

MASARYKOVA UNIVERZITA
Lékařská fakulta
MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV

Imunobiologické aspekty nádorových onemocnění

HABILITAČNÍ PRÁCE

- komentovaný soubor publikací -

Brno 2016

RNDr. Lenka Zdražilová Dubská, Ph.D.

Poděkování

Děkuji všem svým kolegům, spolupracovníkům a studentům, bez nichž by výsledky a poznatky, jež jsou podkladem pro tuto práci nevznikly.

Děkuji panu doc. MUDr. Daliborovi Valíkovi, Ph.D. za vytvoření výborných pracovních podmínek pro klinickou i výzkumnou činnost a za odborné vedení, cenné rady a inspiraci.

Děkuji svému muži Václavovi a dceři Julii za trpělivost, kterou s habilitační prací měli.

OBSAH

Abstrakt	5
Abstract	6
Předmluva	7
Úvod – východiska a koncepce habilitační práce	11
Výzkumné zájmy	11
Metodika	11
Cíle habilitační práce	12
Maligní onemocnění – buněčná a molekulární úroveň	13
Výstup 1: Gen KRAS v personalizaci léčby pacientů s metastatickým kolorektálním karcinomem	15
Maligní onemocnění – aspekty hostitele	19
Genotyp	20
Výstup 2: Farmakogenotyp TPMT a DPD: Toxicita a efekt protinádorové léčby	21
Endokrinologický status	24
Výstup 3: Hypovitaminóza D má sezonní variabilitu a vztah k horší prognóze metastatického kolorektálního karcinomu	25
Věk	28
Životní styl	29
Komorbidity	30
Medikace	32
Výstup 4: Antikoagulační léčba a terapeutická inhibice agregace krevních destiček ve vztahu k prevenci a léčbě nádorových onemocnění	32
Infekce	34
Výstup 5: Infekce HCV v etiopatogenezi hepatocelulárního karcinomu	34
Mikrobiom	35
Nutriční stav	36
Imunitní systém	37
Imunobiologie solidních malignit	39
Imunitní odpověď - základní principy	39
Přirozená imunitní odpověď	39
Výstup 6: Exprese CD64 na neutrofilech jako marker sepse	40
Adaptivní imunitní odpověď	41
Nádorová imunologie	44
Nádorové antigeny	44
Výstup 7: Nádorové antigeny v klinické praxi	45
Nádorová imunoeditace – koncept 3E	47
Eliminace nádorových buněk a nástroje protinádorové imunity	47
Výstup 8: Apoptóza indukovaná death receptory jako nástroj imunitních efektorů	50
Výstup 9: Zvýšený počet cirkulujících NKT-like buněk u pacientů se solidními nádory	51
Výstup 10: Cirkulující gammadelta T-lymfocyty u pacientů s maligním melanomem a karcinomem prsu: pilotní data	53
Rovnováha a mechanismy odolnosti nádorů vůči imunitnímu systému	55

Únik imunitnímu dozoru a mechanismy imunosuprese navozené nádorem.....	56
Výstup 11: Myeloidní supresorové buňky u pacientek s karcinomem prsu	58
Protinádorová imunoterapie.....	61
Monoklonální protilátky	62
Výstup 12: Paradoxní efekt trastuzumabu na TRAILem indukovanou apoptózu nádorových buněk.....	63
Protinádorové vakcíny	66
Výstup 13: Přirozené protilátky proti alfa(1,3)-galaktosylovému epitopu.....	66
Výstup 14: Protinádorová terapie na bázi dendritických buněk produkujících IL-12	70
Mikro- a makroprostředí nádoru: angiogeneze, endotel a krevní destičky	75
Nádorová angiogeneze – základní principy.....	75
Protinádorová terapie cílená na nádorovou angiogenezi	77
Výstup 15: Bevacizumab a chemoterapie v 1. linii léčby metastatického kolorektálního karcinomu v kontextu mutace genu KRAS.....	78
Hypoxie a angiogeneze v mikroprostředí nádoru a v cirkulaci.....	83
Výstup 16: Cirkulující biomarkery nádorové angiogeneze	83
Krevní destičky: Nádorová angiogeneze a progresse tumoru	85
Výstup 17: Krevní destičky jako systémová komponenta patogeneze solidních nádorů	86
Mikro- a makroprostředí nádoru: klinické aspekty	89
Shrnutí	101
Biomarkery	101
Imunobiologie solidních malignit v kontextu protinádorové léčby.....	101
Seznam obrázků	106
Seznam zkratk.....	108
Reference	111

Nové poznatky v onkologickém výzkumu vedou ke zlepšování a zpřesňování diagnostických metod maligních onemocnění a k vývoji nových léčebných směrů, ať už jsou to nová léčiva či kombinace již známých terapeutických postupů. Díky těmto novým poznatkům již dnes víme, že nádor zdaleka není jen homogenní populací maligních buněk. Ve skutečnosti bývá populace nádorových buněk významně heterogenní díky selekčnímu tlaku mikroprostředí nádoru, kdy podstatnou komponentu tumoru tvoří nádorové stroma sestávající především z vaskulatury, leukocytárního infiltrátu, fibroblastů a extracelulární matrix. Malignita zásadním způsobem interaguje s organizmem hostitele; systémové komponenty organismu ovlivňují vznik a progresi maligních onemocnění na jednu stranu a na druhou stranu malignita ovlivňuje zprvu subklinicky a později s postupujícím onemocněním významně klinicky organismus pacienta. Parametry nádorového mikroprostředí a prostředí hostitelského organismu se ukazují být zásadní z hlediska vzniku a léčby většiny sporadických maligních onemocnění a jsou spojeny s funkcí imunitního systému navozením efektivní protinádorové imunitní odpovědi hostitele. Faktory ovlivňující protinádorovou imunitní odpověď se týkají i/ hostitelského organismu jako celku a ii/ nádorové imunoeditace a funkce imunitních efektorů a regulátorů a s tím související iii/ funkce a kompozice nádorového stroma včetně parametrů angiogeneze regulovaných lokálně a systémově s vývojem v čase.

Habilitační práce komentuje a diskutuje v kontextu aktuálních poznatků 28 publikovaných prací autorky. Jedná se o 25 publikací s originálními daty (14) nebo přehledové články (11) *in extenso*, 2 abstrakta zvaných přednášek a 1 doporučení odborných společností ČLS JEP. Z uvedených 28 publikací bylo 14 zveřejněno v časopisech s IF; u 16 publikací je předkladatelka prvním a/nebo korespondujícím autorem.

Cílem habilitační práce je prezentovat nádorové onemocnění z hlediska vztahu hostitel/nádor, konkrétně interakcí maligních buněk a hostitelského organismu ve smyslu i/ klinicky využitelných biomarkerů maligních onemocnění a ii/ integrace poznatků a zkušeností získané během výzkumné a klinické práce s aktuálním stavem poznání v pohledu na nádorové onemocnění se zaměřením na roli imunitního systému u solidních malignit.

Immunobiological aspects of solid cancer

Expanding knowledge from cancer research leads to improvement and refining of biomarker application in cancer diagnostics and to the development of novel therapeutic approaches, in terms of both, novel therapeutic drugs and novel anticancer combination therapy. Cancer tumour is not a homogenous population of malignant cells. In fact, tumours are highly heterogenous due to selection pressure of tumour microenvironment which represents a substantial part of the tumour consisting of vasculature, white blood cells, fibroblasts and extracellular matrix. Tumour–host interactions and their mutual influence is fundamental part of malignant diseases. Systemic constituents of the host body modulate carcinogenesis and tumour progression, on one hand and on the other, malignant tumour affects subclinically and subsequently clinically host organism. The composition of tumour microenvironment and conditions of host macroenvironment are considerably important for tumour development and progression of majority of sporadic cancers and are associated with immune system function modulating effective anticancer immune surveillance. Factors associated with effective anticancer immune response are determined i/ by conditions of host body, ii/ by the cancer immunoediting process and the function of immune effectors and regulators, and consequently iii/ by components and function of tumour stroma including angiogenic factors (humoral and cellular) regulated on local and systemic level that evolve in time.

The habilitation thesis consists of 28 published papers (14 with original data full papers, 11 reviews, 2 abstracts, 1 guideline) commented and discussed in the context of current knowledge. Fourteen papers were published in scientific journals with impact factor. The author of the habilitation thesis is the first and/or the corresponding author of 16 presented papers.

The aim of the habilitation thesis is to present malignant disease in light of tumour-host interaction, specifically in terms i/ of clinically applicable biomarkers of cancer, and of ii/ integration of the original findings and gained experience with current knowledge on the immunobiology of solid cancers.

Habilitační práci jsem sestavila jako komentovaný soubor publikovaných prací. Práce představuje **integrativní pohled** biologa s klinickou zkušeností na solidní malignity z hlediska vztahu hostitel/nádor, konkrétně **interakcí maligních buněk a „hostitelského organismu“**, a dále na aspekty související s imunobiologií nádoru.

Poznatky, které jsou v této práci prezentovány, vycházejí z mých výzkumných a klinických zkušeností a z akademického a klinického vzdělání, které shrnuji v podobě grafického CV na Schématu 1.

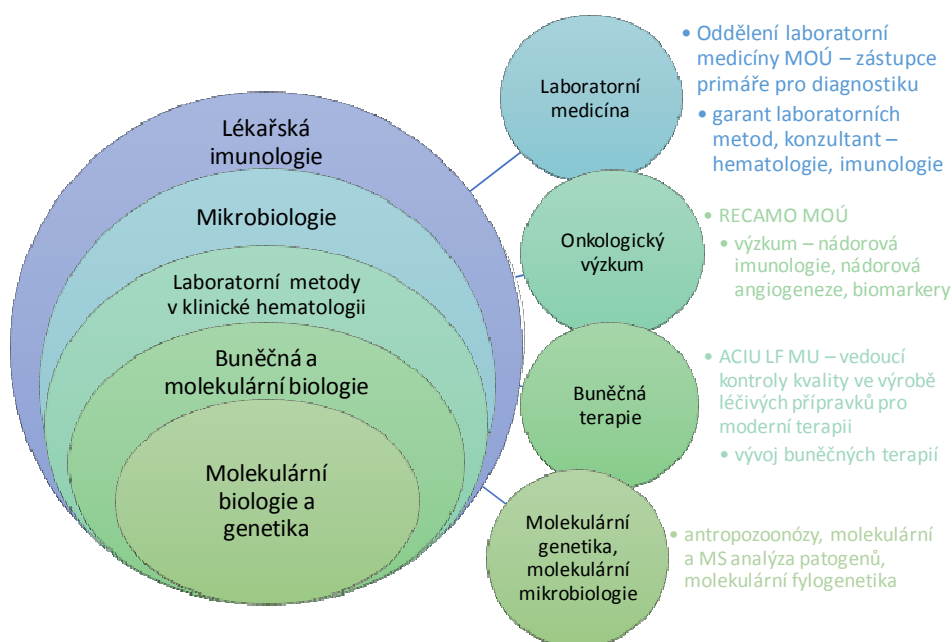


Schéma 1: **Oblasti vzdělání a výzkumných a klinických zkušeností autorky předložené habilitační práci.**

VLEVO – vzdělání i/ magisterské studium molekulární biologie a genetiky (PřF MU), ii/ postgraduální studium buněčné a molekulární biologie (PřF MU), iii/ atestace v laboratorních metodách v klinické hematologii (IPVZ), iv/ rigorózní řízení v oboru obecná biologie – mikrobiologie (PřF MU), v/ atestace v oboru lékařská imunologie (IPVZ).

VPRAVO – profesní klinické a akademické aktivity, ze kterých vzešly poznatky a publikace, jež jsou součástí habilitační práce.

Od dob magisterského a postgraduálního studia jsem se zabývala výzkumem apoptózy a to v rovině detekce apoptózy ve tkáních a tkáňových kulturách na úrovni single-cell analýzy (Dubska et al., 2002; Chlastakova et al., 2012; Matalova et al., 2010) a následně regulací apoptózy maligních buněk (Dubska et al., 2005; Holcakova et al., 2008; Roubalova et al., 2010). Paralelně s výzkumnou a posléze diagnostickou činností v onkologii jsem působila jako odborný asistent na VFU Brno, kde se moje výzkumné aktivity týkaly molekulární genetiky, konkrétně částečně populační genetiky (Honnen et al., 2010; Literak et al., 2007), ale především detekce a analýz patogenů (zoonóz a antropozoonóz) (Dubska et al., 2011a; Dubska et al., 2009b; Dubska et al., 2012a; Hajduskova et al., 2016; Kulich et al., 2008; Literak et al., 2008; Siroky et al., 2014). Po ukončení doktorského studia jsem se začala zabývat laboratorní diagnostikou se zaměřením na péči o onkologického pacienta v propojení s aplikovaným výzkumem. V oblasti laboratorní medicíny (Matalova et al.,

2007) se věnují i/ laboratorní hematologii (Bacikova, 2015), odkud vzešel i můj zájem o úlohu destiček v nádorové angiogenezi a progresi maligních onemocnění (Bencsikova et al., 2014; Pilatova, 2010; Pilatova et al., 2013; Pilatova et al., 2012; Volejnikova, 2012); ii/ imunologii a imunologickým vyšetřením (Bacikova, 2010; Bencsikova et al., 2015; Cibulka et al., 2015; Dubska et al., 2009a; Foralova et al., 2009; Hamanova et al., 2014; Rihacek et al., 2015; Zdrzilova-Dubska et al., 2012) s přesahem do mikrobiologie v návaznosti na problematiku infekčních a septických stavů u imunokompromitovaných onkologických pacientů (Dolejska et al., 2012; Dubska et al., 2011b; Dubska et al., 2012b; Frostova, 2013) a iii/ diagnostickým, prediktivním a farmakogenetickým biomarkerům maligních onemocnění (Adam et al., 2009; Bencsikova et al., 2015; Demlova et al., 2014; Drabova et al., 2013; Dubska et al., 2011c; Jurankova, 2010; Karlsen et al., 2015; Kristina et al., 2009; Obermannova et al., 2014; Obermannova et al., 2015; Oslejskova et al., 2008; Plebani, 2012; Valik et al., 2011; Valik and Zdrzilova Dubska, 2015). V diagnostických a badatelských aktivitách spolupracuji mimo rámec své mateřské instituce tedy Masarykova onkologického ústavu převážně s Klinikou dětské onkologie LF MU a FN Brno a to v oblasti biologického efektu metronomické léčby (Bronisova et al., 2009; Sterba et al., 2010; Zapletalova et al., 2012) a recentně v oblasti výroby a klinického hodnocení protinádorové terapie na bázi dendritických buněk, kde jsem zúročila své zkušenosti v oblasti buněčné biologie, imunologických metod a také molekulární mikrobiologie.

V předložené habilitační práci se v úvodu krátce věnuji buněčnému pohledu na maligní onemocnění a podrobněji pak **faktorům a podmínkám hostitelského organismu**, které patogenezí a léčbu maligních onemocnění ovlivňují. Následuje kapitola zaměřená na **imunobiologii solidních malignit** a kapitola věnující se **nádorové angiogenezi**. Předposlední kapitola integruje a diskutuje dílčí poznatky z předcházejících kapitol a zasazuje je do klinického kontextu patogeneze a léčby maligních onemocnění. Poslední kapitola shrnuje prezentované a diskutované aspekty vztahu hostitel/nádor, konkrétně interakcí maligních buněk a „hostitelského organismu“ ve smyslu i/ **klinicky využitelných biomarkerů** a ii/ patofyziologie maligních onemocnění se zaměřením na aspekty související s **imunobiologií nádoru v kontextu vzniku a léčby maligních onemocnění**.

Práce je organizována jako text shrnující současné poznatky v tématické oblasti habilitační práce tj. přehledová část, do kterého je zasazeno **17 výstupů** = podkapitol, které se podrobněji zabývají specifickou oblastí a navazují na publikované výsledky (Schéma 2). V těchto výstupech jsou popsány a diskutovány hlavní výsledky a přínos dané práce. Publikované výsledky jsou přílohou za vlastním textem habilitační práce a jejich číslování je shodné s citací publikace uvedené v poznámce pod čarou.

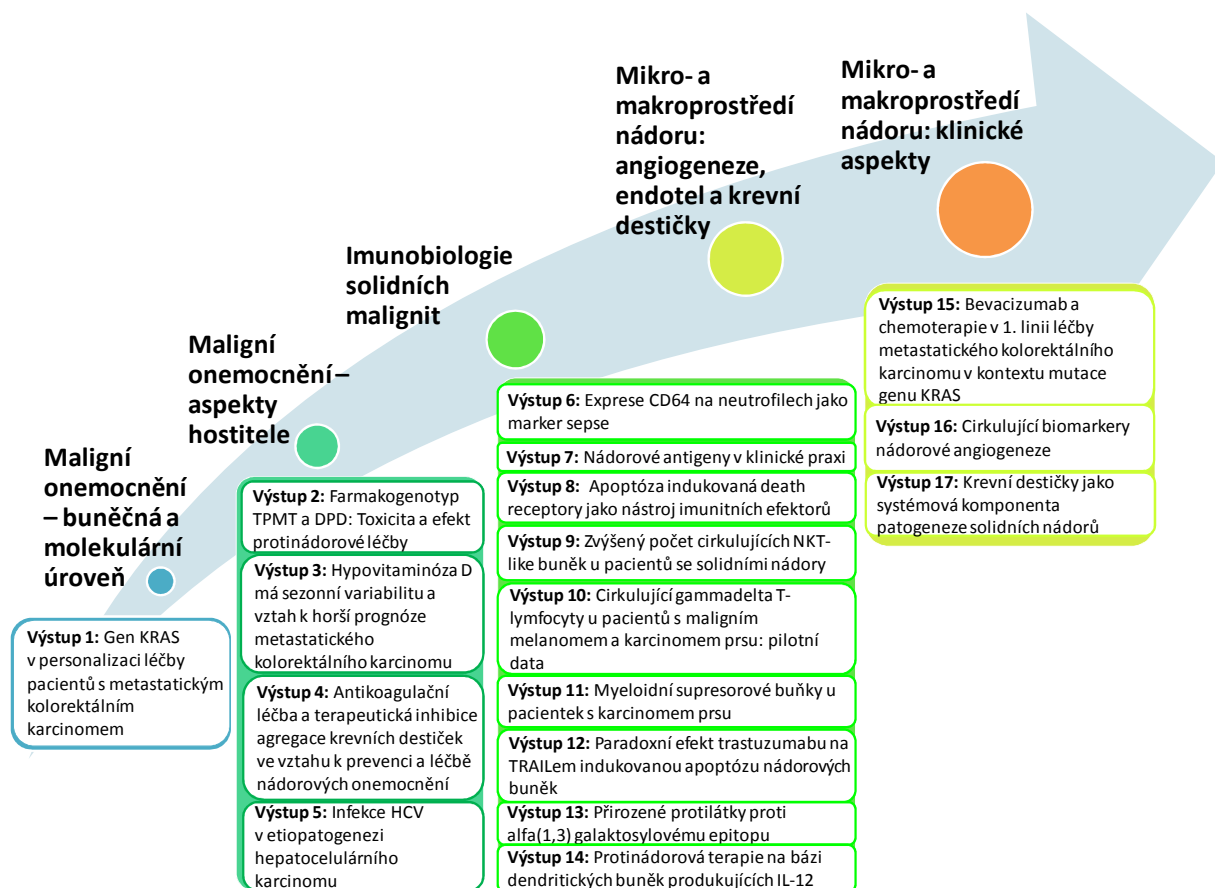


Schéma 2: **Organizace textu předložené habilitační práce.**

Napříč textem jsou prezentovány a diskutovány získané poznatky v oblasti interakcí maligních buněk a „hostitelského organismu“ ve smyslu i/ klinicky využitelných biomarkerů (prezentovány především v dílčích výstupech) a ii/ patofyziologie maligních onemocnění se zaměřením na aspekty související s imunobiologií nádoru v kontextu vzniku a léčby maligních onemocnění (interpretováno a diskutováno především v kapitole Mikro- a makroprostředí nádoru: klinické aspekty).

Nové poznatky v onkologickém výzkumu vedou k zlepšování zpřesňování diagnostických metod maligních onemocnění a k vývoji nových léčebných směrů, ať už jsou to nová léčiva či kombinace již známých terapeutických postupů. Díky těmto novým poznatkům již dnes víme, že nádor zdaleka není jen homogenní populací maligních buněk. Ve skutečnosti bývá populace nádorových buněk významně heterogenní díky selekčnímu tlaku mikroprostředí nádoru, kdy podstatnou komponentu tumoru tvoří **nádorové stroma** sestávající především z vaskulatury, leukocytárního infiltrátu, fibroblastů a extracelulární matrix. Malignita zásadním způsobem interaguje s organizmem hostitele; **systémové komponenty** organismu ovlivňují vznik a progresi maligních onemocnění na jednu stranu a na druhou stranu malignita ovlivňuje zprvu subklinicky a později s postupujícím onemocněním významně klinicky organismus pacienta.

Parametry nádorového mikroprostředí a hostitelského makroprostředí, které se ukazují být zásadní z hlediska vzniku a léčby většiny sporadických maligních onemocnění (především nádory trávicí soustavy, maligní melanom, karcinom plic, renální karcinom, gynekologické malignity) jsou spojeny s funkcí imunitního systému a navozením efektivní protinádorové imunitní odpovědi. Faktory ovlivňující protinádorovou imunitní odpověď se týkají i/ **systémových aspektů hostitelského organismu** a ii/ **nádorové imunoeditace** a funkce imunitních efektorů a regulátorů a s tím související iii/ funkce a kompozice **nádorového stroma** včetně parametrů angiogeneze regulované lokálně a systémově

VÝZKUMNÉ ZÁJMY

- **Biomarkery** maligních onemocnění pro diagnostické, prognostické, prediktivní a farmakogenetické aplikace.
- **Regulátory a efekторы imunitní odpovědi a nádorové angiogeneze** ve vztahu k rozvoji a léčbě maligních onemocnění, včetně vývoje, výroby a klinických hodnocení protinádorové imunoterapie.

METODIKA

Detailně je metodika použita při získání dílčích komentovaných výsledků popsána v metodické části jednotlivých publikací. Souhrnně lze metodiku použitu napříč publikacemi rozdělit do těchto okruhů:

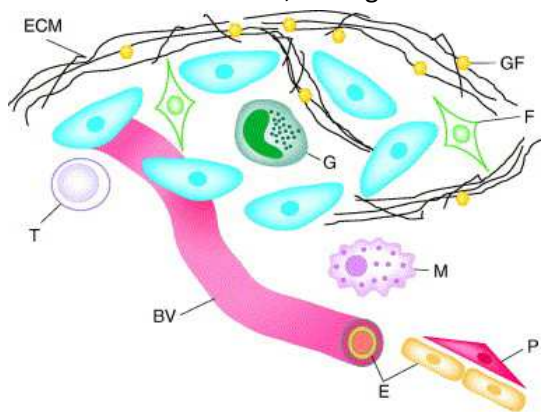
- Experiment – nádorové buněčné linie, kultivace *in vitro*, stanovení proteinové exprese (western blot, ELISA), stanovení buněčného cyklu, detekce apoptózy, analýza buněčných charakteristik spojená s jednotlivými kroky apoptotického procesu.
- Analytické metody vyšetření buněčných, solubilních, molekulárních endogenních a exogenních komponent lidské krve (imunoanalytické metody, průtoková cytometrie, hmotnostní spektrometrie, molekulární detekce, kvantitativní PCR, sekvenování).

