to evaluate efficacy and safety of DCVAC/PCa versus placebo in men with metastatic castration resistant prostate cancer eligible for first line chemotherapy (VIABLE) - AUO study AP 78/13]. *Urologe A*. 2015;54(4):555-557. doi:10.1007/s00120-015-3801-8.
52. Obr. 1: Hořejší V, Bartůňková J. (2005) *Základy imunologie*. 3 edn. Praha: TRITON.
  53. Obr. 2,3: Brändlein, S, et al. 'Human Monoclonal IgM Antibodies with Apoptotic Activity Isolated from Cancer Patients'. 1 Jan. 2002 : 107 – 119.
  54. Obr. 4: Reipert, B.M., Tanneberger, S., Pannetta, A. *et al.* Increase in autoantibodies against Fas (CD95) during carcinogenesis in the human colon: a hope for the immunoprevention of cancer?. *Cancer Immunol Immunother* 54, 1038–1042 (2005). <https://doi.org/10.1007/s00262-005-0679-0>.
  55. Obr. 5: JÍLEK P. *Základy imunologie*. 2., přeprac. vyd. Praha: Anyway, 2008. ISBN 9788025424223.
  56. Obr. 6: Fucikova J, Palova-Jelinkova L, Bartunkova J, Spisek R. Induction of Tolerance and Immunity by Dendritic Cells: Mechanisms and Clinical Applications. *Front Immunol*. 2019;10:2393. Published 2019 Oct 29. doi:10.3389/fimmu.2019.02393.
  57. Obr. 7: Fucikova J, Podrazil M, Jarolim L, et al. Phase I/II trial of dendritic cell-based active cellular immunotherapy with DCVAC/PCa in patients with rising PSA after primary prostatectomy or salvage radiotherapy for the treatment of prostate cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 2018;67(1):89-100. doi:10.1007/s00262-017-2068-x.
  58. Tab. 1: Hořejší V, Bartůňková J. (2005) *Základy imunologie*. 3 edn. Praha: TRITON.
  59. Tab. 2,3: Brändlein S, et al. 'Human Monoclonal IgM Antibodies with Apoptotic Activity Isolated from Cancer Patients'. 1 Jan. 2002 : 107 – 119.
  60. Tab. 4: Toubi E, Shoenfeld Y. "Protective autoimmunity in cancer (Review)". *Oncology Reports* 17, no. 1 (2007): 245-251. <https://doi.org/10.3892/or.17.1.245>.