- *Ex vivo* příprava buněčné terapie – personalizované protinádorové vakcíny z dendritických buněk, validace a stabilitní studie, kontrola kvality (kultivace, produkce cytokinů, imunofenotyp vstupního materiálu a dendritických buněk), molekulární detekce *Mycoplasma* spp.).
- Funkční testy – funkční parametry obsahu krevních destiček kvantifikované pomocí mobility endoteliálních buněk, funkční testy schopnosti dendritických buněk stimulovat T-lymfocyty ve formátu allo- a auto-MLR.
- Statistické metody – hodnocení analytických vlastností biomarkerů (senzitivita, specificita); analýza retrospektivních dat z registrů a databází ve vztahu k analytickým vlastnostem biomarkerů a ve vztahu ke klinickým parametrům, jako jsou parametry přežití.

CÍLE HABILITAČNÍ PRÁCE

- Prezentovat dílčí inovativní výsledky v oblasti **biomarkerů** maligních onemocnění.
- Integrovat své poznatky a zkušenosti získané během výzkumné a klinické práce s aktuálním stavem poznání v pohledu na nádorové onemocnění z hlediska hostitele a to především se zaměřením na **roli imunitního systému u solidních malignit**.

Organismus je tvořen mnoha buněčnými typy. Proces jejich růstu, proliferace a zániku je za fyziologických podmínek přísně regulován na základě potřeb organismu. Staré či poškozené buňky jsou odstraněny a nahrazeny buňkami novými. V případě deregulace tohoto systému v důsledku změn na úrovni DNA může dojít k nekontrolovatelnému dělení těchto buněk a k vývoji nádoru. Nádor je tedy geneticky podmíněná abnormální tkáň, která se vyznačuje neregulovaným růstem s klonálním charakterem, a v organismu nemá fyziologickou funkci.



Obrázek 1: **Nádorová tkáň se skládá z nádorových buněk a nádorového stroma.**

ECM: extracelulární matrix, GF: růstové faktory, T: T-lymfocyt, G: granulocyt, BV: krevní céva, M: makrofág, F: fibroblast, E: endotelová buňka, P: pericyt. Převzato z (Kammertoens et al., 2005).

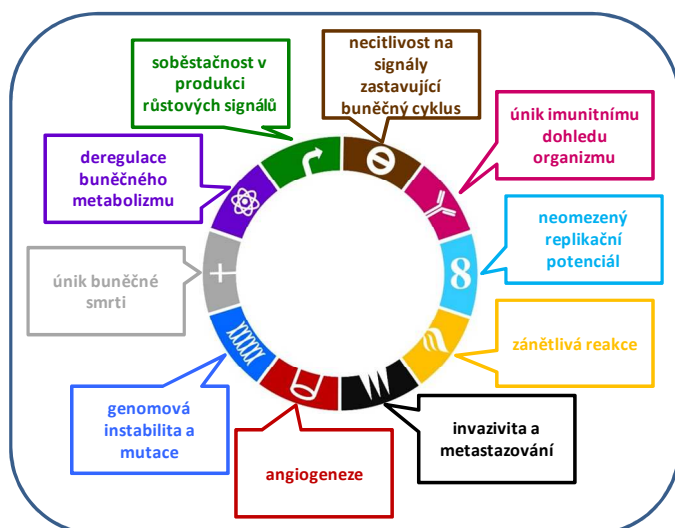
obecný konsensus, že většina nádorů je klonálních. To znamená, že jejich vývoj začíná jedinou odrodilou buňkou a v průběhu kancerogeneze dochází ke klonální selekci růstově nejúspěšnější buněčné populace.

V procesu kancerogeneze se uplatňují mutace dvou skupin genů, protoonkogenů a tumorsupresorových genů. **Tumorsupresorové geny** kódují proteiny, které se podílejí především na rozpoznání replikačních chyb, opravách DNA, indukci apoptózy a udržují buňku ve fázi klidu. Patří sem například geny *Rb*, *p53*, *DCC*, *APC*, *BRCA1/2*. Jejich mutace jsou inaktivující a recesivní a v případě dědičných forem nádorových onemocnění spojené se ztrátou heterozygotnosti, jak bylo popsáno v hypotéze dvou zásahů (*two-hits hypothesis*) na modelu hereditární formy retinoblastomu (Knudson, 1971). **Onkogeny** vznikají mutací protoonkogenů, které se podílejí na řízení proliferace, diferenciaci a přežívání buněk. Proteiny kódované protoonkogeny obvykle spouštějí buněčný cyklus. Mutace protoonkogenů jsou aktivující a dominantní a dochází k nim zpravidla v buňkách somatických. Při aktivační mutaci protoonkogenů buňka není schopna zastavit buněčné dělení a růst. Typickým příkladem aktivující mutace v protoonkogenu spojené se vznikem malignity je mutace v genech RAS (více viz Výstup 1, str. 15).

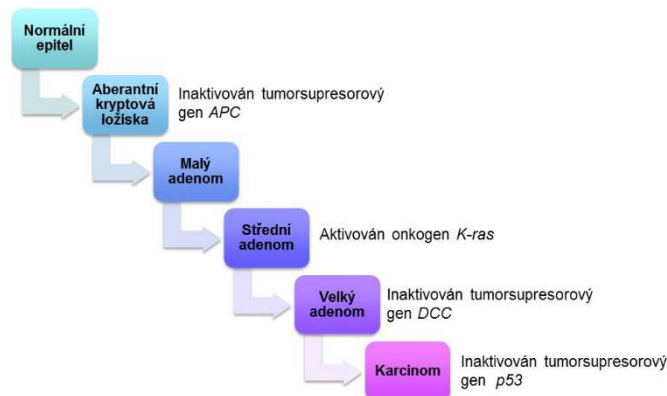
Obecně je přijímána představa, že v procesu kancerogeneze se musí v jedné buňce nakumulovat více změn, které nakonec vyústí v maligní fenotyp. Modelovým příkladem je proces vzniku kolorektálního karcinomu (Fearon and Vogelstein, 1990) (Obrázek 2). Tyto změny je možné kategorizovat do podskupiny základních znaků maligní buňky (*hallmarks of cancer*), které postulovali Hanahan a Weinberg dle poznatků roku 2000 jako tyto vlastnosti plně maligní buňky:

i/ soběstačnost v produkci růstových signálů, ii/ necitlivost na signály zastavující proliferaci, iii/ aktivace invaze a metastazování, iv/ neomezený replikační potenciál, v/ aktivace angiogeneze, vi/ únik buněčné smrti (Hanahan and Weinberg, 2000). Ve světle nových poznatků byl v roce 2011 publikován aktualizovaný koncept „hallmarks of cancer“, který přidává k původním 6 základním znakům 2 znaky přispívající k patogenezi maligního onemocnění a 2 charakteristiky, které potencují kancerogenezi (Hanahan and Weinberg, 2011). Deset základních znaků plně maligní buňky je schématicky popsáno viz Obrázek 3.

Přestože můžeme změny (mutace či dysregulace) konkrétních molekul spojit s danými vlastnostmi maligní buňky, není tato kategorizace absolutní. Příkladem může být aktivační mutace v genu KRAS, díky které získává buňka především nezávislost na růstových faktorech. Nicméně buněčná signalizace spojená s aktivací tohoto proteinu přispívá také k angiogenezi, rezistenci k apoptóze a migračnímu potenciálu.



na signály zastavující buněčný cyklus jako je např. inaktivace tumorsupresorových genů p53, Rb; (3) Únik imunitnímu dohledu organismu (viz str. 56); (4) Neomezený replikační potenciál (zvýšená aktivita telomeráz); (5) Zánětlivá reakce (viz str. 89); (6) Invazivita a metastazování např. díky inaktivaci adhezí molekul E-kadherinu; (7) Angiogeneze (viz str. 75); (8) Genomová instabilita a mutace; (9) Únik buněčné smrti např. díky zvýšené expresi antiapoptického proteinu bcl-2; (10) Deregulace buněčného metabolismu. Adaptováno dle (Hanahan and Weinberg, 2011).



Obrázek 2 Vogelsteinův model vícestupňové kancerogeneze u sporadické formy kolorektální karcinomu

(Fearon and Vogelstein, 1990). V normální epiteliální buňce krypty tlustého střeva dochází ke kumulaci somatických mutací, které vedou přes prekancerózu ke vzniku plně maligní buňky. Mutace v tumor supresorovém genu APC vede k dysregulaci buněčné proliferace a k hyperplázii. Následuje zpravidla ztráta alel na chromozomu 5 a vznik malého adenomu. Somatická aktivující mutace některého z protoonkogenů RAS přispívá k progresi adenomu. U velkého dysplastického adenomu pak bývá často také inaktivován tumor supresorový gen DCC. K přechodu do plně maligní karcinomové buňky přispívá mutace v p53. V kontextu znaků maligní buňky vede mutace APC k necitlivosti na signály zastavující buněčnou proliferaci, ke zvýšení invazivity a k chromozomové instabilitě. Mutace RAS zajistí buňce soběstačnost v produkci růstových signálů a přispívá k inhibici apoptózy a zvýšení angiogeneze. Mutace v DCC přispívá k dysregulaci proliferace, k inhibici apoptózy a zvyšuje buněčnou migraci (Mehlen and Tauszig-Delamasure, 2014).

Obrázek 3: Deset základních vlastností maligní buňky.

(1) Soběstačnost v produkci růstových signálů. Neomezená buněčná proliferace je vlastností maligní buňky, která je zjevná na první pohled. Za normálních okolností je regulace buněčného dělení přísně regulovaná a dochází k ní za přítomnosti růstových signálů. Soběstačnost v produkci růstových signálů může nádorové buňce zajistit např. i/ autokrinní produkce ligandů receptorů pro růstové faktory, ii/ zmnožení receptorů pro růstové faktory (např. Her-2, EGFR), iii/ změna struktury receptorů pro růstové faktory, která vede k snadnější vazbě ligandu či signalizaci bez přítomnosti ligandu (např. Her-2), iv/ aktivace molekul, které se nachází v signalizační kaskádě receptoru pro růstový faktor (např. aktivace protoonkogenů KRAS, HRAS, NRAS, PTEN apod.); (2) Necitlivost

Specifické vlastnosti nádorové buňky se stávají **potenciálním cílem protinádorové terapie**. Protinádorová terapie, která se pak zaměřuje na konkrétní cíle, které jsou selektivní pro nádorovou buňku, se nazývá cílená protinádorová léčba a její podstatou je maximalizovat toxicitu pro maligní buňky a přitom minimalizovat toxicitu pro normální buňky.

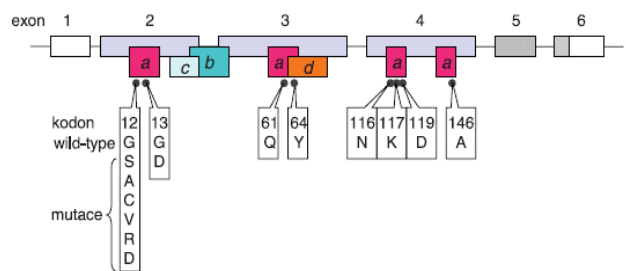
VÝSTUP 1: GEN KRAS V PERSONALIZACI LÉČBY PACIENTŮ S METASTATICKÝM KOLOREKTÁLNÍM KARCINOMEM

Jednou z vlastností nádorové buňky je soběstačnost v produkci růstových signálů a necitlivost na signály zastavující buněčný cyklus, kdy je strategií nádorové buňky pro vstup do buněčného cyklu produkce vlastních mitogenních signálů nebo ztráta citlivosti na signály anti-mitogenní. Často se vyskytujícím neregulovaným mitogenním signálem je aktivující mutace v genu *RAS*.

Gen *KRAS* (OMIM 190070) patří spolu se strukturně a funkčně homologními geny *HRAS* a *NRAS* do skupiny onkogenů *RAS* (Malumbres and Barbacid, 2003). Gen *KRAS* leží na chromozomu 12 v oblasti 12p12.1 a kóduje dvě izofomy A a B (Obrázek 4), z nichž výrazněji převažuje sestřihová varianta *KRASB* (Carta et al., 2006). Vazba GTP na k-ras a tedy jeho aktivita je regulována pomocí RasGAP (GAP – *GTPase activating protein*), které urychlují hydrolýzu GTP na GDP, a tedy přechod proteinu ras do inaktivní formy (Karnoub and Weinberg, 2008).

Do aktivní formy se protein ras dostává působením proteinů RasGEF (GEF – *guanine nucleotide exchange factor*), které navozují disociaci GDP, které je nahrazeno GTP, a protein tak přechází do aktivního stavu (Bernards and Settleman, 2007). Aktivační mutace genu *KRAS* znemožňují hydrolýzu GTP na GDP, a tím přechod aktivní formy proteinu ras na neaktivní. Onkogenní mutace genu *KRAS* se zpravidla vyskytují v oblastech ovlivňujících hydrolýzu GTP, např. mutace v kodonu 12 vedoucí k záměně glycinu za aminokyselinu s postranním řetězcem má za následek sterickou interferenci s hydrolýzou GTP

navozenou GAP (Scheffzek et al., 1997); glutamin v pozici 61 umožňuje vazbu s GAP p120 a následnou hydrolýzu GTP (Ahmadian et al., 1997; Krengel et al., 1990; Scheffzek et al., 1997). Díky onkogenním somatickým mutacím získává buňka konstitutivně aktivní protein k-ras bez ohledu na aktivační nebo deaktivující signály přicházející z membránových receptorů, které jsou v aktivační kaskádě hierarchicky postaveny nad proteinem k-ras. Typickým příkladem receptoru aktivujícího protein k-ras je receptor pro epidermální růstový faktor EGFR. K aktivaci (fosforylaci) intracelulární

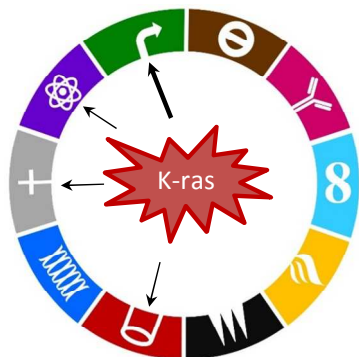


Obrázek 4: **Onkogenní mutace genu *KRAS*.**

Gen se skládá z 6 exonů označovaných v literatuře 1, 2, 3, 4, 5, 6 (Carta et al., 2006), případně -1, 1, 2, 3, 4A a 4B (Smith et al., 2010). V současné terminologii používané v souvislosti s testováním onkogenních mutací u pacientů s kolorektálním karcinodem převažuje označení 1–6. Exon 1 není překládán (prázdný box), šedě označené exony 5 a 6 podléhají alternativnímu sestřihu se značnou převahou izofomy *KRASB* (*KRAS4B*) s translací exonu 6 bez exonu 5. Exony 2–4 jsou invariantní kódující exony. Boxy s písmeny znázorňují funkční oblasti proteinu v kontextu jejich uspořádání v genu: (a) místo vazby GTP, (b) místo vazby efektorů, (c) switch I: interakce efektorů a GAP, (d) switch II: interakce s GEF. Černé body představují kodony, u jejichž mutaci byl popsán onkogenní potenciál; u kodonů 12 a 13 jsou mimo aminokyseliny kódované nemutovaným tripletem uvedeny také aminokyseliny zařazované následkem mutace.

tyrozinkinázové domény EGFR dochází na základě navázání ligandu na receptor a RasGEF pak zprostředkují aktivaci proteinu k-ras (Moroni et al., 2005) (Obrázek 5).

Terapeutická inhibice receptoru EGFR se v posledních letech využívá v léčbě celé řady epiteliálních nádorových onemocnění. Klinicky nejčastěji používané inhibitory jsou monoklonální protilátky



Obrázek 5: **Signalizační kaskáda proteinu k-ras.**

Za fyziologických podmínek je aktivace proteinu k-ras navozena vazbou ligandů na EGFR receptor. Kinázová signalizační kaskáda pak vede k indukci buněčné proliferace, angiogeneze, přežití buňky a migračnímu potenciálu maligních buněk.

(anti-EGFR mAb, cetuximab a panitumumab) nebo nízkomolekulární inhibitory tyrozinkinázové domény EGFR (TKI – erlotinib, gefitinib a lapatinib).

Testování genu *KRAS* má zásadní klinický význam u pacientů s metastatickým kolorektálním karcinomem. Dvě velké klinické studie CRYSTAL a OPUS hodnotily benefit z přidání cetuximabu k režimu FOLFIRI (leukovorin, 5-fluorouracil, irinotekan), respektive FOLFOX (leukovorin, 5-fluorouracil, oxaliplatin), v první linii u pacientů s metastatickým kolorektálním karcinomem (mCRC). Z metaanalýzy těchto studií vyplynulo, že mutační status genu *KRAS* může být prediktorem odpovědi na léčbu anti-EGFR protilátkami (Bokemeyer et al., 2011; Van Cutsem et al., 2009). Analýzou těchto klinických hodnocení a dalších retrospektivních studií bylo prokázáno, že aktivační somatické mutace v kodonech 12 a 13 exonu 2 genu *KRAS* jsou negativním prediktivním faktorem léčebné odpovědi na cetuximab u pacientů s mCRC (De Roock et al., 2008; Di Fiore et al., 2007; Khambata-Ford et al., 2007; Lievre et al., 2008; Lievre et al., 2006). Z těchto studií také

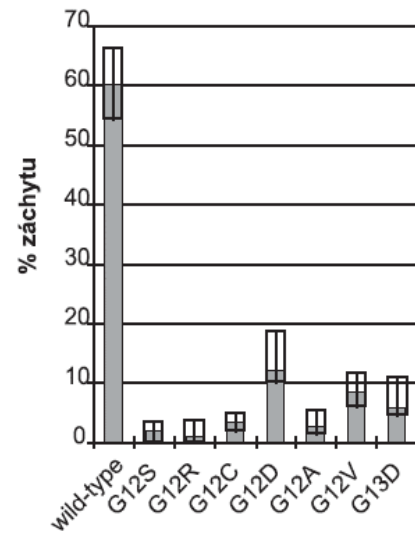
vycházela doporučení ASCO (American Society of Clinical Oncology; www.asco.org), NCCN (National Comprehensive Cancer Network; www.nccn.org) a CAP (College of American Pathologists; www.cap.org) týkající se testování mutací genu *KRAS* u pacientů s mCRC zvažovaných k terapii anti-EGFR mAb. Tyto organizace v roce 2009 doporučovali testování genu *KRAS* u všech kandidátů pro léčbu anti-EGFR terapií a konkrétně v USA výhradně v laboratořích postupujících podle CLIA (Clinical Laboratory Improvement Amendments, www.cms.gov/clia, zákonný předpis stanovující normy na zajištění kvality v klinických laboratořích v USA), a v případě záchytu mutace v kodonech 12 a 13 by pacient s mCRC neměl dostat terapii anti-EGFR mAb jako součást standardní léčby (Allegra et al., 2009).

Publikovali jsme analýzu vyšetření mutačního stavu genu *KRAS*, která byla provedena v roce 2009 na všech pracovištích v České republice¹. V tomto roce bylo v referenčních laboratořích v České republice provedeno 2580 testování genu *KRAS*, z nichž bylo 60,2 % případů nemutovaných, tedy wild-type *KRAS*, přičemž pracoviště s nejvyšším záchytem wild-type forem *KRAS* vykazovalo 66,5 % nemutovaných a pracoviště s nejnižším záchytem mutací vykazovalo 55,2 % wild-type (Obrázek 6). Přítomnost somatických mutací u metastatického kolorektálního karcinomu zachycených v České republice v roce 2009 tak odpovídá údajům z klinických hodnocení OPUS a CRYSTAL (14, 15).

¹ Dubská L., Vyskocilová M., Nenutil R., Valík D., Knoflíčková D., Fabian P., Kocáková I., Demlová R., Beránek M., Drastíková M., Vosmiková H., Bóday A., Horká K., Símová J., Drábek J., Ehrmann J., Hajdúch M., Matejcková M., Síma R., Tvrdlík D., Povýsil C., Ryska A. (2011): **[KRAS mutation testing in therapeutic algorithm for treatment of metastatic colorectal carcinoma]**. *Cas Lek Cesk.* 150 (6):321-6. *Citace PubMed 2*

Celkové pořadí četnosti mutací vyšetřovaných na všech pracovištích je G12D (11,9 % všech výsledků), G12V (8,8 %), G13D (5,8 %), G12C (3,3 %), G12A (2,8 %), G12S (2,0 %), G12R (1,0 %).

Dle aktuálních poznatků pacienti s kolorektálním karcinomem s aktivující mutací v genech *KRAS* nebo *NRAS* nemají prospěch z podání terapeutických anti-EGFR protilátek (Tejpar et al., 2014). Současná doporučení pro testování genů *RAS* před podáním anti-EGFR terapie pacientům s kolorektálním karcinomem jsou následující (Wong et al., 2014): i/ měla by být zajištěna infrastruktura pro rychlé a robustní dodání vzorku z onkologického centra do laboratoře provádějící vyšetření, ii/ pro testování může být použita tkáň z primárního nádoru nebo metastázy, iii/ pro testování může být použita tkáň z biopsie nebo preferenčně z resektátu, iv/ počet maligních buněk, z kterých se test provádí, by měl být minimálně dvojnásobný detekčnímu limitu testu, v/ analýza genů *RAS* by měla zahrnovat minimálně *KRAS* v kodonech 12, 13, 59, 61, 117 a 146, a *NRAS* v kodonech 12, 13, 59 and 61, vi/ čas odezvy testu by měl být 7 nebo méně pracovních dní od dodání vzorku do laboratoře pro více než 90 % vyšetřovaných vzorků, vii/ před zavedením testu do klinické praxe by měla být provedena validace či verifikace metody, viii/ interní kontrola kvality metody by měla zahrnovat minimálně mutovanou, wild-type a beztemplátovou kontrolu pro každou testovanou oblast, ix/ laboratoř by měla prověřovat, zda je zastoupení jednotlivých typů mutací a nemutovaných vzorků ve shodě s publikovanými daty a v případě odchylky prověřit způsob testování, x/ laboratoř by měla maximalizovat opatření pro zvýšení výtěžnosti testu včetně ověřování kvantity a kvality DNA izolované ze vzorků, xi/ laboratoř provádějící *RAS* analýzu pro klinické účely by měla mít pro toto vyšetření program externí kontroly kvality a relevantní akreditaci.



Obrázek 6: **Souhrnné výsledky analýzy genu *KRAS* v České republice v roce 2009.**

Sloupce znázorňují celkový záchyt v jednotlivých kategoriích v %. Boxy vyznačují nejvyšší a nejnižší záchyt jednotlivých výsledků reportovaných českými pracovišti.

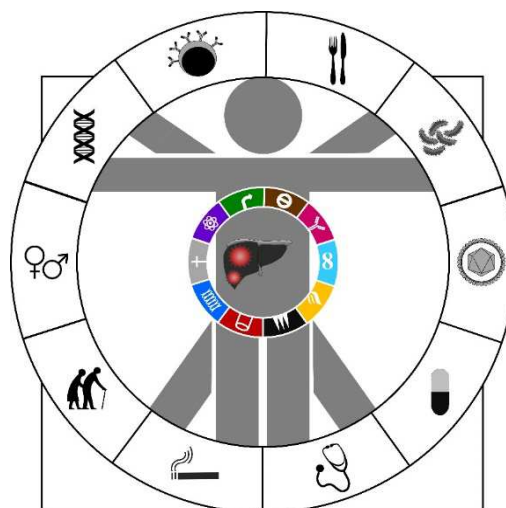
V posledních letech je výzkum v oblasti nádorové biologie a aplikovaný onkologický výzkum stále méně zaměřen na vlastnosti jedné buňky a pozornost se věnuje také nádorovému mikroprostředí, jehož vlastnosti ovlivňují nejen přechod z premaligního stádia do maligní invazivní a metastazující nádorové masy, ale ovlivňují také efekt léčby onkologického onemocnění. V tomto ohledu se zkoumá především infiltrace nádoru buňkami imunitního systému a faktory ovlivňující nádorovou angiogenezi (Angell and Galon, 2013; Ascierto et al., 2013; Folkman, 1972; Galon et al., 2014; Galon et al., 2012).

Pohled na faktory ovlivňující patogenezi, rozvoj a léčbu maligních onemocnění lze rozšířit na celý organismus. Epidemiologické studie ukazují, že 30 % maligních onemocnění u člověka je spojeno s užíváním tabáku, 35 % s dietou, 14-20 % s obezitou, 18 % s infekčními onemocněními a 7 % s radiací a enviromentálními polutanty (Jemal et al., 2010). Za významné faktory z tohoto hlediska lze považovat patofyziologické stavy, které souvisí s **nutricí, mikrobiomem (především střevním), infekčními onemocněními, medikací, komorbiditami, životní stylem, věkem, endokrinologický stavem, genotypem, imunitním systémem** (Obrázek 7). Některé z těchto faktorů se uplatňují přímo v nádorových buňkách (např. genotyp), určité se uplatňují majoritně v nádorovém mikroprostředí (např. infekce *Helicobacter pylori*), některé z uvedených faktorů působí především systémově (např. střevní mikrobiom). Řada z uvedených faktorů však působí více či méně na všech zmíněných úrovních tj. na maligní buňku *per se*, na komponenty nádorového stroma (např. věk). Mezi zmíněnými systémovými faktory existuje řada průníků (např. životní styl a nutriční stav) a interakcí; příkladem může být vztah mezi nutričním stavem a střevním mikrobiomem, střevním mikrobiomem a funkcí imunitního systému, komorbiditami a medikací atd.

Obrázek 7: Deset základních znaků maligní buňky a deset systémových faktorů ovlivňující patogenezi a léčbu maligních onemocnění.

Systémové faktory lze kategorizovat jako: (1) nutriční stav; (2) mikrobiom (především střevní); (3) infekční onemocnění; (4) medikace; (5) komorbidity; (6) životní styl; (7) věk; (8) endokrinologický status; (9) genotyp; (10) imunitní systém.

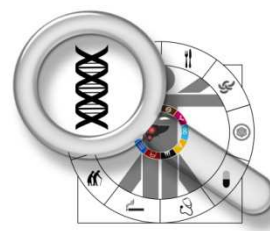
Jednotlivé faktory ovlivňují dle své charakteristiky a kontextu více či méně jednotlivé základní znaky maligní buňky, což vytváří poměrně komplexní situaci, která není snadno uchopitelná z badatelského ani klinického hlediska. Některé příklady jsou uvedeny na následujících stránkách.



V následujících subkapitolách jsou popsány jednotlivé systémové faktory a jejich vztah k patofyziologii a terapii maligních onemocnění. Popis těchto faktorů není vyčerpávající se smyslu postihnout všech jednotlivých aspektů. Spíše jsou uvedeny příklady, které mají vztah k zaměření této práce, tedy úloze imunitního systému a nádorového mikroprostředí u solidních malignit.

GENOTYP

Zárodečný genotyp organismu se promítá jednak do genotypu premaligní/maligní buňky, ale také do genotypu normálních nemaligních buněk organismu. Existuje celá řada dědičných forem onkologických onemocnění, jež souvisí s vrozenou mutací tumorsupresorových genech např. *BRCA-1*, *BRCA-2*, *p53*.



Na patogenezi nádorových onemocnění se uplatňují také zárodečné mutace genů na první pohled s onkologickými onemocněními nesouvisející, jako jsou např. genové abnormality způsobující primární imunodeficiencie. **Primární imunodeficiencie** jsou spojeny s vyšším rizikem maligních onemocnění v porovnání s běžnou populací (Gatti and Good, 1971; Kinlen et al., 1985; Salavoura et al., 2008; van der Meer et al., 1993), což lze považovat za jeden z důkazů, že imunitní systém chrání lidský organismus před rozvojem nádorového bujení. Nicméně u řady primárních imunodeficiencí (např. Wiskott-Aldrich syndrom, Nijmegen breakage syndrom, Ataxia-telangiektasia) má kauzativní mutace pleiotropní efekt, který je přímo spojen s kancerogenezí, a rozsah vlivu imunitního systému v takových případech nelze posoudit. Pacienti s primárními imunodeficiencemi jsou do vyšší míry postiženi NHL a Hodgkinovým lymfomem, což je do jisté míry spojeno s vyšší náchylností k infekci onkogenními viry jako je EBV či HHV-8 (Carbone et al., 2008; Kersey et al., 1988; Wheat et al., 2005) a *H. pylori* (Zullo et al., 1999). Mimo zmíněné malignity jsou určité typy primárních imunodeficiencí spojeny i s adenokarcinomy a jinými epiteliálními nádory; existuje např. asociace mezi hyper IgM syndromem způsobeným X-vázanou mutací v genu pro CD40L a vyšší incidencí nádorů pankreatu a jater (Hayward et al., 1997). Některé studie také prokázaly, že existuje vztah mezi určitými **polymorfizmy v genu kódujícím pro vitamín D** (VDR) a vznikem karcinomu prsu (Příloha 2 – Tab. 2)², což souvisí s mediací protinádorového efektu vitamínu D (více o problematice na str. 25).

Jiným aspektem systémového vlivu genotypu nemaligní buňky na průběh maligního onemocnění jsou **farmakogenetické polymorfizmy** podílející se na průběhu a výsledků protinádorové léčby. Polymorfizmy či mutace v genech kódujících enzymy důležité pro metabolismus léčiv jsou odpovědné za interindividuální variabilitu farmakokinetiky a farmakodynamiky protinádorové terapie. V kontextu protinádorové léčby přispívají prediktivní farmakogenetické studie především i/ k identifikaci jedinců, u kterých může vést standardní dávka chemoterapie k závažné až život ohrožující **toxicitě**, ii/ k identifikaci jedinců, kteří budou **benefitovat** z určité protinádorové léčby, která nevykazuje příznivý vliv na celou kohortu nemocných. V tomto případě se jako farmakogenetický přístup označuje zkoumání vlivu zárodečných polymorfismů a mutací. V případě, že jsou předmětem hodnocení somatické mutace v nádorové tkáni, hovoříme spíše o prediktivní onkologii (viz Výstup 1, str. 15). Jak prediktivní onkologie, tak farmakogenetika jsou v současnosti stěžejními přístupy v **personalizaci terapie** nejen v onkologii. Z hlediska efektu léčby v kontextu genetických polymorfismů je nejlépe popsán i/ vztah mutací v genech pro cytochrom p450 (především genu *CYP2D6*) a nežádoucích účinků léčby tamoxifenem (Singh et al., 2011), ii/ vztah mezi přítomností alely HLA-B*1502 a nežádoucími kožními reakcemi po podání

² Obermannova R., Demlová R., Drábová K., Melichárková K., Greplová K., Mrkvicová M., Zdražilová-Dubská L., Vyzula R., Valík D. (2014): **[Vitamin D as an important steroid hormone in breast cancer.]** *Klin Onkol.* 27 (1):143-9.

karbamazepinu (Hung et al., 2006; Man et al., 2007), iii/ a dále polymorfizmy v genech *CYP2C9* a *VKORC1*, které vedou k vyššímu antikoagulačnímu efektu standardní dávky warfarinu, iv/ a mutace v genu *UGT1A1* vedoucí ke zvýšené toxicitě irinotekanu. Nicméně přes rozvoj technologií umožňujících detekci polymorfizmů (od farmakogenetiky k farmakogenomice) se při predikci metabolismu některých léčiv uplatňují funkční testy, které mohou reflektovat faktory významné v celkovém metabolickém pochodu v organismu. Určitým prediktorem odpovědi na protinádorovou terapii léčbu může být polymorfismus v genotypu VEGF, kdy byla popsána asociace mezi určitými variantami VEGF a klinickou odpovědí na léčbu bevacizumabem; konkrétně VEGF – 1498 T/T polymorfismus byl asociován s kratším PFS u pacientů s metastatickým kolorektálním karcinomem léčeným v první linii pro metastatické onemocnění bevacizumabem a FOLFIRI (Loupakis et al., 2011).

VÝSTUP 2: FARMAKOGENOTYP TPMT A DPD: TOXICITA A EFEKT PROTINÁDOROVÉ LÉČBY

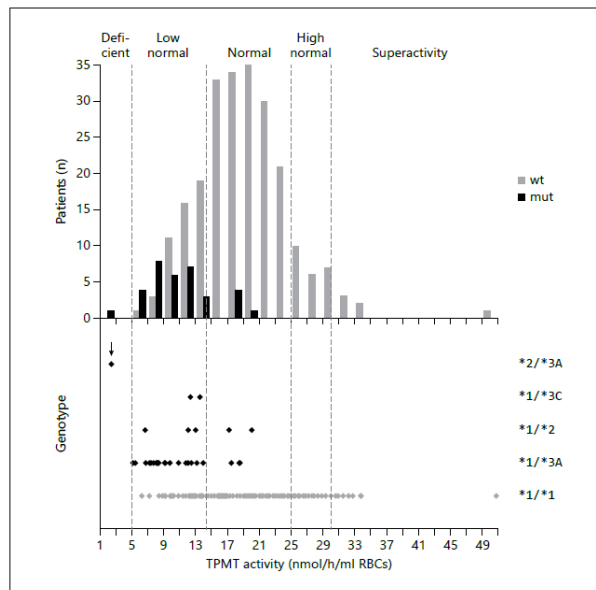
Genetické polymorfismy mají vliv na farmakokinetické pochody v organismu (absorbce, distribuce, metabolismus, exkrece), tak na farmakodynamický efekt aktivního metabolitu na cílovou buňku (např. exprese receptorů) a nádorové mikroprostředí. Řada chemoterapeutik je podávána ve formě neaktivních nebo prekurzorových molekul, které jsou v organismu metabolizovány na účinné látky. Geneticky podmíněná variabilita v metabolismu protinádorových léčiv má tedy více či méně podstatný vliv na následnou systémovou toxicitu a/nebo efekt léčiva.

Thiopurinové preparáty jsou užívány při léčbě pacientů s maligními onemocněními (např. ALL), autoimunitami a u příjemců transplantátů. Thiopuriny jsou metabolizovány v organismu přes S-metylací katalyzovanou enzymem thiopurin metyltransferázou (TPMT). V naší populaci jsou nejčastější polymorfizmy označované TPMT*3A, TPMT*3C a TPMT*2 a méně častá TPMT*3B. Alela TPMT*2 se vyznačuje single-nukleotidovou transverzí v exonu 5 (G238C), TPMT*3C má tranzici v exonu 10 (A719G), u TPMT*3A byly popsány dva polymorfizmy, v exonu 7 tranzice (G460A) a v exonu 10 již výše popsaná A719G. Všechny tyto popsané mutace zapříčiňují vznik proteinu TPMT, který podléhá rychlé proteolýze, což vyvolává nedostatek enzymu pro metabolismus thiopurinových substancí, čímž je u pacientů, kteří jsou nosiči těchto polymorfizmů, metabolismus thiopurinových preparátů pomalý. Důsledkem jsou závažné vedlejší nežádoucí účinky (hematologická toxicita, hepatotoxicita, neurotoxicita, mukozitida). Závažnost klinických projevů deficitu TPMT se pak odvíjí od genetického podkladu polymorfizmu, přičemž homozygotní varianta polymorfizmu vede k výraznější toxicitě než heterozygotní status a vyžaduje výraznější redukci dávek při léčbě thiopuriny.

Analyzovali jsme korelaci mezi genotypem a fenotypem TPMT u 267 pacientů (ALL, autoimunitní onemocnění) před zahájením léčby thiopuriny³. Polymorfismus v genu pro TPMT byl zachycen u 33 pacientů (12,4 %) v heterozygotním stavu (26 x TPMT * 1/* 3A, 5 x TPMT * 1/* 2, 2 x TPMT * 1/* 3C) a jeden pacient s ALL byl složený heterozygot (* 2/* 3A), u kterého byla popsána život ohrožující toxicita v průběhu postindukční fáze léčby obsahující 6-merkaptopurin (viz příloha 3, Fig. 2 + *Case Description*). Aktivita TPMT (= fenotyp) byla stratifikována do kategorií: „deficient“, „low

³ Demlova R., Mrkvicova M., Sterba J., Bernatikova H., Stary J., Sukova M., Mikuskova A., Chocholova A., Mladosievicova B., Soltysova A., Behulova D., Pilatova K., Zdrzilova - Dubska L., Valik D.(2014): **Augmenting clinical interpretability of thiopurine methyltransferase laboratory evaluation.** *Oncology.* 86(3):152-8. IF 2,613

normal“, „normal“, „high normal“ a superaktivita a stanovený fenotyp se do značné míry, nikoli však zcela, překrýval s genotypem (Obrázek 8). Přestože překryv mezi genotypovými a fenotypovými kategoriemi je značný, není absolutní; existují jedinci s mutací s normální aktivitou TPMT a naopak někteří wt homozygoti mají sníženou aktivitu TPMT. Další zajímavou kategorií jsou jedinci se zvýšenou aktivitou TPMT, kteří metabolizují thiopuriny pravděpodobně rychleji, což může vést ke sníženému efektu léčby. Na základě těchto poznatků vyšetřujeme genotyp i fenotyp a nález obou vyšetření interpretujeme souhrnně (Tabulka 1).



Obrázek 8 Distribuce aktivity TPMT ve vztahu ke genotypu TPMT.

Histogram představuje zjištěné aktivity TPMT u jedinců s mutací v TPMT a u jedinců bez mutace. V dolní části jsou naměřené aktivity TPMT vyneseny v kontextu jednotlivých polymorfizmů. wt = wild-type; mut = mutant. Pacient s ALL, u kterého se v průběhu léčby vyskytla život ohrožující toxicita, je označen šipkou.

	G2 (*mt/*1)	G3 (*mt/*mt*)	G4 (mt1, mt2)
G1 (wt - *1/*1)			
F1 ↑	Pacient by neměl být ohrožen zvýšenou toxicitou při podání standardní dávky thiopurinů. Pacient bude pravděpodobně standardní terapeutickou dávkou thiopurinů metabolizovat rychleji, což může vést ke sníženému efektu léčby.		
F2 N	Pacient by neměl být ohrožen zvýšenou toxicitou při podání standardní dávky thiopurinů.	Nelze vyloučit zvýšenou toxicitu při podání standardní dávky thiopurinů. Doporučujeme monitorovat krevní obraz při zahájení terapie thiopuriny.	Nelze vyloučit zvýšenou toxicitu při podání standardní dávky thiopurinů. Doporučujeme monitorovat krevní obraz při zahájení terapie thiopuriny.
F3 ↓	Možné riziko zvýšené toxicity při podání standardní terapeutické dávky thiopurinů. Doporučujeme monitorovat krevní obraz při zahájení terapie thiopuriny.	Pravděpodobné riziko zvýšené toxicity při podání standardní terapeutické dávky thiopurinů. Doporučujeme monitorovat krevní obraz při zahájení terapie thiopuriny. Ke zvážení je i eventuální	Pacient je ve vysokém riziku závažné toxicity při podání standardní terapeutické dávky thiopurinů. Pravděpodobné riziko zvýšené toxicity při podání standardní terapeutické dávky thiopurinů. Doporučujeme monitorovat krevní obraz při zahájení terapie thiopuriny. Ke zvážení je i eventuální

	redukce terapeutické dávky.	redukce terapeutické dávky.
F4 ↓↓	Velmi vysoké riziko závažné toxicity při podání standardní terapeutické dávky thiopurinů.	Velmi vysoké riziko závažné toxicity při podání standardní terapeutické dávky thiopurinů. ⁵

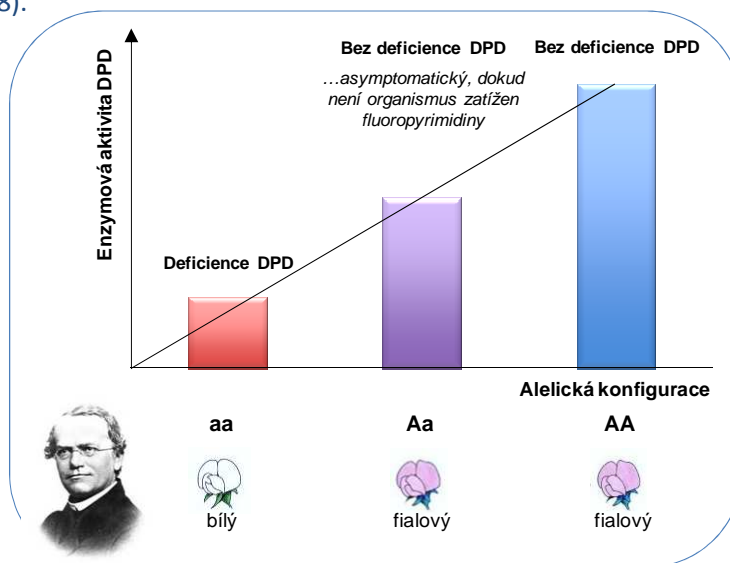
Tabulka 1: Interpretivní kategorie vyšetření fenotypu a genotypu TMPT.

Výsledek vyšetření genotypu spadá do 4 kategorií: G1 - homozygotnímu nemutovanému stavu wt - *1/*1; G2 - mutace v heterozygotním stavu, G3- mutace v homozygotním stavu, G4- více mutacím ve stavu heterozygot (*3A/*1) nebo složený heterozygot (*3B/*3C). Výsledek vyšetření fenotypu rozdělujeme do 4 kategorií: F1 - nad 24,9 nmol/hod/ml RBC = zvýšená aktivita; F2 - 14,0–24,9 nmol/hod/ml RBC = normální aktivita; F3 - 5,0–13,9 nmol/hod/ml RBC = snížená aktivita; F4 - pod 5,0 nmol/hod/ml RBC = deficience aktivity TPMT.⁵ Do této interpretivní kategorie spadá pacient s život ohrožující toxicitou (popsán v příloze 3).

Jiným příkladem kombinace farmakogenetického a farmakokinetického přístupu v predikci toxicity protinádorové terapie je vyšetření polymorfizmů genů podílejících se na metabolismu fluoropyrimidinů. Fluoropyrimidiny, především 5-FU a kapecitabin, se používají v onkologii pro léčbu kolorektálního karcinomu a karcinomu prsu. Až 40 % pacientů léčených 5-fluorouracilem má závažnou gastroenterologickou nebo hematologickou toxicitu (Caudle et al., 2013). Protinádorový efekt 5-FU je vyvolán inhibicí thymidylátsyntázy a vznikem FUTP, které se inkorporují do RNA. Metabolismus 5-FU probíhá z více než 80 % v játrech, přibližně 10 % 5-FU je vyloučeno močí v nezměněné formě a pouze 1-3 % se dostane k maligním buňkám v nádoru (schématicky – Příloha 4 – Fig. 1). Klíčové enzymy podílející se na katabolismu 5-FU jsou dihydropyrimidin dehydrogenáza (DPD) a dihydropyrimidináza. Lidský gen kódující DPD (DPYD) se nachází v oblasti 1p21.3 a skládá se z 23 exonů (Wei et al., 1998).

Několik variant genu DPYD bylo popsáno v souvislosti se sníženou aktivitou enzymu DPD (Amstutz et al., 2011; Caudle et al., 2013). Nejznámější a klinicky nejvýznamnější varianta DPYD je alela s polymorfismem v sestřihovém místě označovaná DPYD*2A (IVS14+1G>A nebo c.1905+1G>A), která vede ke snížené aktivitě enzymu DPD, pokud je v heterozygotním stavu, a k deficienci enzymu, pokud je v

homozygotním stavu, která se projevuje jako autozomálně recesivní metabolická porucha se závažnou symptomatologií, především neurologickou, projevující se již v raném věku (Obrázek 9).



Obrázek 9: Farmakogenetika deficience DPD v kontextu mendelovské dědičnosti.

a = recesivní alela (alela pro DPYD s mutací, alela pro bílou barvu květu hrachu); *A* = dominantní alela (alela DPYD wild-type, alela pro fialovou barvu květu hrachu); *aa* = recesivní homozygot (např. DPYD genotyp: *2A/*2A); *Aa* = heterozygot (např. DPYD genotyp: *1/*2A); *AA* = dominantní homozygot (např. DPYD genotyp: *1/*1).

Incidence této alely není vysoká; cca 1 % v bělošské populaci (Příloha 4 – Tab. 1). My jsme u 47

vyšetřovaných tuto variantu nezachytili⁴. Asociace tohoto polymorfizmu s toxicitou po podání 5-FU není příliš silná; u 32 pacientů s kolorektálním karcinomem s vážnými (grade 3-4) nežádoucími účinky po podání 5-FU byla přítomnost DPYD*2A zachycena v jednom případě. Přesto se vyšetření na přítomnost alely DPYD*2A u všech pacientů před podáním fluoropyrimidinů a následná redukce dávky u nosičů této mutace jeví jako racionální s ohledem na redukci toxicity a také z hlediska celkové nákladovosti provedení vyšetření a řešení následných nežádoucích účinků (Deenen et al., 2016).

ENDOKRINOLOGICKÝ STATUS

Z hlediska patofyziologie a léčby malignit je endokrinologický status organismu a efekt protinádorové hormonální léčby nejvíce prostudován a z podstaty věci nejvýznamnější u karcinomu prsu, gynekologických malignit a karcinomu prostaty. Recentně byla publikována práce prezentující **fylogenetickou klasifikaci karcinomu prsu** založenou na expresi 3 receptorů: estrogenového, androgenového a receptoru pro vitamín D. Dle této klasifikace se nádory prsu dělí do 4 kategorií (HR0 - HR3) mající vztah k prognóze onemocnění (Santagata et al., 2014). S problematikou hormonů souvisí téma epidemiologie malignit a expozice chemickým látkám, které jsou hormonálně aktivní a nazývají se **endokrinní disruptory** (Caserta et al., 2008; Diamanti-Kandarakis et al., 2009); pak se tato problematika začíná prolínat s oblastí nutriční. Příkladem endokrinních disruptorů jsou fytoestrogeny. Navzdory poznatkům, že izoflavony mohou potlačovat proliferaci endometria, randomizované placebem kontrolovaná studie postmenopauzálních žen ukázala, že sojové fytoestrogeny vedou k vyššímu výskytu hyperplazie endometria (Unfer et al., 2004). Fytoestrogenní doplňky mají některé pozitivní vlastnosti (působí např. jako antioxidanty), ale jejich efekt jakožto endokrinních disruptorů pravděpodobně převažuje.



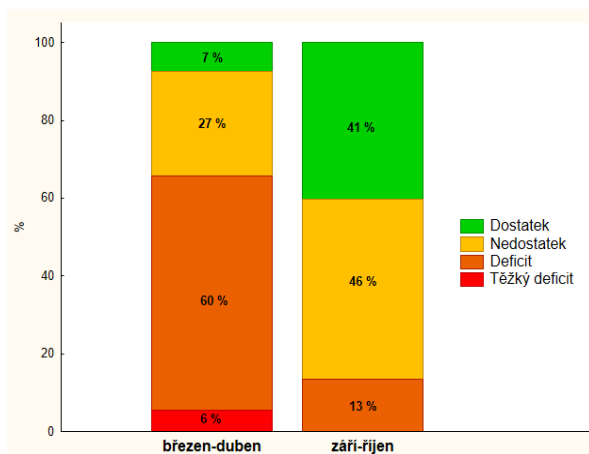
S ohledem na dále diskutovanou **střevní dysmikrobii** a její souvislost s nádorovým bujením, především kolorektálním karcinomem (str. 35), bych ráda zmínila žlučové kyseliny, jejichž funkce jakožto hormon-like substancí regulujících metabolismus lipidů, glukózy, lipoproteinů, ale i zánětlivé procesy je v současnosti předmětem zájmu (Li and Chiang, 2014; Zhou and Hylemon, 2014). Vzhledem k tomu, že metabolismus cholesterolu a žlučových kyselin je realizován z části prostřednictvím jaterních enzymů lidského organismu a z části pomocí enzymů prokaryot střevní mikrobioty, lze na střevní mikrobiom pohlížet také jako na endokrinní orgán, označený také jako sterolbiom (Evans et al., 2013; Everest, 2007; Lyte, 2016, 2010; Neuman et al., 2015; Ridlon and Bajaj, 2015; Sandrini et al., 2015). Určité karcinogenní vlastnosti byly popsány např. u kyseliny deoxycholové (DCA) (Hylemon et al., 2009); DCA aktivuje EGFR u intestinálních buněk (Cheng and Raufman, 2005; Lee et al., 2010; Qiao et al., 2001).

⁴ Pilatova, K., Mrkvicova, M., Zdrzilova-Dubska, L., Obermannova, R., Valik, D. (2013): **Detection of DPYD*2A allele in dihydropyrimidine dehydrogenase gene: perspective for fluoropyrimidine-treated patients.** *Folia Mendeliana* 49(2):75-80.

VÝSTUP 3: HYPOVITAMINÓZA D MÁ SEZONNÍ VARIABILITU A VZTAH K HORŠÍ PROGNOZE METASTATICKÉHO KOLOREKTÁLNÍHO KARCINOMU

Do kategorie hormonů a hormon-like látek řadíme i vitamín D. V posledních letech se v souvislosti s výskytem rakoviny, ale i dalších onemocnění (hypertenze; diabetes mellitus; osteoporózy; některých infekčních, např. tuberkulózy; autoimunitních chorob, např. roztroušené sklerózy, revmatoidní artritidy) hovoří o protektivním vlivu vitamínu D a o epidemii nedostatku vitamínu D. Vitamín D je prohormon, který je v organismu metabolizován na steroidní hormon kalcitriol, který hraje kromě zásadní role v homeostáze vápníku významnou úlohu v řadě biochemických procesů. Fotochemická syntéza vitamínu D₃ (cholekalCIFerol, D₃) probíhá v kůži, kde se 7-dehydrocholesterol konvertuje díky ultrafialovému záření na pre-vitamín D₃. Vitamín D₃, který následně vzniká izomerizací pre-vitamínu D₃ v bazální vrstvě epidermis nebo je v tenkém střevě absorbován z potravy, se váže na protein vázající vitamín D (DBP) a další plazmatické proteiny a je transportován do jater. Vitamín D₃ je jaterními 25-hydroxylázami hydroxylován na 25-hydroxycholekalCIFerol (25(OH)D₃), který je v ledvinách 1 α -hydroxylován 25-hydroxyvitamín D₃-1 α -hydroxylázou. Touto reakcí vzniká aktivní sekosteroid kalcitriol = 1 α ,25(OH)₂D₃, který má efektorové funkce v různých tkáních: i/ zvyšuje absorpci Ca²⁺ a anorganického fosfátu v tenkém střevě, ii/ zvyšuje mineralizaci kostí, iii/ navozuje diferenciaci imunitních buněk, iv/ v nádorovém mikroprostředí potlačuje proliferaci, navozuje diferenciaci a inhibuje angiogenezi. Syntéza 1 α ,25(OH)₂D₃ z 25(OH)D₃ je stimulována parathormonem (PTH) z příštítných tělísek a potlačována Ca²⁺, P_i a zpětnovazebně 1 α ,25(OH)₂D₃ samotným. Kritickým krokem v katabolismu kalcitriolu je degradace 25(OH)D₃ na 24,25(OH)D₃ a 1 α ,25(OH)₂D₃ na 1 α ,24,25(OH)₂D₃, díky 24-hydroxylaci 25-hydroxyvitamín D 24-hydroxylázou, která je kódována genem CYP24A1. 24,25(OH)D₃ a 1 α ,24,25(OH)₂D₃ jsou následně z organismu vyloučeny (schématicky-Příloha 5 – obr. 1)⁵.

Signalizaci spouští 1,25-dihydroxy-D₃ většinou prostřednictvím receptoru vitamínu D (VDR), který náleží do rodiny steroidních nukleárních receptorů. Vazbou 1,25(OH)₂D₃ D na VDR je indukována



Obrázek 10: **Hypovitaminóza D má v České republice sezonní variabilitu.**

Těžký deficit: pod 25 nmol/l; deficit: 25-50 nmol/l; nedostatečnost: 50-75 nmol/l; dostatek: nad 75 nmol/l.

buněčná diferenciaci, inhibována proliferace a regulována apoptóza u normálních i nádorových buněk, dále je potlačena angiogeneze a iniciovány imunomodulační účinky cestou ovlivnění monocytů či lymfocytů.

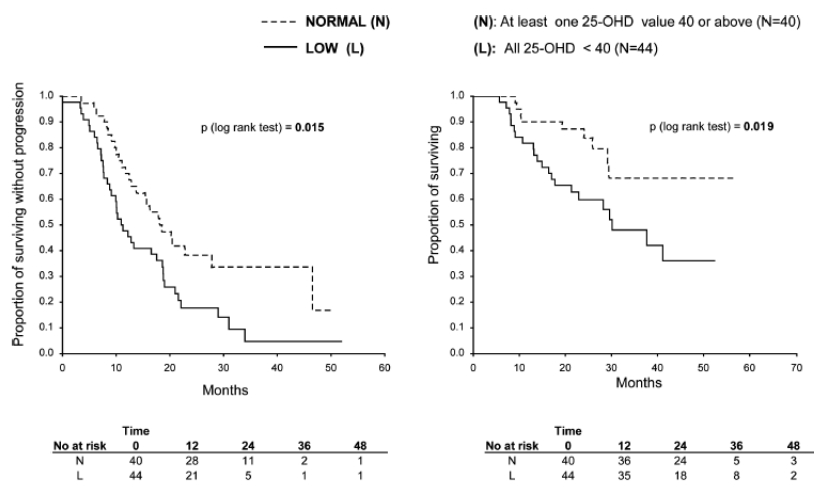
Obecně je populace žijící nad 40° severní šířky a pod 40° jižní šířky ohrožena nedostatkem vitamínu D. Mezi odborníky se vede diskuze, jakou hladinu vitamínu D lze považovat za dostačující (Vierucci et al., 2014). Zvažuje se cut-off 50 nmol/l (= 20 ng/l) (2011) a 75 nmol/l (= 30 ng/l) (Holick et al., 2011), přičemž v dnešní době panuje spíše názor, že pro plný biologický efekt jsou nutné hladiny 25-OH-D

⁵ Drábová K., Bienertová-Vašků J., Lokaj P., Dubská L., Obermannová R., Greplová K., Demlová R., Valík D., Stěrba J. (2013): [Vitamin D: Its physiology, pathophysiology and significance in etiopathogenesis of malignant diseases.] *Cas Lek Cesk.* 152(1):20-30.

překračující 75 nmol/l. Hodnoty 25-OH-D v krvi pod 25 nmol/l se považují za těžký deficit, 25-50 nmol/l za deficit, 50-75 nmol/l nedostatečnost a hodnoty nad 75 nmol/l představuje dostatek. Na souboru jedinců z kontrolní populace jsme popsali významnou sezonní variabilitu vitamínu D. U jarní skupiny (odběr březem–duben) byl medián koncentrace 25(OH) vitamínu D 42,7 nmol/l (95% interval spolehlivosti 21,9–90,1 nmol/l). V podzimní skupině (odběr září–říjen) byl medián koncentrace 25(OH) vitamínu D 70,8 nmol/l (95% interval spolehlivosti 37,0-137,5 nmol/l). Z dosažených hodnot vyplynulo, že v jarním období bylo 6 % jedinců s těžkým deficitem vitamínu D, 60 % s deficitem, 27 % mělo nedostatek a 7 % dostatek vitamínu D. V podzimním období jsme nezaznamenali těžký deficit vitamínu D, 13 % jedinců mělo deficit, 46 % nedostatek a 41 % dostatek vitamínu D (Obrázek 10). Sezonní výkyv v hladinách 25-OH-D má vliv (statisticky významný, klinicky nevýznamný) na hladinu plazmatických vápenatých kationtů a fosfátu (data zde neprezentují).

Nedostatek vitamínu D se zdá být významným faktorem v epidemiologii řady maligních onemocnění, včetně karcinomu prsu a kolorektálního karcinomu (Garland and Garland, 2006; Giovannucci et al., 2006; Gorham et al., 2007; Ng et al., 2009). V konsekutivních odběrech krve pacientů s metastatickým kolorektálním karcinomem jsme sledovali hladinu 25-hydroxycholecalciferolu a dalších laboratorních parametrů ve vztahu k přežití bez progresu a ve vztahu k celkovému přežití⁶. Do této studie bylo zahrnuto 84 pacientů léčených pro metastatický kolorektální karcinom v první linii režimem s oxaliplatinou nebo kombinací chemoterapie s bevacizumabem (Příloha 6 – Table 1). Medián PFS studiové skupiny pacientů byl 15,4 měsíce a medián celkového přežití byl 41,2 měsíce. Při hodnocení konsekutivních hladinu 25-OH-D se kohorta vyšetřovaných pacientů stratifikovala do tří podskupin i/ s alespoň jednou hodnotou nad 40 nmol/l, ii/ s proměnlivými hodnotami pod 40 nmol/l, iii/ se stabilními hodnotami pod 40 nmol/l (Příloha 6 – Figure 1). Parametry s významným vztahem ke klinickému průběhu onemocnění byly tyto: i/ chirurgický zákrok, ii/ hladina CEA (při cut-off 11 µg/l) a iii/ charakter sérových hladin 25-OH-D (Obrázek 11) (Příloha 6 – Table 2).

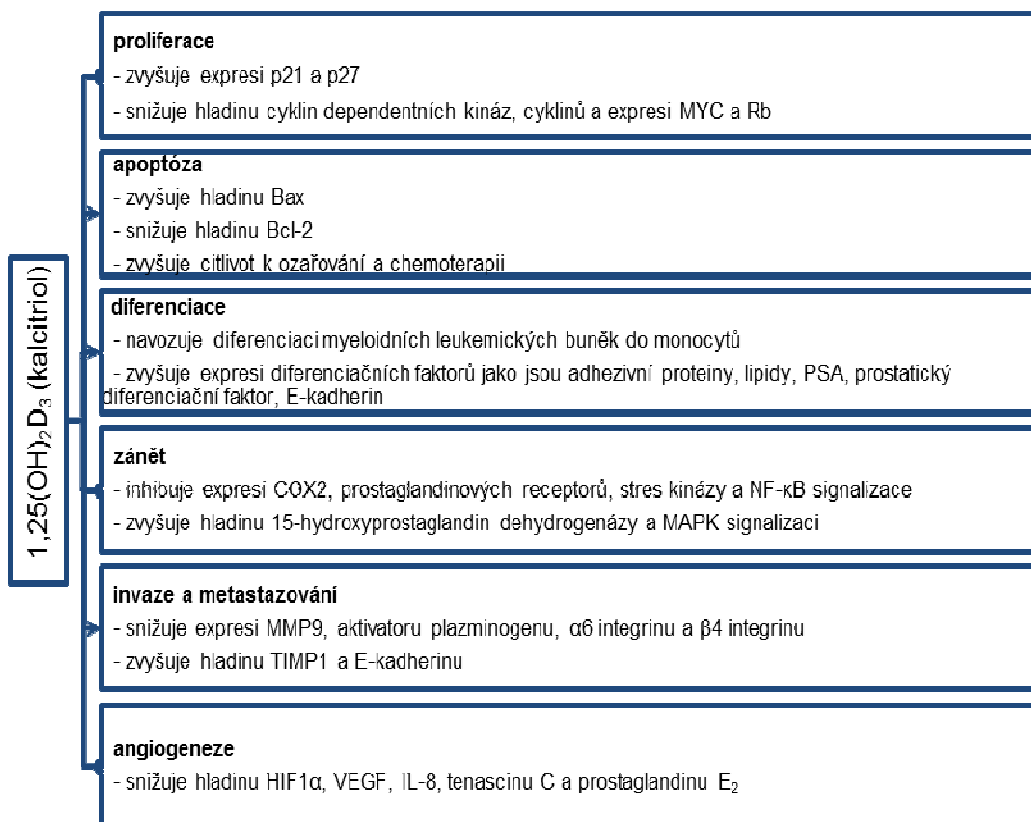
Obrázek 11: Parametry přežití pacientů s metastatickým kolorektálním karcinomem podle charakteru sérových hladin 25-OH-D.



⁶ Obermannova R., Dusek L., Greplova K., Jarkovsky, Sterba J., Vyzula R., Demlova R., Zdrzilova-Dubská L., Valik D. (2015): **Time-course pattern of blood 25-hydroxycholecalciferol is significant predictor of survival outcome in metastatic colorectal cancer: a clinical practice-based study.** *Neoplasma* 62(6):958-965. IF 1,865

Naše data potvrzují významnou roli hladin 25-OH-D v průběhu maligního onemocnění a to i v podmínkách pokročilého kolorektálního karcinomu. Vitamín D má pleiotropní protinádorový efekt (Obrázek 12); na subcelulární úrovni potlačuje proliferaci a stimuluje diferenciaci a apoptózu maligních buněk; v systémovém kontextu maligního procesu potlačuje prozánětlivé pochody, jevy spojené s metastazováním a invazí a také angiogenezi.

Vitamín D má také vliv imunomodulační; reguluje jak složky vrozené, tak adaptivní imunitní odpovědi. Prozánětlivé působky jako je IFN γ (Edfeldt et al., 2010) a TNF α (Pryke et al., 1990) stimuluje produkci vitamínu D zvýšením exprese CYP27B1 v buňkách monocytární řady a zánětlivé cytokiny a agonisté Toll-like receptoru zvyšují expresi CYP27B1 a VDR dendritických buňkách (Szeles et al., 2009). Na úrovni adaptivní imunitní odpovědi řada subpopulací T-lymfocytů exprimuje VDR a je cílovou buňkou pro působení vitamínu D (Cantorna, 2011), byť bez klíčového vlivu na primární funkci T-lymfocytů. 1,25(OH) $_2$ vitamín D $_3$ je spíše modulátorem imunitní odpovědi zprostředkované T-lymfocyty. V různých myších modelech autoimunitního onemocnění vedla absence VDR k horšímu průběhu nemoci (Mayne et al., 2011; Motrich et al., 2009). V *in vitro* podmínkách potlačoval 1,25(OH) $_2$ vitamin D $_3$ signální dráhu NF- κ B nezbytnou pro aktivaci Th-lymfocytů (Griffin et al., 2007), zvyšoval aktivitu imunosupresivních T-regulačních lymfocytů (Cantorna and Mahon, 2004) a blokoval vznik Th17 a Th9 buněk důležitých v patogenezi různých autoimunitních a zánětlivých onemocněních (Palmer et al., 2011). Obecně je tedy působení vitamínu D stimulační na vrozenou obranyschopnost a imunosupresivní na adaptivní složku imunitní odpovědi, především T-lymfocyty, což také zčásti může vysvětlovat pozorovaný protinádorový efekt vitamínu D.



Obrázek 12: Molekulární a buněčné mechanismy protinádorového efektu kalcitriolu.

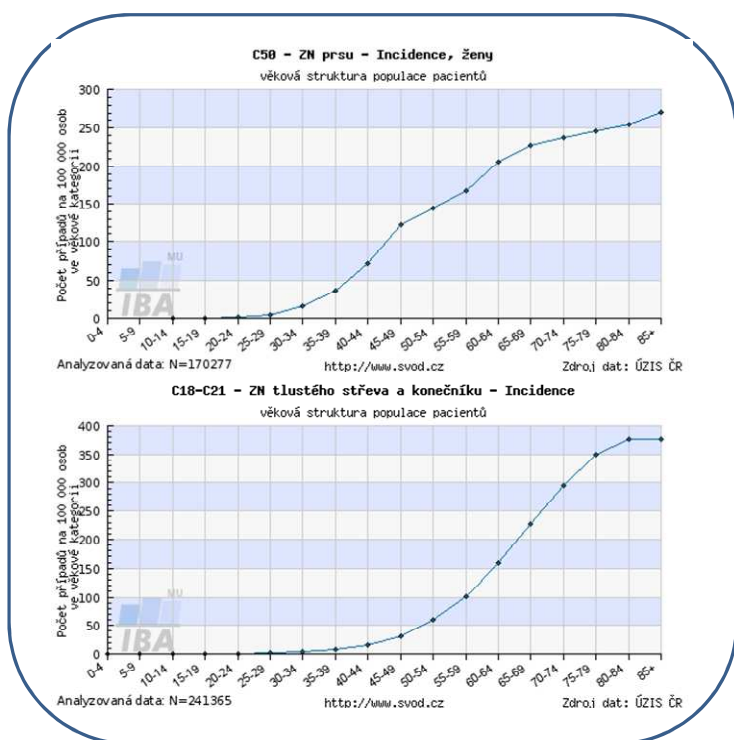
VĚK

Incidence většiny solidních malignit se zvyšuje s věkem (Obrázek 13) (Anisimov, 1983; Balducci and Ershler, 2005; Parkin et al., 2001).



Výskyt malignit ve vyšším věku je dán dvěma hlavními faktory i/ v buňkách se s časem **akumulují mutace** a zároveň ii/ v organizmu dochází k **poruchám udržení homeostázy** nejvíce díky změnám endokrinního a imunitního systému, jež umožňují buňkám v pozdním stádiu kancerogeneze přežít (DePinho, 2000). Významným protinádorovým nástrojem, který má každá buňka geneticky zakódován, je program **buněčné senescence**, který vede k nevratnému zastavení buněčné proliferace a růstu buňky. Proces buněčné senescence je doprovázen určitými změnami buněčného fenotypu, které jsou spojeny s patofyziologickými procesy asociovanými se stárnutím,

např. benigní hyperplazie prostaty (Choi et al., 2000) či aterosklerotické léze (Vasile et al., 2001). Buněčná senescence je kontrolována tumor supresorovými proteiny p53, Rb, p16^{INK4a}, jejichž dysfunkce pak vede k nenavolení senescence, což může přispět k maligní transformaci (Campisi, 2005, 2000; Kim Sh et al., 2002). Replikativní senescence je spojena se zkracováním telomer (Kim Sh et al., 2002). Buněčná senescence vede k poškození DNA a aberacím buněčných struktur. V buňce pak vznikají neoantigeny, na které lidský organizmus reaguje chronickou zánětlivou reakcí, která se s věkem přispívá k onemocněním, jako je rakovina, ateroskleróza či artritida (Freund et al., 2010).



Obrázek 13: Věková závislost incidence dvou významných maligních onemocnění v České republice.

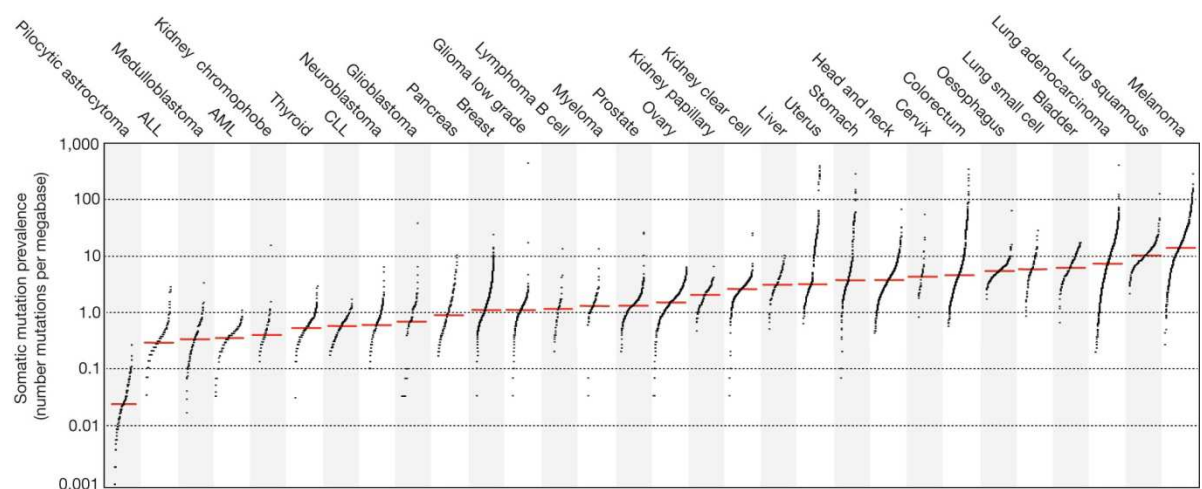
NAHOŘE – karcinom prsu. DOLE – karcinom tlustého střeva a konečníku. Data byla získána z (Dusek et al., 2005).

Ke zvyšování incidence většiny solidních malignit s věkem přispívá také vyčerpání imunitního systému – **imunosenescence**, kdy s věkem dochází ke snížení funkce efektorů přirozené i adaptivní imunity (Fulop et al., 2013), což vede nejen k nižší odolnosti vůči infekčním chorobám, ale také k méně efektivnímu protinádorovému dohledu (Fulop et al., 2011). V souvislosti s náchylností k chorobám se hledají biomarkery imunosenescence, které by predikovaly kapacitu imunitního systému a také odpovídavost na protiinfekční vakcíny (Pawelec, 2014). Pro tento účel byl ve Švédsku navržen koncept *“immune risk profile”* (IRP), který obsahuje absolutní a proporční deficit v počtu cirkulujících B-lymfocytů, snižování poměru CD4/CD8 a nárůst proporce T-lymfocytů v pozdním stádiu diferenciaci po antigenní stimulaci (např. CD8+ CD27- nebo CD28-)

(Wikby et al., 2008). Data o vztahu parametru IRP k vztahu k nádorovým onemocněním, ať už incidenci, průběhu léčby, eventuálně predikci odpovědi na protinádorovou imunoterapii, nejsou.

ŽIVOTNÍ STYL

Faktor životního stylu se překrývá s nutričním stavem a má dopad na většinu zmíněných systémových faktorů. Do faktoru životního stylu se promítají socioekonomické faktory. Epidemiologické studie ukazují, že **aktivní životní styl** je spojený s nižším výskytem kolorektálního karcinomu, rakoviny prsu, endometria, karcinomu prostaty (Eliassen et al., 2010; Harriss et al., 2009; Samad et al., 2005; Thune and Furberg, 2001; Wolin et al., 2009). Do životního stylu se promítají také faktory životního prostředí, které lze rozdělit schematicky na negativně a pozitivně působící. Mezi negativně působící lze rozdělit na fyzikální (např. UV a ionizační záření) a chemické (produkty rostlin a mykotoxiny – aflatoxin, kovy – chrom, nikl, azbest, azobarviva aj.) **karcinogeny**, jež způsobují mutace protoonkogenů a tumorsupresorových genů. Mutagenese spojená s karcinogeny významně přispívá k míře somatických mutací v maligních buňkách. Z tohoto důvodu není překvapením, že největší množství somatických mutací se nachází v DNA buněk maligního melanomu ve spojení s expozicí UV záření, plicních tumorů ve spojení s kouřením, a rakoviny močového měchýře v spojení s expozicí toxickým nutrietům (Obrázek 14). Vysoký výskyt somatických mutací má pak **kauzální souvislost s maligní transformací buňky**, což vede jednak ke vzniku tumoru. Na druhé straně vysoká prevalence somatických mutací **zvyšuje imunogenicitu nádoru**, což vede k odpovědi na imunoterapeutika u zmíněných vysoce mutovaných malignit (anti-PD1 u maligního melanomu a nemalobuněčného karcinomu plic a intravezikální BCG vakcína u nádoru močového měchýře). Prediktivní hodnota vysokého počtu mutací a terapeutického efektu imunoterapie se dále potvrdila zvýšenou mírou terapeutických odpovědí u pacientů s NSCLC-kuřáků oproti nekuřákům léčených pro pokročilé onemocnění nivolumabem v monoterapii (Hellmann et al., 2014).



Obrázek 14: **Výskyt somatických mutací u jednotlivých typů malignit.**

Každá tečka představuje jeden vzorek, horizontální červená linka ukazuje medián. Na ose y je počet zachycených somatických mutací na 1 megabázi. Převezato z (Alexandrov et al., 2013; Lawrence et al., 2013)

KOMORBIDITY

Problematika komorbidit a vzniku a rozvoje onkologických onemocnění souvisí jednak s medikací, ale také přímo s interkurentními onemocněními. Zmíněna již byla souvislost maligních onemocnění s infekčními chorobami či primárními imunodeficity. Pakliže nedostatečná funkce imunitního systému vede k vyšší incidenci maligních onemocnění, nabízí se úvaha, zda při automunitních onemocněních, kdy se cílem imunokompetentních buněk stávají danému jedinci vlastní buňky, bude imunitní systém efektivněji likvidovat také nádorové buňky. A analogickou otázkou si lze klást také v případě alergií a hypersenzitivit, které jsou výsledkem nadměrné neadekvátní imunitní reakce. **Je tedy autoimunita či alergie v anamnéze spojena s nižším rizikem maligního onemocnění?** Jednoznačná odpověď na tuto otázku z podstaty komplexnosti problematiky imunopatologických stavů neexistuje.

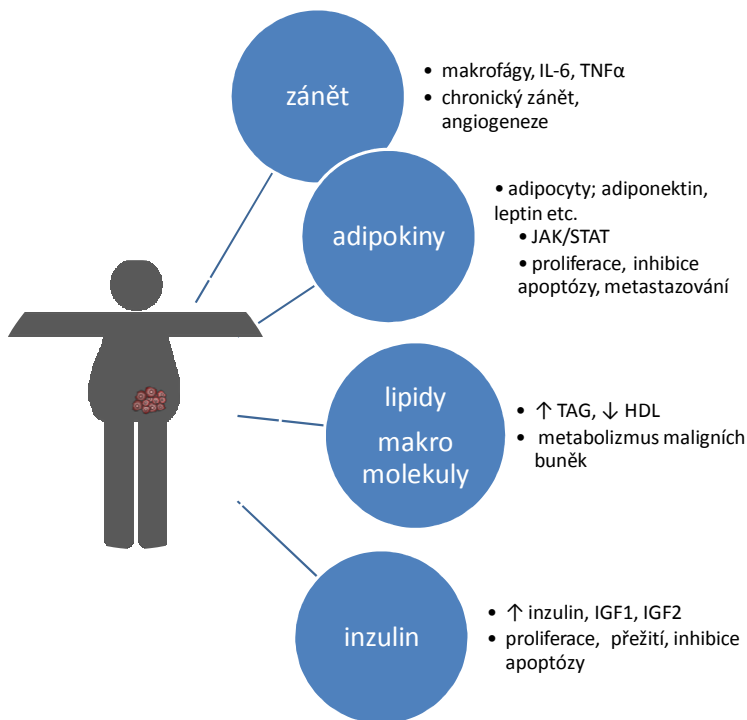


Co se týká **alergií**, převažují práce prokazující inverzní asociaci mezi alergií v anamnéze a výskytem malignity, o něco méně prací neprokazuje významnou asociaci a část prací popisuje pozitivní korelaci mezi alergiemi a rakovinou (Sherman et al., 2008). Při podrobnější analýze studií zabývajících se epidemiologií malignit ve vztahu k alergiím bylo zjištěno, že **inverzní asociace** alergie a malignity se vyskytuje spíše tam, kde se jedná o rakovinu vznikající primárně v tkáni či orgánu přicházejícími do kontaktu s okolním prostředím jako jsou glie, ústa a hrtan, tlusté střevo a konečník, slinivka, kůže, děloha a cervix, močový měchýř, gastrointestinální trakt a plíce (mimo asthma) (Sherman et al., 2008). Většina studií potvrdila, že asthma v anamnéze je asociováno se vznikem karcinomu plic, kdy jeden z patofyziologických důvodů pro tuto asociaci je chronický zánět, který je obecně pronádorový (viz str. 89). Mechanizmy stojící za pozitivními či negativními asociacemi mezi alergií (převažující Th2 imunitní reakcí) a malignitou lze shrnout do 4 oblastí (Dalessandri and Strid, 2014): i/ inverzní korelace může být dána obecně **vyšším imunitním dohledem** daného organismu, který zajišťují imunitní efekторы včetně gammadelta T-lymfocytů, eozinofilů, mastocytů, tumor-specifické IgE a to je doprovázeno vyšší Th2 komponentou imunitního systému, která přispívá k reparaci poškozené tkáně a tlumí kancerogenní zánět (Burnet, 1957); ii/ inverzní korelace může být dána **zvýšenou profylaxí na sliznicích a tkáňových površích** exponovaných vnějšímu prostředí, kdy se předpokládá že Th2 imunita odstraňuje a neutralizuje škodlivé a potencionálně karcinogenní látky z prostředí dřív, než mají svou genotoxickou aktivitu v tkáních na rozhraní vnějšího prostředí a také dřív než se transportují do celého organismu (Profet, 1991); iii/ pozitivní korelace může být dána **překlopením rovnováhy směrem k Th2** imunitní reakci, což je spojeno s utlumením cytolytické Th1 imunity s působením imunopresivního IL-10 a protinádorově neefektivních typů imunoglobulinů (IgE, IgG4) (Josephs et al., 2015; Josephs et al., 2013); iv/ pozitivní korelace je spojena s antigenní stimulací a **chronickým zánětem**, kdy alergický zánět a oxidativní poškození tkáně přispívá ke vzniku kancerogenních mutací a Th2 reakce v místě zánětu podporuje angiogenezi, růst a invazivitu nádoru (McWhorter, 1988).

V případě **autoimunitních onemocnění** zpravidla převažuje Th1 imunitní odpověď a obecně zde lze říci, že pokud je autoimunita spojena s **chronickým zánětem**, je rizikovým faktorem pro vznik maligního onemocnění; příkladem mohou být zánětlivé střevní procesy IBD (např. Crohnova choroba), jež jsou asociovány se vznikem kolorektálního karcinomu (Askling et al., 2001b, 2001a).

V případě, že autoimunita není spojena se zánětem, můžeme pozorovat její protektivní vliv; epidemiologická data například ukázala, že u jedinců s **vitiligem**, jehož příčinou je autoimunitní destrukce melanocytů T-lymfocyty (van den Boorn et al., 2009), je pravděpodobnost vzniku maligního melanomu a nemelanomových malignit 3x nižší než v populaci bez vitiliga (Teulings et al., 2013). Cytotoxická reakce proti normálním melanocytům manifestující se jako vitiligo se zjevně překrývá s imunitní reakcí proti maligním melanomovým buňkám, jelikož u pacientů s pokročilým melanomem je vitiligo pozitivní prognostický faktor (Nordlund et al., 1983), což se potvrdilo i u melanomů léčených imunoterapií (Teulings et al., 2015).

Z epidemiologických dat je zřejmý vztah mezi **nadváhou** a zvýšeným rizikem rakoviny tlustého střeva, prsu (u postmenopauzálních žen), endometria, močového měchýře, pankreatu a ezofagu (Calle and Kaaks, 2004), což je dále podpořeno pozorování asociace dlouhověkosti s kalorickou restrikcí (Ball et al., 1947; Fontana and Partridge, 2015). Nadváha a adipozita jsou asociovány prostřednictvím zvýšené produkce adipokinů se sníženou citlivostí k inzulinu, což vede k hyperinzulinémií a hyperglykémii. **Adipokiny** regulují citlivost k inzulinu, zánětlivé procesy a angiogenezi; adipocyty produkují prozánětlivé cytokiny IL-6, TNF α a chronický zánět je obecně pronádorový (viz také dále). Na patogenezi maligního onemocnění se u obézních lidí podílí také aktivace inzulinové/IGF signální dráhy, která přispívá k popsané asociaci DM II a maligních onemocnění včetně karcinomu prsu (Michels et al., 2003), kolorekta (Ma et al., 2004), jater (Vigneri et al., 2009), pankreatu (Michaud et al., 2007) a endometria (Vigneri et al., 2009).



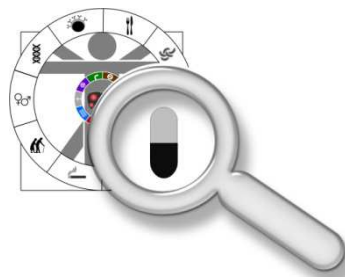
Obrázek 15: Hlavní faktory spojující obezitu a rozvoj nádorových onemocnění.

Adipózní tkáň přispívá k produkci prozánětlivých působků, které jsou produkovány přímo adipocyty a také makrofágy sídlícími v nádorové tkáni (Weisberg et al., 2003). Hlavními prozánětlivými cytokiny adipózní tkáně jsou TNF α , IL-6 a PAI1. Působení TNF α je spojeno s chronickým zánětem a podporuje nádorovou angiogenezi (Leibovich et al., 1987) a metastazování (Orosz et al., 1993). Adipózní tkáň produkuje významné množství (až 35 % u zdravých jedinců (Mohamed-Ali et al., 1997)) cirkulujícího IL-6, a tak hladina tohoto cytokinu koreluje s BMI (Kern et al., 2001). Signální dráha IL-6 zahrnuje aktivaci onkoproteinu STAT3 (Bromberg et al., 1999) a role IL-6 při rozvoji malignity byla potvrzena u myšího modelu (Park et al., 2010). STAT3 je součástí signální dráhy leptinu (Banks et al., 2000), což je významný adipokin produkováný ve značné

míře adipózní tkáni obézních jedinců. Naopak adiponektin je produkován adipózní tkáni obézních jedinců v menší míře v porovnání se zdravými. Adiponektin potlačuje proliferaci buněk karcinomu prostaty a tlustého střeva (Bub et al., 2006; Kim et al., 2010). K metabolismu a proliferaci/přežívání maligní buňky přispívá také dostupnost lipidů a dalších makromolekul a inzulinová signalizace. Inzulin, IGF-1, IGF-2 jsou ligandy povrchových receptorů (INSR, IGF1R, IGF2R), jejichž aktivace vede k signalizaci prostřednictvím PI3K/Akt a Ras/Raf dráhy, což má pronádorový efekt díky zvýšené buněčné proliferaci a inhibované apoptóze (Engelman, 2009; Schubbert et al., 2007).

MEDIKACE

Onkologická onemocnění jsou dominantně onemocnění postihující starší jedince, kteří jsou často dlouhodobě exponováni medikací pro léčbu chronických onemocnění. Na tomto místě je třeba zmínit dlouhodobé užívání kortikosteroidů, antidiabetik (metformin), inhibitorů protonové pumpy, betablokátorů a antilipidemik.



Metformin potlačuje proliferaci nádorových buněčných linií (He et al., 2015), což se potvrdilo na epidemiologických studiích (Tokajuk et al., 2015). Efekt metforminu na buněčné úrovni se skládá z toxického efektu na mitochondrie, interferencí s cyklem trikarboxylových kyselin a syntézou nukleotidů, metformin inhibuje mTOR signální dráhu (Jara and Lopez-Munoz, 2015). Randomizovaná studie fáze III prokázala protektivní efekt ročního užívání nízkodávkovaného (250 mg denně) metforminu pro vznik metachronních adenomů a polypů u nediabetiků po polypeptomii, což potvrzuje úlohu metforminu při prevenci maligních onemocnění (Higurashi et al., 2016; Chan, 2016).

VÝSTUP 4: ANTIKOAGULAČNÍ LÉČBA A TERAPEUTICKÁ INHIBICE AGREGACE KREVNÍCH DESTIČEK VE VZTAHU K PREVENCI A LÉČBĚ NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ

Zajímavou oblastí je antikogulační a antiagregační léčba rozvoji maligních onemocnění. Trombocyty obsahují řadu působků regulující angiogenezi, zánět, chemotaxi imunokompetentních buněk, adhezivních molekul atd. (Příloha 7 – Tab. 1)⁷. Vlivem maligních buněk a nádorového stroma dochází k agregaci a aktivaci trombocytů, což může potencovat rozvoj maligního onemocnění (podrobněji pak od str. 85). Relevantní otázkou je pak vliv antiagregační a antikoagulační terapie na vznik trombotických stavů u onkologických pacientů, ale také na klinický průběh maligního onemocnění. Diskutovanou otázkou pak je, zda má léčba heparinem a LMWH pozitivní efekt na parametry přežití u pacientů s již diagnostikovaným tumorem a zda ovlivňuje rozvoj onkologických onemocnění. Je otázkou, zda má antikoagulační léčba heparinem a LMWH léčebný účinek u nádorů. Předpokládá se inhibiční efekt nízkomolekulárních heparinů na proces angiogeneze, zánětu a vliv na regulaci buněčné adheze, proliferace, mobility, růstových a koagulačních faktorů (Mousa, 2004). Byl popsán pozitivní efekt heparinu na diferenciaci a apoptózu (Kakkar et al., 2004). LMWH může prodloužit přežívání pacientů s pokročilým maligním onemocněním (Ahmad and Ansari, 2011). Využití protinádorového potenciálu heparinu/LMWH v praxi bude možné až po ověření v klinických studiích. Profylaktické nebo léčebné podání při venozní trombembolii u pacientů s nádorem vyžaduje pečlivou monitoraci nežádoucích účinků, vzniku heparinem indukované trombocytopenie, krvácivých komplikací nebo lékových interakcí.

Antitrombotická léčba ve smyslu antitrombocytárních přípravků zahrnuje inhibici cyklooxygenázy-2 (kyselina acetylsalicylová/aspirin), inhibici fosfodiesteráz (dipyridamol; mopidamol/RA-233), protilátky proti glykoproteinu IIb-IIIa (intravenózní Abciximab, perorální XV459), inhibici PAR-1 (vorapaxar, atopaxar), inhibici P₂Y₁₂ receptoru (klopidogrel, prasugrel, tiklopidin, elinogrel a další).

⁷ Bencsiková B., Greplová K., Pilátová K., Volejníková Z., Valík D., Klement G. L., Zdražilová-Dubská L. (2014): [Platelets in the pathogenesis of solid tumors.] *Cas Lek Cesk.* 153(2):78-85.

Nejběžnějším inhibítozem agregace krevních destiček je kyselina acetylsalicylová (aspirin). Metaanalýza 4 randomizovaných studií zhodnotila efekt aspirinu versus placebo v primární a sekundární prevenci cévních příhod a rizika kolorektálního karcinomu v průběhu 20letého sledování 14033 subjektů. Pětiletá léčba aspirinem snižuje riziko karcinomu proximální části tlustého střeva o 70 % a také snižuje riziko rektálního karcinomu. Vyšší dávky než 75 mg nepřinášejí větší benefit a velmi nízké dávky aspirinu (30 mg denně) neměly význam v prevenci kolorektálního karcinomu. Při pravidelném užívání 75 mg aspirinu/den došlo k téměř 20% snížení mortality na kolorektální karcinom, tento přínos se začal projevovat již po pátém roce užívání aspirinu (Rothwell et al., 2010). Snížení incidence i šíření adenokarcinomů v gastrointestinální oblasti je třeba ozřejmit v prospektivních studiích u onkologických onemocnění, s ohledem také na rizika dlouhodobého užívání aspirinu, zejména krvácení.

Výsledky klinických hodnocení vztahu antitrombocytárních přípravků ve vztahu k prognóze onkologických onemocnění jsou shrnuty v (Tabulka 2).

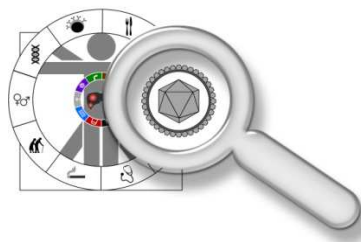
Experiment na myším modelu ukázal, že inhibice agregace krevních destiček aspirinem a/nebo klopido-grelem potlačuje hepatokarcinogenezi po chronické infekci virem hepatidy B (Sitia et al., 2012). Abciximab inhibuje agregaci destiček a je indikován k prevenci kardiálních ischemických komplikací zejména po perkutánních intervencích (angioplastikách), u akutních koronárních syndromů. Předpokládá se antiangiogenní a také protinádorový účinek abciximabu. Blokáda GPIIb/IIIa vede k ovlivnění adheze nádorových buněk, jejich metastazování a invazi (Cohen et al., 2000).

Inhibitor nebo modulátor trombocytů	Typ nádoru	Závěry klinické studie
Aspirin	karcinom tlustého střeva, SCLC, ledviny	bez vlivu na celkové přežívání (Creagan et al., 1991; Lebeau et al., 1993; Lipton et al., 1982)
	karcinom prsu	snížení recidivy a mortality (Creagan et al., 1991)
	NSCLC	delší přežívání po resekci (Fontaine et al., 2010)
	karcinom prostaty	přínos v kontrole PSA u pacientů léčených radioterapií a snížení mortality po prostatektomii nebo radioterapii (Choe et al., 2010; Choe et al., 2012)
Klopidogrel	karcinom prostaty	přínos v kontrole PSA u pacientů léčených radioterapií (Choe et al., 2010)
Mopidamol (RA-233)	karcinom tlustého střeva, ovariální karcinom	bez vlivu na přežívání (Nieminen et al., 1990)
	NSCLC	prodloužení přežívání po resekci, nikoliv u metastatického onemocnění (Blaha et al., 1989; Wilke et al., 1988; Zacharski et al., 1988)
Dipyridamol	pokročilý karcinom tlustého střeva a NSCLC	bez vlivu na přežívání (Vallejo et al., 1995; Wilke et al., 1988)

Tabulka 2: *Klinické výsledky léčby inhibitory krevních destiček u pacientů s nádory.*

NSCLC: nemalobuněčný karcinom plic, SCLC: malobuněčný karcinom plic, PSA: prostatický specifický antigen

INFEKCE



Existuje celá řada infekčních onemocnění spojených se vznikem onkologických onemocnění. Příkladem může být infekce RNA viry, které jsou rychle transformující, nesoucí ve svém genomu přímo onkogen (např. v-src, v-ras), čímž poskytují buňce nezávislost na mitogenních stimulech. Dále jsou to **viry pomalu transformující**, jež aktivují protoonkogen, vedle kterého se integrovaly. U člověka byla prokázána pouze transformace lidským lymfotropním virem typu I (HTLV-1), který je spojen s výskytem T-leukemie/lymfomu dospělých (ATLL, adult T-cell leukemia lymphoma) zejména v Asii a karibské oblasti. Onkogenní potenciál mají i některé DNA viry, jež kódují proteiny, které interagují s nádorovými supresory (p53, RB, P300/CBP). Infekce těmito viry jsou spojeny s onkologickými onemocněními, např. lidský papillomavirus (HPV) a karcinom děložního čípku a nádory hlavy a krku; virus Epstein-Barrové (EBV) a Burkittův lymfom; virus hepatitidy B (HBV) a hepatocelulární karcinom; virus hepatitidy C (HCV) a hepatocelulární karcinom (Výstup 5); lidský herpesvirus typu 8 (HHV8) a Kaposiho sarkom; polyomavirus Merkelových buněk (MCV) a karcinomy Merkelových buněk (neuroendokrinní karcinomy kůže). Příkladem bakteriálního agens v asociaci s malignitou je ***Helicobacter pylori***, jež hraje významnou roli etiopatogenezi karcinomu žaludku (Sokic-Milutinovic et al., 2015). Malignity spojené s infekcí onkogenními viry se více projevují na pozadí imunodeficitů (Myskowski et al., 1990).

VÝSTUP 5: INFEKCE HCV V ETIOPATOGENEZI HEPATOCELULÁRNÍHO KARCINOMU

Hepatocelulární karcinom (HCC) je nejčastějším primárním nádorem jater. Incidence primárního nádoru jater je v České republice kolem 9/100 tis. obyvatel, přičemž výskyt tohoto typu nádoru je v různých oblastech světa odlišný s maximální incidencí v asijských zemích (DUŠEK et al., Verze 7.0 [2007]). Chronická infekce HCV je nejvýznamnějším rizikovým faktorem pro vznik hepatocelulárního karcinomu; pravděpodobnost rozvoje HCC je 17-násobně vyšší u infikovaných HCV oproti kontrolní populaci (Donato et al., 1998). Celosvětová prevalence infekce HCV se pohybuje v běžné populaci kolem 3 %. V roce 2001 bylo pomocí sérologického přehledu zjištěno, že prevalence protilátek anti-HCV v běžné populaci ČR je 0,2 % (Nemecek, 2003).

V roce 2010 jsme analyzovali 25 pacientů s HCC z hlediska přítomnosti HCV Ag a anti-HCV Ab⁸. Výsledkem byl záchyt infekce HCV u 5 (20 %) pacientů s HCC. Zachycen byl různý stupeň virémie odpovídající detekované koncentraci HCV Ag a zároveň i přítomnost anti-HCV protilátek (Příloha 8 – str. 27). U 20 (80 %) případů HCC byly hodnoty v obou testech jednoznačně negativní.

Literatura uvádí 44 %-64 % výskyt markerů infekce HCV u nemocných s HCC v Itálii (Fasani et al., 1999; Stroffolini et al., 1999), 27 %-58 % u případů s HCC ve Francii, 60 %-75 % ve Španělsku a 80 %-90 % v Japonsku (Yoshizawa, 2002). V USA představují případy HCC spojené s infekcí HCV 50 %-60 % případů HCC (El-Serag, 2002). Ve všech jmenovaných zemích je incidence HCC vyšší než v České republice, přičemž výskyt primárního nádoru jater v Japonsku je podstatně vyšší než v ČR (30/100 tis. Obyvatel) (DUŠEK et al., Verze 7.0 [2007]). Nižší prevalence infekce HCV u českých

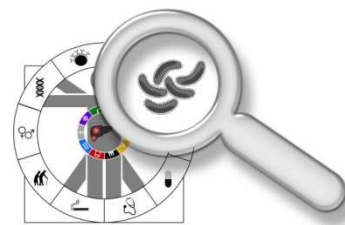
⁸ Rampulová I., Kazlepková E., Dubská L. **Serologie infekční hepatitidy C (HCV): HCV u hepatocelulárního karcinomu.** Sborník Laboratorní diagnostika v onkologii 2010, Masarykova univerzita 2010, ISBN 978-80-210-5188-1.

pacientů s hepatocelulárním karcinomem v porovnání s ostatními zeměmi naznačuje, že v České republice se na rozvoji tohoto onemocnění podílejí do větší míry jiné rizikové faktory, než je chronická infekce HCV.

Patofyziologie hepatocelulárního karcinomu je spojena především s viry (hepatitis B, hepatitis C), a s jaterní cirhózou z jiných příčin (alkoholická, biliární, primární autoimunitní) a toxiny zevního prostředí (aflatoxiny, androgenní steroidní preparáty, produkty kouření tabáku, N-nitrosylované sloučeniny, pyrolizidinové alkaloidy a jiné); a patogeneticky s některými metabolickými onemocněními. Pokud infekce HCV nepřechází do chronicity, není rizikovým faktorem pro vznik hepatocelulárního karcinomu (nikdo z 25 vyšetřovaných pacientů s HCC neměl pozitivitu anti-HCV protilátek bez produkce HCV antigenu). Ve většině případů, však nedochází k dostatečné imunitní odpovědi, která by vedla ke kompletní eliminaci viru. V takovém případě přechází infekce HCV do chronicity, v jaterním parenchymu dochází ke vzniku chronického zánětu, na jehož podkladě pak dochází k jaterní kancerogenezi (Bowen and Walker, 2005).

MIKROBIOM

Lidský organismus je osídlen řadou **komezálních bakterií** osídluje všechny sliznice. Bakterií v lidském organismu je řádově 10^{14} jedinců spadajících do 1000 různých druhů (Lee and Mazmanian, 2010). Přítomnost bakterií na sliznicích slouží jako **biologická bariéra** proti patogenním mikroorganismům a přispívá k adekvátní funkci imunitního systému (Backhed et al., 2005; Gorbach, 1990). Střevní mikroflóru můžeme považovat za „**metabolický orgán**“, který interaguje s organismem lidského hostitele a který zajišťuje řadu funkcí, jež jsou pro lidský organismus esenciální (Tremaroli and Backhed, 2012). Střevní bakterie využívají cukry a proteiny z potravy a produkují vitamíny, aminokyseliny, ovlivňují vstřebávání iontů, podílí se na konverzi polyfenolů z potravy, podílí se na biotransformaci žlučových kyselin (Falony et al., 2006; Lefebvre et al., 2009; Macfarlane and Macfarlane, 2003). Porušení rovnováhy ve střevní mikroflóře, dysbióza, vede k nárůstu oportunních patogenů, kteří jsou za normálních okolností inhibováni komezálou (Barman et al., 2008). Dysbióza je spojena s řadou patologických stavů jako jsou zánětlivá střevní onemocnění (Collins, 2014), obezita (Bajzer and Seeley, 2006) a střevní polypy (Dulal and Keku, 2014; Nugent et al., 2014). V posledních letech se ukazuje, že mikrobiom především střevní hraje důležitou roli i při **vzniku kolorektálního karcinomu** (Belcheva et al., 2015; Feng et al., 2015; Hester et al., 2015).

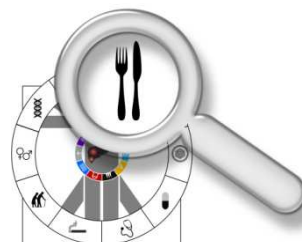


Studie ukazují, že se vznikem kolorektálního karcinomu souvívá především dysmikrobie spojená s prevalencí pro-zánětlivých oportunních patogenů, jako je **Fusobacterium** (Bashir et al., 2015; Castellarin et al., 2012; Gao et al., 2015; Ito et al., 2015), **Campylobacter** (Wu et al., 2013) a Enterococcaceae (Wang and Huycke, 2007; Wu et al., 2013) či mikroorganismů asociovaných s metabolickými poruchami např. Erysipelotrichaceae (Turnbaugh et al., 2009). Otázkou nicméně zůstává, zda jsou uvedené bakterie **příčinou nebo následkem** nádorového bujení v tlustém střevě. Byl navržen model „**bacterial driver-passenger**“, která předpokládá, že kancerogenezi kolorektálního karcinomu iniciují „**drivers**“ a po změně prostředí navozené tumorem dochází k množení oportunních bakterií („**passengers**“), pro něž okolí nádorového mikroprostředí generuje vhodné podmínky v podobě nutrientů či reaktivních kyslíkových radikálů a které mohou

dále propagovat kancerogenzi či naopak působit protektivně (Tjalsma et al., 2012). V této souvislosti je třeba zmínit, že recentní studie ukazují, že užívání penicilinu zvyšuje riziko kolorektálního karcinomu (Boursi et al., 2015). Efekt střevního mikrobiomu nicméně nekončí u karcinogeneze kolorektálního karcinomu, protože se ukazuje, že protinádorový efekt některých terapeutických látek je ovlivněn skladbou mikrobiomu (Dzutsev et al., 2015).

NUTRIČNÍ STAV

Na vztah nutričního vztahu a maligních onemocnění je možné pohlížet ze dvou základních úhlů. První je jistě nutriční a stravovací návyky a asociace jednotlivých položek diety s prevencí nebo naopak zvýšeným rizikem malignit. Z jiného úhlu se pak pohlíží na výživu a nutriční možnosti během terapie onkologicky nemocných.

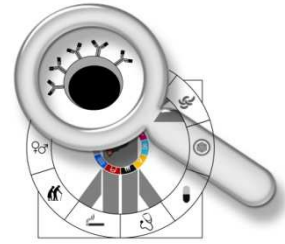


Efekt stravy na maligní onemocnění je značný; v roce 1981 se odhadovalo, že vznik 90 % případů gastrointestinálních malignit lze přičítat **složení stravy** (Doll and Peto, 1981) a to především ve spojení s konzumací nadměrného množství červeného masa a živočišných tuků (Vargas and Thompson, 2012). V oblasti vztahu stravovacích návyků a epidemiologie nádorových onemocnění je významná např. obezita asociovaná s vyšším rizikem karcinomu prsu, prostaty, pankreatu, ledviny, močového měchýře, vaječníků, cervixu a gastrointestinálních malignit (Bandera et al., 2015; Calle et al., 2003; Demark-Wahnefried et al., 2012; Reeves et al., 2007). Zvýšená incidence malignit a mortalita u obézních jedinců je multifaktoriální jev, který je spojený mimo jiné s chronickým zánětlivým stavem, které vytváří adipózní prostředí (Wensveen et al., 2015) (Obrázek 15, str. 31) a metabolickou dysregulací v nádorovém mikroprostředí.

Existuje celá řada publikací popisující vztah makro-, mikronutrientů a dalších složek potravy a maligních onemocnění. Z tohoto hlediska se zkoumá chemopreventivní účinek různých látek jako resveratrol, kurkumin, genistein a celé řady dalších **přírodních fytochemických látek** (Bode and Dong, 2000; Fridlender et al., 2015; Malhotra et al., 2015; Pabla et al., 2015; Russo et al., 2016). Z nutričního hlediska hrají určitou roli v patofyziologii maligních onemocnění hypovitaminózy. Například ovoce a zelenina s obsahem **vitamínu C** má protektivní vliv z hlediska gastrointestinálních malignit (Fang et al., 2015; Heine-Broring et al., 2015). Efekt tohoto vitamínu se spojuje především s jeho redoxními funkcemi a dále s tím, že slouží jako kofaktor řady enzymů (Naidu, 2003). Existuje několik klinických hodnocení testující vysokodávkovaná vitamín C v léčbě maligních onemocnění s cílem zvýšení účinnosti chemoterapie se současným snížením toxicity (Ma et al., 2014; Monti et al., 2012). Protektivní vliv má také příjem **vitaminu A** a β -karotenu, což se ukázalo např. na metaanalýzách epidemiologických studií s plicními tumory a karcinomem tlustého střeva (Heine-Broring et al., 2015; Yu et al., 2015). Retinol a deriváty vitamínu A ovlivňují buněčnou diferenciaci, proliferaci a apoptózu. V současnosti probíhá klinické hodnocení testující suplementaci retinoidy jako prevenci maligních onemocnění u onkologických pacientů (NCT01935960). Vztah vitamínu D respektive hypovitaminózy D byl podrobněji popsán v kapitole Endokrinologický status, str. 24.

IMUNITNÍ SYSTÉM

Racionální úvahy spojující imunitní systém a eliminaci maligních onemocnění vznikly na konci 19. století, kdy se pozorování vztahu kožních bakteriálních infekcí a regrese nádorového bujení překlopila do terapeutických postupů u onkologických pacientů (více kapitola Protinádorová imunoterapie, str. 61). Koncept dozoru imunitního systému nad maligními onemocněními byl formulován Burnetem „*In large long-lived animals, like most of the warm-blooded vertebrates, inheritable genetic changes must be common in somatic cells and a proportion of these changes will represent a step toward malignancy. It is an evolutionary necessity that there should be some mechanism for eliminating or inactivating such potentially dangerous mutant cells and it is postulated that this mechanism is of immunological character*” (Burnet, 1970). V dnešní době je koncept nádorové imunologie rozpracován do detailů na buněčné a molekulární úrovni (více v kapitole Nádorová imunoeditace, str. 47) a role imunitního systému při eliminaci maligních onemocnění je potvrzena úspěchy protinádorové imunoterapie (Anguille et al., 2014; Daud, 2015). Vztahu nádorového bujení a imunitního systému jsou věnovány následující stránky.



IMUNITNÍ ODPOVĚĎ - ZÁKLADNÍ PRINCIPY

Obrana organismu je zajišťována mechanickými a chemickými **bariérami**. Další obrannou úroveň mnohobuněčného organismu je funkční imunitní systém, který pomocí buněk a látek (Tabulka 3) eliminuje tělu nebezpečné buněčné i nebuněčné struktury. Imunitní systém má schopnost rozeznávat patogeny od virů po mnohobuněčné parazity, narušené buňky vlastního organismu, a zároveň nevytvářet imunitní odpověď proti normálním tělu vlastním strukturám. Druhou základní vlastností imunitního systému je efektorová funkce, která následuje po rozeznání škodlivého a vede k jeho eliminaci. Existují dvě základní složky imunitní odpovědi i/ **přírozená**, která nevyžaduje specifický antigenní stimul, a ii/ **adaptivní**, která je specifickou odpovědí na prezentaci antigenu a vytváří imunitní paměť (Tabulka 3). Obě složky imunitního systému jsou funkčně propojeny na mnoha úrovních a dochází k jejich vzájemné stimulaci a regulaci, např. makrofágy a dendritické buňky prezentují antigenní stimulaci Th-lymfocytům, opsonizace protilátkami umožňuje aktivaci komplementu *etc.*

Složka imunitní odpovědi	Buněčná	Humorální
Přírozená = neadaptivní, nespecifická	neutrofily, makrofágy/monocyty, dendritické buňky, eozinofily, bazofily/mastocyty, NK-buňky, $\gamma\delta$ T-lymfocyty*, NKT-buňky*, NKT-like buňky*	Komplement, Chemokiny
Adaptivní = antigenně specifická	$\alpha\beta$ T-lymfocyty, B-lymfocyty	Protilátky

Tabulka 3: Rozdělení složek imunitní odpovědi.

* $\gamma\delta$ T-lymfocyty, NKT-buňky a NKT-like buňky mají vlastnosti přírozené i adaptivní imunity

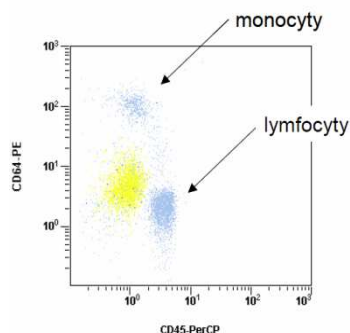
PŘIROZENÁ IMUNITNÍ ODPOVĚĎ

Přírozená imunitní odpověď je zpravidla zahájena stimulací tzv. PRR (angl. *pattern recognition receptors*, česky receptory rozeznávající molekulové vzory), které rozeznávají struktury (vzorce = patterns), jež jsou na povrchu mikroorganismů (Medzhitov, 2007), případně je exprimují vlastní ale narušené buňky (Matzinger, 2002). Odpověď na tyto stimuly je rychlá, generická a nevytváří paměť. Nástrojem přírozené složky imunitního systému je tvorba **zánětu** v místě infekce. Infikované nebo narušené buňky produkují eikosanoidy (např. prostaglandin), cytokiny a leukotrieny (chemotaxe leukocytů) (Ogawa and Calhoun, 2006). **Interferony** mají antivirový efekt (potlačují proteosyntézu). Růstové faktory podporují produkci dalších efektorových buněk imunitního systému. **Komplementový systém** představuje kaskádu aktivace specifických proteinů, jejíž koncové působky mají schopnost atakovat povrch cizorodých či abnormálních buněk. Lidský komplement je typicky aktivován navázáním protilátek na povrch mikroorganismů nebo navázáním složek komplementu na karbohydráty na povrchu patogenů. Následně dochází k rychlé amplifikaci signálu v proteolytické aktivaci komplementové kaskády a rychlé lýze mikroba. Během

aktivace komplementu vznikají působky, které přitahují buňky imunitního systému, zvyšují permeabilitu cév a opsonizují povrch patogena. **Fagocytóza** je schopnost některých leukocytů pohltit a zpracovat patogeny, částice případně buňky. Činnost fagocytů může být spuštěna primárně, když aktivně prohledávají organismus na přítomnost patogenů, nebo sekundárně, když jsou atrahovány cytokiny/chemokiny v případě porušených buněk. Fagocytovaná částice je pak lyzována enzymy a/nebo zlikvidována v procesu oxidativního vzplanutí. Schopnost fagocytózy mají neutrofilů (= mikrofágy), které při akutní fázi zánětu migrují z krve do místa poškození např. bakteriální infekcí ve tkáni. Makrofágy sídlí ve tkáních, produkují značné množství enzymů, složek komplementu, cytokinů (např. IL-1) a mají vysokou fagocytární aktivitu. Makrofágy fungují také jako antigen prezentující buňky (APC), které vystavují pohlcené peptidy v komplexu MHC II a stimulují tak T-lymfocyty adaptivního imunitního systému. Dalšími tkáňovými APC jsou dendritické buňky s maximální fagocytární a antigen prezentující aktivitou, jejichž funkce je spojena především s obranou proti mnohobuněčným parazitům a alergickou reakcí.

VÝSTUP 6: EXPRESE CD64 NA NEUTROFILECH JAKO MARKER SEPSE

Leukocyty mají na svém povrchu několik typů receptorů pro imunoglobuliny. Imunoglobuliny se k těmto receptorům váží svými Fc fragmenty, přičemž antigen-specifický konec imunoglobulinů se váže k cílovým strukturám, typicky mikroorganismům. Receptory pro imunoglobuliny (FcR) tak mají funkci mechanickou, kdy umožňují fyzický kontakt opsonizované struktury a bílé krvinky. Mimo to však mají FcR také intracelulární domény, jejichž prostřednictvím je spouštěna intracelulární kaskáda buněčné aktivace nebo inhibice dle typu receptoru. Vazba imunoglobulinu na FcR efektorové buňky vede k uvolnění mediátorů zánětu či stimuluje efektorovou buňku k akci typu fagocytóza či ADCC. Protilátky IgG interagují s FcγRI (= CD64), FcγRIIa-c (= CD32a-c), FcγRIIIa-b (= CD16a-b); IgE s FcεRI a IgA s FcαRI (Hogarth and Pietersz, 2012).



Obrázek 16: Expres FcγRI/CD64 na leukocytech za fyziologických podmínek.

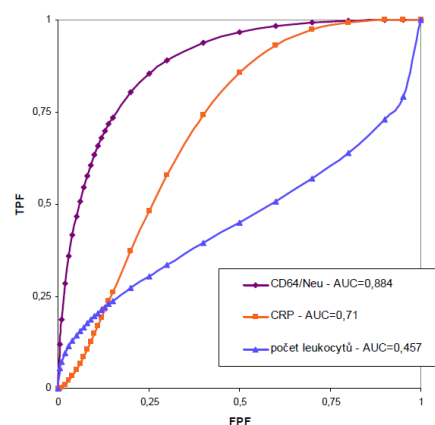
Populace buněk vyznačená žlutě jsou neutrofilů.

FcγRI / CD64 je exprimován v různé míře na povrchu neutrofilů, monocytů/makrofágů, bazofilů a mastocytů (Obrázek 16). FcγRI se váže s IgG s vysokou afinitou, jeho exprese na povrchu efektorových buněk je inducibilní např. prostřednictvím IFNγ a GM-CSF v odpovědi na infekci, čímž se zajišťuje efektivnější fagocytóza opsonizovaných patogenních mikroorganismů (McKenzie and Schreiber, 1994).

V roce 2007 jsem se na Department of Laboratory Medicine and Pathology, Mayo Clinic, Rochester, MN zabývala kvantifikací exprese CD64 na neutrofilech jako markeru sepsy s využitím především v neonatologii. Posléze jsme tento marker testovali pro detekci septických stavů u onkologických pacientů, kde je zásadní rychlá diagnostika septických stavů nepřímým průkazem reaktantů akutní fáze a také přímým průkazem patogenů –

etiologických agens infekce krevního řečiště⁹. Parametr CD64 se stanovuje jako průměrný počet molekul CD64 exprimovaných neutrofilním granulocytům (CD64/neu), přičemž za fyziologických podmínek je exprese CD64 minimální a hodnoty nepřesahují 2000 molekul na neutrofil. V podmínkách febrilní infekce se exprese CD64 na neutrofilech zvyšuje 6-12x (Davis and Bigelow, 2005; Davis et al., 2006). U pacientů se solidní malignitou s indikovaným mikrobiologickým vyšetřením byly prospektivně stanoveny tyto parametry: CRP, CD64/neu a počet leukocytů¹⁰. ROC analýza prokázala naprostou nevytěžnost počtu leukocytů jako indikátoru infekce u onkologických pacientů (AUC = 0,457). CRP s AUC 0,71 mělo při cut-off 11 mg/l specificitu 30-40 %. Stanovení exprese CD64/neu mělo AUC = 0,0884; hodnota cut-off při 90% senzitivě by se pohybovala v rozmezí 2200-2500 CD64/neu, a to při 68% specificitě (Obrázek 17).

Studium kinetiky exprese CD64 po podání lipopolysacharidu zdravým dobrovolníkům ukázalo první nárůst hladiny tohoto parametru 1 hodinu po podání a pak druhou vlnu up-regulace mezi 6. a 22. hodinou (van der Meer et al., 2007), což naznačuje, že tento ukazatel může být vhodný pro časný záchyt infekce. V souvislosti s monitorováním septických stavů u onkologických pacientů, kterým jsou často podávány růstové faktory G-CSF či GM-CSF pro léčbu těžké neutropenie, je třeba mít na paměti, že myelopoetické buňky mají vysokou hladinu CD64. V současné době již kvantifikaci CD64 na neutrofilech pro monitorování septických stavů u onkologických pacientů v Masarykově onkologickém ústavu nevyužíváme. Částečně je to z toho důvodu, že vyšetření nelze provádět statimově, ale především byl zaveden do klinické praxe vhodnější marker sepse prokalcitonin, který měl v našich podmínkách sledování onkologických pacientů lepší diagnostické vlastnosti; AUC = 0,970 (Příloha 10 – Obr.2).



Obrázek 17: **ROC analýza markerů septického stavu.**

TPF (true positive fraction) představuje senzitivitu testu v závislosti na specificitě, která je vyjádřena jako 1-FPF (false positive fraction)

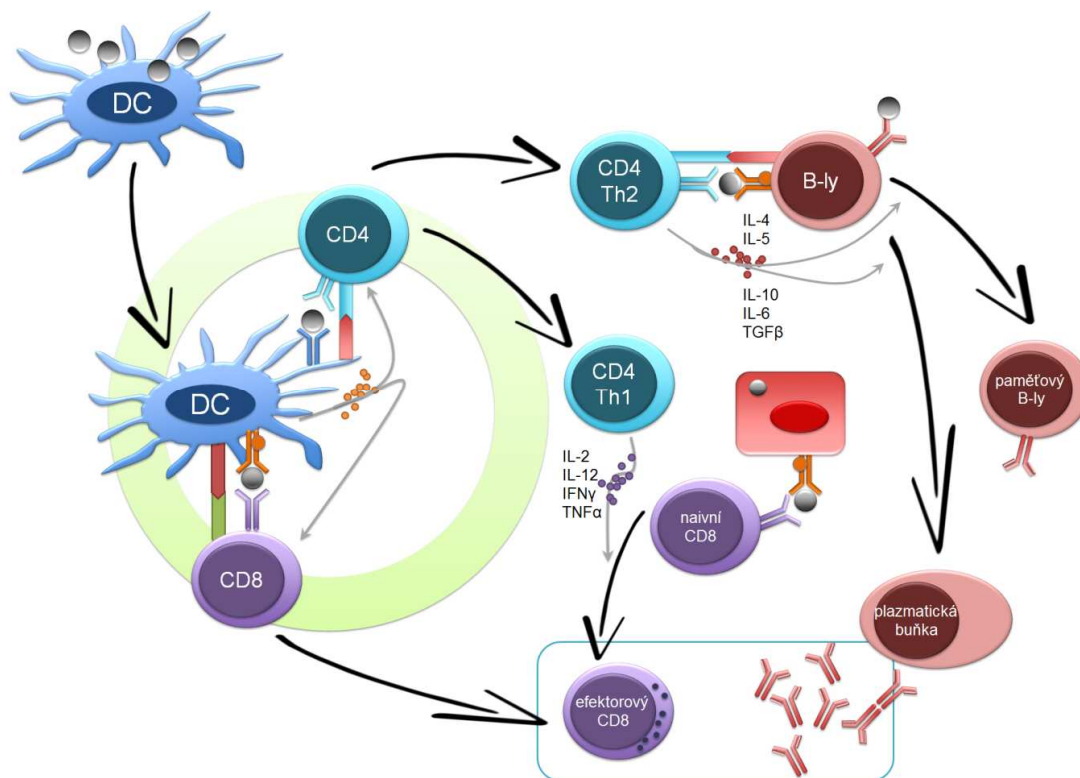
ADAPTIVNÍ IMUNITNÍ ODPOVĚĎ

umožňuje specifickou imunitní odpověď na základě **prezentace antigenu**. Tato složka imunitního systému má schopnost paměti, takže při opakovaném setkání s totožným antigenem dochází k rychlejší a silnější imunitní odpovědi. Buňky zajišťující adaptivní imunitní odpověď jsou T-lymfocyty a B-lymfocyty, které na svém povrchu nesou receptorové molekuly rozeznávající specifické cíle; v případě T-lymfocytů je to TCR receptor, v případě B-lymfocytů jsou to molekuly protilátek (= imunoglobulinů) (Obrázek 18). Hlavní populace T-lymfocytů představují pomocné a cytotoxické T-lymfocyty. Cytotoxické T-lymfocyty rozeznávají antigeny prezentované různými buňkami v kontextu MHC I. třídy. Zatímco pomocné T-lymfocyty rozeznávají antigeny prezentované

⁹ Dubská L., Vyskočilová M., Minaříková D., Jelínek P., Tejkalová R., Valík D. (2012): **LightCycler SeptiFast technology in patients with solid malignancies: clinical utility for rapid etiologic diagnosis of sepsis.** *Crit Care.* 16(1):404. IF 4,61, citace WOS 3

¹⁰ Dubská, L., Bačíková, L., Vyskočilová, M., Jelínek, P., Valík, D. (2009): **Monitorování infekčních a septických stavů u nemocných se solidní malignitou.** *Alergie*, 4, 264-268.

APC buňkami v kontextu MHC II. třídy. Takto aktivované pomocné T-lymfocyty produkují řadu cytokinů, které stimulují a atrahují v místě imunitní odpovědi cytotoxické T-lymfocyty a B-lymfocyty, ale také buňky přirozené imunitní odpovědi. Proliferující Th0-lymfocyt diferencuje v několika generacích do stádia efektorového Th-lymfocyty, paměťového Th-lymfocyty či regulačního T-lymfocyty. Efektorové Th-lymfocyty produkují cytokiny a další proteiny a stimulují tak imunitní odpověď. Paměťové Th-lymfocyty přetrvávají v organismu, jejich opakované rozpoznání daného antigenu vede k rychlé sekundární imunitní odpovědi, a tím zajišťují imunitní paměť. T-regulační lymfocyty naopak potlačují rozvoj imunitní reakce a jsou tak jedním z mechanismů ochrany před hypersenzitivitou, především typu autoimunitní reakce. Dle produkce cytokinů a z ní vycházejícího efektu rozlišujeme Th1 a Th2 efektorové lymfocyty. Obecně lze říct, že **Th1** imunitní odpověď je spojena s buněčnou imunitní reakcí, s makrofágy a cytotoxickými T-lymfocyty, produkcí interferonu IFN γ , tumor nekrotizujícího faktoru TNF, IL-12 tedy se zánětem. **Th2** směr imunitní reakce na tentýž stimul/antigen je naopak spojen s produkcí IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, se stimulací B-lymfocytů ve smyslu proliferace, přesmyku imunoglobulinových tříd a



Obrázek 18: Základní procesy v adaptivní imunitní odpovědi.

VLEVO (prezentace antigenu): Dendritické buňky efektivně pohlcují, zpracovávají a prezentují antigeny v kontextu MHC I a MHC II Th a Tc lymfocytům (podrobněji viz Obrázek 19).

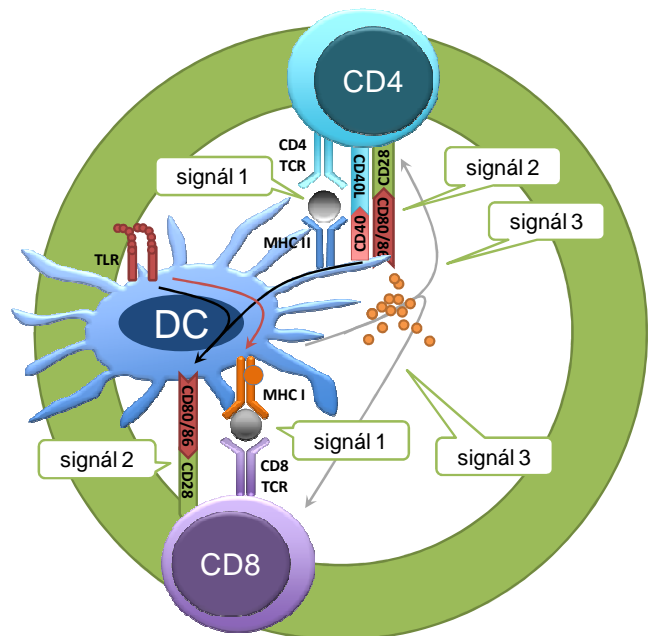
VPRAVO NAHOŘE (protilátková odpověď): Naivní Th-lymfocyt se díky antigenní stimulaci dendritickou buňkou polarizuje do Th2 buňky, jež rozeznává příslušný peptid prezentovaný B-lymfocytem, a produkuje cytokiny (včetně IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, TGF β), které aktivují naivní B-lymfocyty. B-lymfocyty pak diferencují směrem k paměťovým B-lymfocytům a plazmatickým buňkám produkujícím imunoglobuliny tj. protilátky s příslušnou antigenní specifivitou.

UPROSTŘED (cytotoxická odpověď): Infikovaná/maligní buňka prezentuje antigeny v kontextu MHC I. Tento komplex je rozeznán naivním CD8+ cytotoxickým T-lymfocytem. Naivní pomocné T-lymfocyty za několik dní po setkání s dendritickou buňkou (podrobně viz Obrázek 19) diferencují a polarizují do Th1 buněk a produkují cytokiny, které autokrinně stimulují jejich vlastní vývoj (např. IL-2), a cytokiny (IL-12, TNF α , IFN γ), které se podílejí na konečné diferenciaci a aktivaci cytotoxických T-lymfocytů v efektorové buňky, které mají schopnost usmrtit infikované/maligní buňky. V rámečku dole jsou hlavní efektorové adaptivní imunitní odpovědi, tj. buněčná komponenta = efektorové cytotoxické T-lymfocyty a humorální komponenta = protilátky. DC – dendritická buňka.

produkce protilátek a tedy s humorální protilátkovou odpovědí. V posledních letech se hovoří o dalším subtypu Th-lymfocytů a těmi jsou Th-17 buňky produkující IL-17. Předpokládá se, že Th-17 lymfocyty jsou zásadními regulátory autoimunitních onemocnění, mají prozánětlivou úlohu a jsou velmi efektivní při likvidaci patogenů na sliznici/epitelu.

Antigenně specifický receptor na povrchu **B-lymfocytů je protilátka**, která rozeznává antigeny bez nutnosti procesingu a prezentace v MHC molekulách. Každá B-lymfocytární linie má schopnost rozeznávat jeden typ antigenu. Po navázání antigenu na imunoglobulin na povrchu B-lymfocytu je komplex antigen/protilátka internalizován, zpracován a vzniklé peptidy jsou prezentovány v komplexu MHC II. třídy. Tyto antigeny pak aktivují pomocné T-lymfocyty se stejnou antigenní specificitou, dojde k produkci stimulačních cytokinů a aktivaci B-lymfocytů. Aktivované B-lymfocyty se dělí a diferencují v plazmatické buňky, které sekretují velké množství protilátek s danou antigenní specificitou (Obrázek 18).

Dendritické buňky se účinně podílejí na rozvoji imunitní odpovědi namířené proti intracelulárním antigenům, typicky virovým proteinům, které jsou v dendritických buňkách zpracovány a prezentovány Th-lymfocytům v kontextu HLA I. třídy. Pro plnou aktivaci T-lymfocytů je třeba 3 signálů, tj. vlastní prezentace antigenu, kostimulace, cytokinová polarizace (Obrázek 19). Dendritické buňky mají také schopnost cross-prezentace extracelulárních antigenů z pohlcených infikovaných či maligních buněk cytotoxickým T-lymfocytům. Tyto antigeny jsou prezentovány v kontextu MHC I a proces cross-prezentace je přísně regulován mechanismem 3 signálů, zapojením signálů z PRR a licencováním (angl. *licencing*) Th-lymfocytů se stejnou antigenní specificitou (Obrázek 19).



Obrázek 19: **Antigenní stimulace T-lymfocytů: kontext rozpoznání a cross-prezentace.**

Aktivace Th-lymfocytu. Membránový komplex CD4-TCR-CD3 na povrchu Th-lymfocytů (s příslušnou antigenní specificitou) interaguje s MHC II APC buněk v lymfatických uzlinách, a tím dochází k první aktivaci Th-lymfocytů (rozpoznání, signál 1). Pro plnou aktivaci je však třeba podnět verifikovat 2. signálem, který je zajištěn interakcí kostimulačních molekul CD28 na Th-lymfo a CD80 nebo CD86 na APC buňkách. Po obdržení obou signálů Th-lymfocyt, který takto rozpoznal daný antigen, produkuje značné množství interleukinu-2 a díky jeho autokrinnímu působení prolifерuje. Třetím signálem je cytokinové prostředí, které poskytuje dendritická buňka a jež se spolupůsobením typů signálů 2 rozhoduje o polarizaci T-lymfocytární imunitní odpovědi směrem k aktivaci nebo tolerogenní. Klíčovými cytokiny 3. signálu jsou aktivační IL-12 a inhibiční IL-10.

Aktivace cytotoxického CD8+ lymfocytu. Na signálu 1, tj. prezentaci antigenu v MHC I se podílí signalizace vyvolaná PRR (např. TLR) prostřednictvím PAMPs (Maurer et al., 2002), jež zvyšuje antigenní prezentaci v MHC I (Burgdorf and Kurts, 2008). Klíčovým druhým signálem pro aktivaci CTLs je kostimulace prostřednictvím CD80/CD86/CD28 komplexu, na kterém se podílí licencování Th-lymfocytů prostřednictvím signalizace CD40/CD40L, kdy stimulace CD40 na DC pomocí CD40L na Th-lymfocytu s odpovídající antigenní specificitou vede za podpory signalizace z TLR k up-regulaci kostimulačních molekul na povrchu dendritických buněk. Třetím signálem pro aktivaci cytotoxických T-lymfocytů je cytokinové prostředí, především IL-12, interferony typu I a IL-2.

Je zřejmé, že imunitní dozor lidského organismu nezabrání ve všech případech nádorovému bujení. Současné poznatky ukazují, že imunitní reakce v interakci s nádorovými buňkami je velmi komplexní proces a pokud bereme imunitní systém jako celek, tak sehrává ve vztahu k maligním onemocněním často **protichůdnou roli**. Příkladem může být zánětlivá reakce, které může podporovat vznik a invazivitu nádoru či v jiném rozsahu a kontextu naopak přispívat k eliminaci nádorového bujení.

Nádorové buňky stimulují do jisté míry imunitní odpověď. Stimulace imunitního systému je výrazná v případě nádorů spojených s infekcí onkogenními viry např. HPV. V ostatních případech je aktivace imunitního systému omezena tím, že nádorové buňky vznikají z vlastních buněk, exprimují málo antigenů a obecně jsou slabě imunogenní.

NÁDOROVÉ ANTIGENY

Nádorové buňky exprimují více či méně nádorových antigenů, jež jsou rozpoznány specifickou složkou imunitní odpovědi. **Nádorové antigeny** jsou produkty translace mutovaných genů, intronových sekvencí, translace z alternativních čtecích rámců, pseudogenů, antisense řetězců, translokovaných genů, genů se začleněným virovým genomem (Tabulka 4).

Typ nádorového antigenu	Charakteristika	Příklad
Onkofetální	Jsou produkovány jen fetální nebo nádorovou tkání.	CEA, AFP, TAG-72
Onkovirové	Jsou kódovány onkogenními viry.	HPV E6, E7
Overexprimované / akumulované	Jsou exprimovány zdravou i nádorovou buňkou, ale jejich hladina je významně vyšší u nádorových tkání.	BING-4, cyclin-B1, 9D7, Ep-CAM, Her2/neu, telomeráza, mezothelein, SAP-1, survivin
Nádorové testikulární	Exprimovány nádorovou tkání a buňkami reprodukční soustavy, např. varlata, placenta.	BAGE, CAGE, GAGE, MAGE, NY-ESO-1*, SAGE, XAGE antigeny
Diferenciační (liniově specifické)	Jsou produkovány jediným nádorovým histotypem.	Melan-A/MART-1*, gp100/pm17, tyrosináza, TRP-1/-2, PSA
Mutované	Jsou exprimované pouze nádorovými buňkami jako produkt mutovaného genu nebo aberantní transkripce.	β-kenin, BRCA1/2, CDK4, CML66, fibronektin, MART-2, p53, Ras, TGF-βRII
Postranslačně modifikované	Jsou produktem abnormální glykosylace v nádorových buňkách.	vysoce glykosylovaný MUC1
Idiotypové	Jsou produktem vysoce polymorfního genu pro Ig nebo TCR, který exprimuje klon lymfocytů.	Ig, TCR

Tabulka 4: **Kategorie nádorových antigenů.**

Uvedené kategorie nejsou exkluzivní a určité antigeny mohou spadat do více kategorií. *výrazně imunogenní antigeny.

Proteinové produkty těchto genů se nacházejí v různých buněčných kompartmentech, včetně cytoplazmatické membrány. Nádorové antigeny mohou být také prezentovány v komplexech s MHC I a MHC II a často jsou také buňkou secernovány. Množství nádorových antigenů/neoantigenů, které nádorová buňka produkuje, souvisí s množstvím **somatických mutací** dané buňky a nádory s vysokým podílem somatických mutací jsou více imunogenní s porovnání

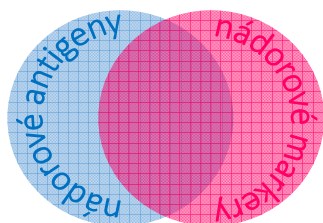
s nádory s malým množstvím mutací. Obecně nacházíme nejvíce somatických mutací v nádorech, které jsou spojené s fyzikálně, chemicky či biologicky indukovanou kancerogenezí (Alexandrov et al., 2013) (Obrázek 14).

Nádorové antigeny jsou často buňkou prezentovány v komplexu s MHC I, obdobně jako virové antigeny, což umožňuje rozeznání nádorové buňky cytotoxickým T-lymfocytům. Odumřelá nádorová buňka je pak fagocytována antigen prezentujícími buňkami a peptidy nádorových antigenů jsou vystaveny v MHC II. Tím může dojít ke stimulaci pomocných T-lymfocytů a potažmo i k produkci protilátek proti daným antigenům. Ukazuje se, že pro efektivní imunoterapeutickou léčbu checkpoint inhibitory je důležitá T-lymfocytární imunitní odpověď vůči **klonálním antigenům** a že vysoká intratumorální heterogenita spojená s vyšší proporcí subklonálních neoantigenů predikuje špatnou odpověď na léčbu checkpoint inhibitory (McGranahan et al., 2016).

VÝSTUP 7: NÁDOROVÉ ANTIGENY V KLINICKÉ PRAXI

Z hlediska diagnosticko-terapeutického má znalost patofyziologie nádorových antigenů dva klíčové dopady i/ nádorové neoantigeny mohou sloužit jako terapeutické cíle (např. ganglioglykosidy GM2, GD2, GD3, GM3, nebo muciny CD125, CD19-9, MUC-1) a ii/ kvantitativně změněná exprese antigenů u nádorových buněk může být důležitým diagnostickým markerem pro onkologickou praxi.

Nádorovým markerem v širším slova smyslu označujeme substanci přítomnou v nádoru resp. produkovanou a uvolňovanou nádorem nebo hostitelem v odpověď na přítomnost maligního onemocnění. Přítomnost této substance lze využít k diferenciaci nádoru od normální tkáně, nebo uvažovat o přítomnosti tumoru a odhadnout rozsah nádorového procesu na základě analýzy tělních tekutin, nejčastěji krve. Řadu nádorových antigenů markerů je možné využít jako nádorové markery (Obrázek 20).



Obrázek 20: **Nádorové antigeny mohou sloužit pro diagnostiku nádorových onemocnění.**

Mezi nejlépe popsané imunogenní glykoproteinové antigeny a zároveň nádorové markery patří např. MUC-1 (CA15-3), CA19-9, CEA a Her-2/neu. Jiné nádorové markery, které tvoří nádor nebo organismus v reakci na nádor, nejsou imunogenní, např. enzymy jako je laktát dehydrogenáza či tymidinkináza.

Klasické solubilní sérové markery mohou být klinicky informativní, pokud jde o i) screening onemocnění u asymptomatických jedinců, ii) v diferenciální diagnostice u symptomatického pacienta, iii) jako prognostické ukazatele choroby, iv) jako prediktivní ukazatele úspěšnosti terapie v) a k detekci návratu choroby, což je nejčastějším využitím nádorových markerů.

V roce 2010 jsme připravili první a v roce 2014 druhé aktualizované doporučení¹¹ Odborných společností ČLS JEP o využití nádorových markerů v klinické praxi, kde jsou podrobně popsány aplikace jednotlivých nádorových markerů i problematika jejich analytických a biologických nespecificit. Doporučení shrnuje využití jak

¹¹ Valík D, Nekulová M, Zdražilová Dubská L, Springer D, Malbohan I, Zima T, Topolčan O, Fuchsová R, Svobodová Š. (2014): **Doporučení k využití nádorových markerů v klinické praxi České společnosti klinické biochemie (ČSKB ČLS JEP) České onkologické společnosti (ČOS ČLS JEP) České společnosti nukleární medicíny (ČSNM ČLS JEP) - sekce imunoanalytických metod.** *Klin. Biochem. Metab.* 22(43), 22–39.

zavedených markerů, které mají své pevné místo v klinické onkologii, tak se v aktuální verzi objevují nové analyty vstupující do klinické praxe.

Jedním z těchto nových markerů, kterým se aktuálně zabýváme, je HE4 (*Human Epididymal Protein 4*), jež je produkován ve vysokých koncentracích u pacientek s karcinomem vaječnicků. HE4 vykazuje vysokou senzitivitu v časných (st. I/II) stádiích onemocnění. Obvyklá hodnota cut-off je 50 pmol/l pro premenopauzální ženy a kolem 80 pmol/l pro postmenopauzální ženy¹². Až třetina žen s maligním ovariálním nádorem, u nichž není zvýšena hladina CA 125 má zvýšenou koncentraci HE4, a to především u endometroidních a serózních karcinomů ovária (Příloha 12 – p. 2128). Je-li tento marker použit samostatně k detekci nádorů vaječnicků, vykazuje nejvyšší senzitivitu (při vysoké specifitě) ze všech známých biomarkerů ovariálního karcinomu, při použití v kombinaci s ostatními markery (zejména CA 125) se senzitivita panelu zvyšuje. Ve velké mezinárodní studii s pacientkami (n=2665) se suspektní ovariální malignitou jsme vyvinuli a validovali tzv. Copenhagen Index (CPH-I)¹³ kombinující sérovou hladinu CA125, sérovou hladinu HE4 a věk pacientky pro predikci benigní vs. maligní etiologie nádorové masy. Při cut-off hodnotě CPH-I 0,070 byla senzitivita tohoto indexu 95,0% a specifita 78,4% v testovací kohortě a ve validační kohortě senzitivita dosahovala 82,0% a a specifita 88,4%. CPH-I index měl lepší analytické parametry nežli jiné ukazatele včetně těch, jež využívají ultrazvukové vyšetření (Příloha 13 – Fig. 1., Fig. 2). Nárůst hodnot HE4 lze využít také ke sledování průběhu choroby u pacientek s ovariálním karcinomem, její progresi a sledování účinnosti terapie, resp. návratu onemocnění.

¹² Plebani M and HE4 Study Group. (2012): **HE4 in gynecological cancers: report of a European investigators and experts meeting**. *Clin Chem Lab Med.* 50(12):2. 127-136. IF 2,955, citace WOS 10

¹³ Karlsen, M.A., Høgdall, E.V., Christensen, I.J., Borgfeldt, C., Kalapotharakos, G., Zdrzilova-Dubska, L., Chovanec, J., Lok, C.A., Stiekema, A., Mutz-Dehbalai, I., Rosenthal, A.N., Moore, E.K., Schodin, B.A., Sumpaico, W.W., Sundfeldt, K., Kristjansdottir, B., Zapardiel, I., Høgdall, C.K. (2015): **A novel diagnostic index combining HE4, CA125 and age may improve triage of women with suspected ovarian cancer - An international multicenter study in women with an ovarian mass**. *Gynecol Oncol.* 138(3): 640-646. IF 3,774, citace WOS 2

Nádorová imunologie vychází z konceptu tzv. **imunoeditace** (*cancer immunoediting*), který popisuje vzájemnou interakci nádorových buněk a imunitního systému. Imunoeditace spočívá ve vývoji protinádorových mechanismů imunitního systému, ale také prvků úniku nádorových buněk imunitnímu dohledu. Během imunoeditingu se tedy **selektují** klony nádorových buněk s nižší imunogenicitou nebo s antigenním spektrem, proti němuž nebyla namířena imunitní reakce. Vzájemná interakce nádorových buněk a imunitního systému může být rozdělena do tří fází (3Es), z anglického *elimination, equilibrium, escape*.

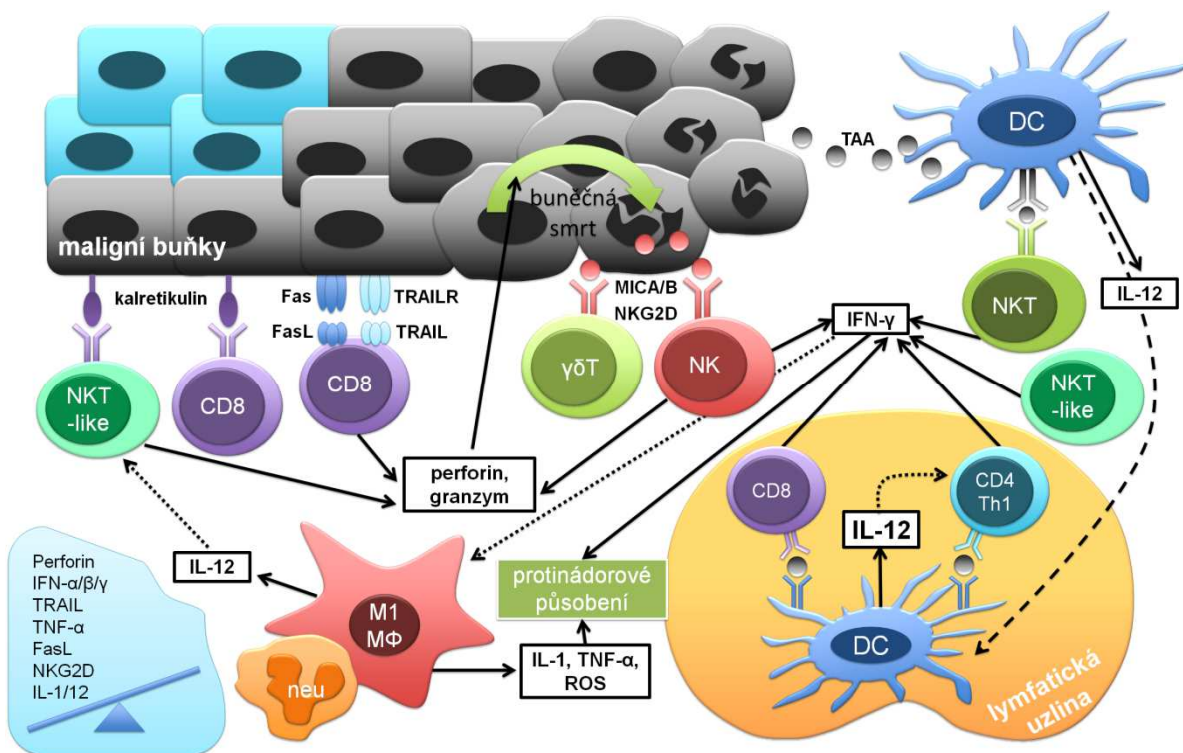
ELIMINACE NÁDOROVÝCH BUNĚK A NÁSTROJE PROTINÁDOROVÉ IMUNITY

Během fáze eliminace/*elimination* dochází k destrukci transformovaných buněk imunitním systémem. Imunitní reakce namířená proti nádorovým antigenům má význam při spontánní likvidaci nádorových buněk na počátku maligního procesu. Eliminace je fáze nádorové imunoeditace, kdy přirozená a adaptivní složka imunitní odpovědi společně detekují nádor v časně fázi transformace, kdy je nádor lokalizovaný a není klinicky detekovatelný. Na fázi eliminace se podílejí jak složky přirozené, tak adaptivní imunitní odpovědi. Proces eliminace se v podstatě rovná konceptu **imunitního dozoru** nad maligně transformovanou buňkou a převládají během něj nástroje protinádorové imunity (Obrázek 21).

Cytotoxické T-lymfocyty rozeznávají potenciálně maligní buňky, které exprimují abnormální peptidy v komplexu MHC I. Hlavní nástroje cytotoxických T-lymfocytů k likvidaci cílových buněk jsou granzymy, perforiny a ligandy *death* receptorů. Granzymy jsou serinové proteázy štěpící obsah cílových buněk. Perforiny mají schopnost penetrovat plazmatickou membránu cílových buněk, do kterých pak vniká voda a ionty a dochází k cytolýze. Granzymy a perforiny jsou uloženy v cytotoxických granulích (v morfologické hematologii se popisují jako azurofilní) cytotoxických T-lymfocytů a NK-buněk. Obsah granulí je uvolněn do imunitního spoje (*immune synapse*) při kontaktu s cílovou buňkou, přičemž perforiny zajistí doručení granzymů do endozomu cílové buňky. Granzymy mají schopnost aktivovat kaspázy a další proteiny regulující apoptózu, navozují tak buněčnou smrt závislou i nezávislou na kaspázách. Dalším nástrojem cytotoxických T-lymfocytů je exprese ligandů tzv. *death* receptorů na membránách efektorových buněk (Výstup 8, str. 50), které interagují s cílovými (maligními buňkami).

Antigeny z usmrčených nádorových buněk jsou pohlceny antigen prezentujícími buňkami, především **dendritickými buňkami**, které zachycené peptidy exprimují v MHC II. Takto prezentované nádorové antigeny jsou rozeznány naivními CD4+ pomocnými T-lymfocyty v lymfatických orgánech. Naivní pomocné T-lymfocyty za několik dní po setkání s APC diferencují a polarizují do Th1 buněk a produkují cytokiny, které autokrinně stimulují jejich vlastní vývoj (např. IL-2), cytokiny, které se podílejí na vývoji cytotoxických T-lymfocytů. Produkují například také TNF α či IFN γ , jež aktivuje makrofágy a u nádorových buněk zvyšují expresi MHC I, což zase vede ke zvýšení jejich citlivosti k lýze cytotoxickými lymfocyty, pro které tak cytokiny produkované Th1-lymfocyty představují 3. signál pro konečnou diferenciaci. Nejeфекtivnější antigen prezentující buňky z hlediska protinádorové imunity jsou dendritické buňky. Ke zpracování nádorových antigenů dochází v průběhu chemokiny regulované migraci dendritických buněk do sekundárních lymfatických orgánů. V lymfatických uzlinách vytvářejí dendritické buňky shluky s T-lymfocyty

prostřednictvím adhezivních molekul ICAM-1, ICAM-3, LFA-3. V lymfatických uzlinách poskytnou dendritické buňky T-lymfocytů kontext 2. signálu v podobě exprese kostimulačních molekul CD80 a CD86 (podrobněji viz Obrázek 19, str. 43). **Aktivační kontext** je doplněn interakcí mezi molekulou CD40, jejíž exprese na DC se zvyšuje v přítomnosti prozánětlivých působků (GM-CSF či TNF α), a CD40L na T-lymfocytech, což vede k produkci IL-12 dendritickými buňkami. IL-12 přispívá ve vzniku Th1 subsetu T-lymfocytů. Kostimulační kontext je dále potencován interakcí OX40L (na DC) a OX40 (na T-lymfocytech) potencující expresi kostimulačních molekul na dendritických buňkách. Th1 i Th2 lymfocyty mají protinádorový efekt, nicméně potenciál Th1 buněk produkujících IFN γ při likvidaci nádorových buněk je významnější (Nishimura et al., 2000). Značně efektivní protinádorový efekt pak mají Th17 buňky (Zhao et al., 2011).



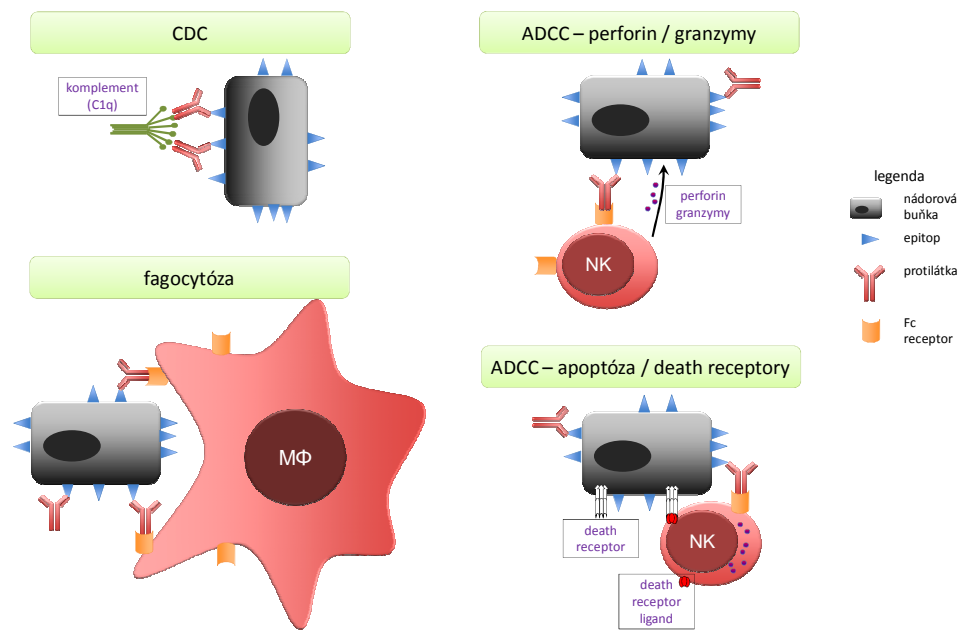
Obrázek 21: **Nádorová imunoeditace - eliminace.**

Normalní buňky (modré) jsou transformovány do maligních buněk díky působení karcinogenů a selhání vnitřních nádorově supresorových mechanismů např. díky mutacím v genech p53, RAS, ATM (viz Obrázek 2). Takto transformované buňky exprimují stimuly cytotoxických CD8+ T-lymfocytů (peptidy nádorových antigenů v kontextu MCH I a/nebo molekuly indukované stresem jako kalretikulín), NKG2D ligandy stimující NK-buňky (NKG2DLs) a gammadelta T-lymfocyty (MICA/B). Dendritické buňky pohlcují usmrčené nádorové buňky a peptidy prezentují v kontextu MHC T-lymfocytům a prostřednictvím CD1d iNKT buňkám. Aktivované efektorové buňky produkují IFN γ , který zprostředkuje protinádorový efekt potlačením proliferace nádorových buněk a potlačením nádorové angiogenze. CD8+ cytotoxické T-lymfocyty a NK-buňky mají schopnost indukovat apoptózu nádorových buněk prostřednictvím perforinu a granzymů a prostřednictvím ligandů death receptorů (FasL a TRAIL) (detailně viz Obrázek 22). Efektorové CTLs exprimují kostimulační molekuly jako je CD28, CD137, GITR, OX-40, jejichž aktivace zvyšuje proliferaci a přežívání efektorových buněk. Buňky přirozené imunitní odpovědi stejně tak jako M1 makrofágy přispívají k protinádorovému efektu sekrecí TNF α , IL-1, IL-12 a reaktivních kyslíkových radikálů. Ve fázi Eliminace je v nádorovém mikroprostředí vztah mezi maligními a imunitními buňkami vychýlen směrem k efektivní protinádorové imunitní odpovědi.

TAA- nádorové antigeny (tumor-associated antigens), M1 M ϕ – M1 makrofágy, neu – neutrofil, ROS – reaktivní kyslíkové radikály, DC – dendritická buňka). Adaptováno dle (Mittal et al., 2014).

Z hlediska efektivity prezentace nádorových antigenů se ukazuje být zásadním faktorem navození buněčné smrti způsobem, který je **imunogenní**. Na mechanismech buněčné smrti se podílí prezentace molekul signalizujících imunitnímu systému poškození tkáně, tzv. **DAMPs** (*danger-associated molecular pattern molecules*) např. kalretikulinu (Obeid et al., 2007), HMGB-1, proteinů teplotního šoku HSP (Fahmueller et al., 2013; Krysko et al., 2012), heparin sulfátu či ATP a DNA.

Významným hráčem na poli protinádorové obrany jsou NK-buňky. **NK-buňky** rozpoznávají maligní buňky prostřednictvím repertoáru receptorů na svém povrchu. Tyto receptory poskytují NK-buňce aktivační nebo inhibiční podnět. Pokud převládnu proaktivační signály jsou spuštěny lytické mechanismy (viz výše) a cílová nádorová buňka je usmrcena. Pokud převládnu inhibiční signály, nedochází k iniciaci cytotoxické reakce (Vivier et al., 2012). Přítomnost MHC I molekul na povrchu maligní buňky poskytuje NK-buňkám inhibiční signál, což znamená, že absence molekul MHC I na povrchu nádorových buněk, která vede k „utajení“ nádorových antigenů před cytotoxickými T-lymfocyty, je rozhodující pro aktivaci NK-buněk. Aktivitu NK-buněk zvyšuje IL-2 a IL-12, takže je jejich aktivita v nádorovém mikroprostředí potencována antigen-specifickou imunitní reakcí.



Obrázek 22: Protilátky a cytotoxická reakce proti nádorovým buňkám.

Protilátky mohou zprostředkovat cytolyzu nádorových buněk různými způsoby. CDC = complement-dependent cytotoxicity. Vazba imunoglobulinů na epitopy na povrchu nádorových buněk navozuje aktivaci komplementu a lýzu maligních buněk. ADCC = antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity za účasti perforin/granzymového systému nebo navozená death receptors. Opsonizace maligních buněk protilátkami přispívá k jejich rozpoznání a fagocytóze makrofágy.

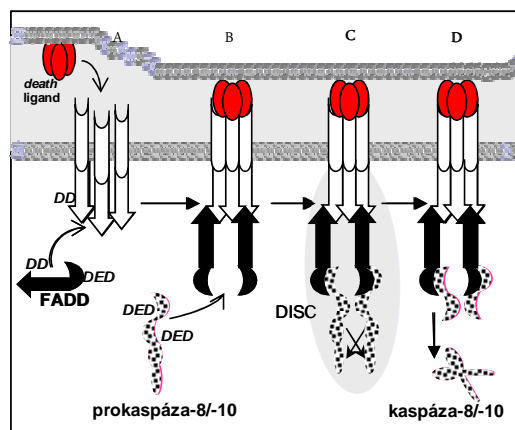
Důležitým protinádorovým působkem je IFN γ , který je produkován Th-lymfocyty po antigenní stimulaci a NK-buňkami. **Interferony** mají anti-proliferativní a cytotoxické vlastnosti zprostředkované interferencí s proteosyntézou v cílových buňkách. IFN γ také zvyšuje expresi MHC I a tím přispívá k odhalení nádorových antigenů cytotoxickým T-lymfocytům. IFN γ navozuje dozrávání dendritických buněk a tím účinnější prezentaci nádorových antigenů. Mezi další aktivity

IFN γ , které spadají do jeho prozánětlivých aktivit, patří indukce inducibilní formy NO syntázy (Bogdan, 2015). Působení IFN γ také stimuluje buňky monocyto-makrofágového systému k polarizaci do tzv. M1 makrofágů tedy klasicky aktivovaných makrofágů, které mají protinádorové vlastnosti, produkují prozánětlivé cytokiny TNF α a IL-12.

VÝSTUP 8: APOPTÓZA INDUKOVANÁ DEATH RECEPTORY JAKO NÁSTROJ IMUNITNÍCH EFEKTORŮ

Cytotoxické T-lymfocyty a NK buňky mohou aktivovat kaspázy a tak indukovat buněčnou smrt aktivací *death* receptorů na povrchu cílových potenciálně nebezpečných buněk. Tyto specializované membránové receptory s jedinečnou schopností zprostředkovat likvidaci buňky patří do rodiny TNFR a jejich solubilní nebo membránově vázané ligandy do rodiny TNF. Ligandy TNF a receptory TNFR se účastní především vývoje a funkce imunitního systému a buněk lymfoidního původu (Gravestain and Borst, 1998). Některé receptory TNFR, nazvané *death* receptory jmenovitě TNF-R1, CD95/Fas, DR3/TRAMP, DR5/TRAIL-R2, DR4/TRAIL-R1 a DR6, se vyznačují intracelulární *death* doménou (DD), jejímž prostřednictvím mohou více či méně efektivně aktivovat iniciační kaspázy a spustit apoptotickou sekvenci (Obrázek 23) prostřednictvím aktivace receptorových kaspáz, jejichž apoptotické působení je do určité míry amplifikováno mitochondriální apoptotickou dráhou (Obrázek 24). V rámci nádorové imunologie je pozornost zaměřena na *death* receptory CD95/Fas, DR5/TRAIL-R2 a DR4/TRAIL-R1. Podrobněji popsáno v přehledovém článku¹⁴.

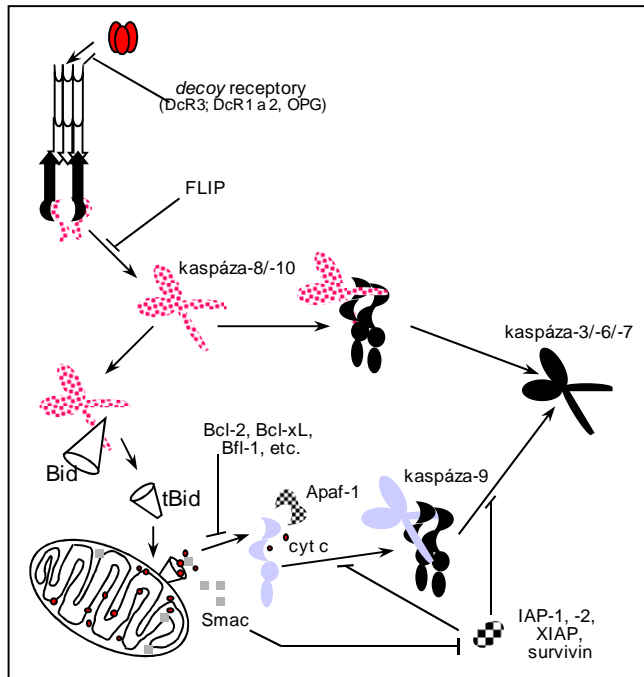
Recentní publikace potvrdily, že na protinádorovém efektu NK-buněk se významně podílí apoptóza navozená ligandem TRAIL a buněčná smrt indukovaná perforinem (Kajitani et al., 2012). Na druhou stranu je již v dnešní době známo, že TRAIL může spouštět signální kaskádu spojenou s aktivací intracelulárních kináz, která má za následek anti-apoptotické a pro-nádorové působení (Azijli et al., 2013; Cullen and Martin, 2015; Fulda, 2013).



Obrázek 23: Aktivace *death* receptoru a iniciačních kaspáz.

/A/ Trimerický *death* ligand indukuje oligomerizaci membránových molekul příslušného receptoru. Asociace receptorových molekul vede k homotypické interakci *death* domén (DD) receptoru s DD adaptorového proteinu FADD. /B/ FADD interaguje prostřednictvím DEED (death effector domain) s prokaspázou-8/-10 /C/ za vzniku komplexu DISC (Death Induced Signaling Complex), v němž dochází k autokatalýze kaspázových prekurzorů. /D/ Aktivní kaspáza-8/-10 se skládá ze dvou malých a dvou velkých podjednotek.

¹⁴ Dubská L., Sheard M. A. (2003): *Apoptóza zprostředkovaná death receptory“ úloha FASL a TRAIL při smrti maligních buněk. Klinická onkologie. 16(6): 257 – 264.*



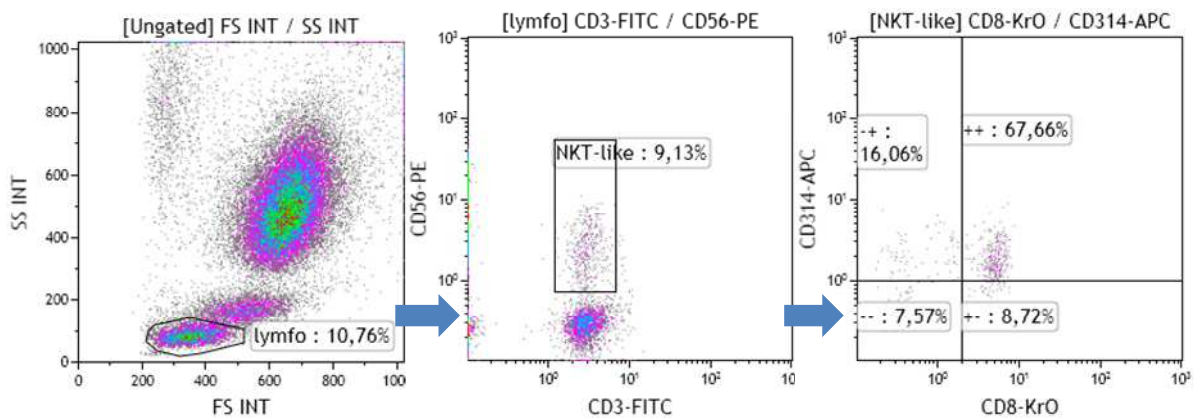
Obrázek 24: **Model regulace aktivace efektorových kaspáz po ligaci death receptoru.** Iničiační kaspáza-8/-10 štěpením aktivuje efektorové kaspázy a/nebo štěpením proteinu Bid indukuje uvolnění pro-apoptotických molekul z mitochondriálního mezimembránového prostoru a z endoplazmatického retikula včetně cytochromu c (cyt c), který pak v cytozolu umožňuje interakci proteinu Apaf-1, ATP, prekurzorů kaspázy-9, aktivaci tohoto enzymu a následně efektorových kaspáz. Mechanismus je regulován na mnoha úrovních. Interakce prokaspázy-8/-10 s death receptorem je inhibována proteinem FLIP. U některých typů buněk je apoptotický proces významně regulován mitochondriálním Bcl-2 homology. Aktivita či aktivace efektorových kaspáz (-3, -6, -7) je modulována negativně inhibitory IAP-1, -2, XIAP, Survivin; a pozitivně mitochondriálními proteiny Smac/DIABLO.

VÝSTUP 9: ZVÝŠENÝ POČET CÍRKULUJÍCÍCH NKT-LIKE BUNĚK U PACIENTŮ SE SOLIDNÍMI NÁDORY

NKT buňky jsou atypické T-lymfocyty s některými vlastnostmi NK-buněk (Kelly-Rogers et al., 2006; Kronenberg, 2005; Schmidt et al., 1986). NKT buňky se dělí na iNKT (NKT typ 1), NKT typ2 a NKT-like buňky (Godfrey et al., 2004). Na rozdíl od klasických T-lymfocytů mají, $CD3^+CD56^+$ NKT-like T-lymfocyty přirozené (jako NK-buňky) i adaptivní (jako T-lymfocyty) funkce a to především ve smyslu schopnosti cytotoxicity a produkce cytokinů závislé i nezávislé na antigenní prezentaci v MHC (Kelly-Rogers et al., 2006; Loza et al., 2002; Lu and Negrin, 1994; Wang et al., 2008). Aktivace $CD3^+CD56^+$ NKT-like buněk může být zásadní, protože slouží jako zdroj regulačních cytokinů na počátku imunitní odpovědi a mohou likvidovat cílovou buňku dříve než konvenční $CD8^+$ T-lymfocyty. NKT-like buňky produkují interferon- γ indukující eliminaci virem infikovaných a nádorových buněk a navozující Th1 prozánětlivou imunitní odpověď (Vitale et al., 2000). Mezi vlastnosti, které sdílejí $CD3^+CD56^+$ NKT-like buňky s NK-buňkami patří schopnost regulace pomocí membránových molekul KIR a CD94 (Dunne et al., 2001; Kuylenstierna et al., 2011).

$CD3^+CD56^+$ NKT-like buňky představují 5-15 % T-lymfocytů periferní krve (Obrázek 25) a až 50 % T-lymfocytů sídlících v játrech (Doherty and O'Farrelly, 2000). Počet NKT-like buněk se zvyšuje s věkem. To je dáno opakovanou antigenní stimulací imunitního systému, v pupečnickové krvi například nejsou $CD3^+CD56^+$ NKT-like buňky přítomné (Giroux and Denis, 2005). Pozorovali jsme, že střední hodnota absolutního počtu NKT-like buněk v periferní krvi jedinců z referenční populace

je $0,085 \times 10^9/l$, přičemž nebyl pozorován rozdíl v hodnotách mezi muži a ženami (Příloha 15 – Fig. 1)¹⁵.



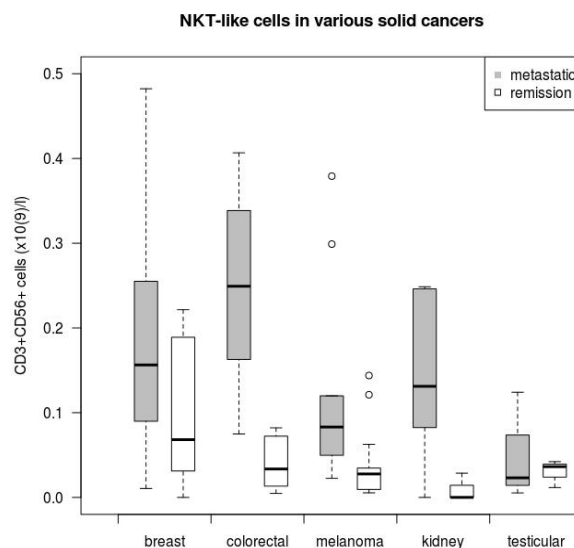
Obrázek 25: **Imunofenotyp NKT-like lymfocytů.**

NKT-like jsou CD3+ CD56+ CD16- lymfocyty, které jsou zpravidla CD8+ NKG2D (= CD314)+ zvláště v případě jejich expanze.

V periferní krvi onkologických pacientů jsme zaznamenali 2,65krát vyšší hladiny CD3+CD56+ NKT-like buněk než v referenční populaci. Počet CD3+CD56+ buněk u pacientů se solidní malignitou, kteří dosáhli kompletní remise onemocnění, byl srovnatelný s referenční populací (Obrázek 26).

Dále jsme hodnotili soubor pacientek s karcinomem prsu (Příloha 15 – Tab. 1) z hlediska iniciálních (před zahájením terapie) hodnot cirkulujících CD3+CD56+ NKT-like buněk přežití bez progresu. Pacientky jsme rozdělili na NKT-like low a high, přičemž „low“ značilo počet cirkulujících NKT-like buněk nižší než 25. percentil referenční populace „high“ hodnoty byly nad 75. percentil referenční populace. U pacientek s iniciálně vysokým počtem cirkulujících NKT-like jsme pozorovali trend k prodlouženému přežití bez progresu onemocnění (Příloha 15 – Fig. 3). Ze studie vyplývá, že CD3+CD56+ NKT-like buňky mohou hrát úlohu při potlačení rozvoje nádoru a jejich počet je zvýšen u určitých typů epitelálních nádorů.

U pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic bylo také pozorováno zvýšené množství CD3+CD56+ NKT-like buněk, které měly nicméně snížené efektorové funkce v podobě schopnosti produkovat IFN γ (Al Omar et al., 2012). Snížená exprese aktivačního receptoru NKG2D z důvodu jeho internalizace po vyvázání solubilními MIC molekulami (sMICs) a s tím spojená redukce cytotoxických funkcí



Obrázek 26: **Cirkulující CD3+CD56+ NKT-like buňky u pacientů s různými typy maligních onemocnění ve stádiu aktivního metastatického onemocnění a v remisi.**

¹⁵ Zdrzilova-Dubská L, Valík D, Budinská E, Frgala T, Baciková L, Demlova R. **NKT-like cells are expanded in solid tumour patients.** *Klin Onkol.* 2012;25 Suppl 2:2S21-5. *Citace PubMed 1*

NKT-like buněk byla popsána *in vitro* na modelu nádorových buněk karcinomu ovaria a prostaty (Wang et al., 2008). V rámci klinického hodnocení protinádorového efektu rIL-21 u pacientů s maligním melanomem stádia IV bylo prokázáno, že IL-21 vede ke zvýšení počtu cirkulujících NKT-like buněk (Coquet et al., 2013). Na druhou stranu na myším modelu byla popsána imunosupresivní role CD8+ NKT-like buněk, která spočívala v antigen-dependentní eliminaci dendritických buněk (Wang et al., 2015a).

VÝSTUP 10: CÍRKULUJÍCÍ GAMMADELTA T-LYMFOCYTY U PACIENTŮ S MALIGNÍM MELANOMEM A KARCINOMEM PRSU: PILOTNÍ DATA

Varietní gammadelta T-lymfocyty byly popsány relativně nedávno (Saito et al., 1984) a v současné době se objevují stále nové informace o tomto buněčném subtypu, které ukazují, že $\gamma\delta$ T-lymfocyty hrají významnou úlohu při imunitní odpovědi k infekčním agens, při regulaci zánětlivých procesů a maligních onemocnění.

Klasický TCR receptor pomocných a cytotoxických T-lymfocytů se skládá z α a β podjednotky. Gamma delta T lymfocyty mají alternativní TCR receptor skládající se z γ a δ podjednotky. $\gamma\delta$ T-lymfocyty představují specifickou buněčnou subpopulaci, která má některé vlastnosti pomocných T-lymfocytů, cytotoxických T-lymfocytů a NK-buněk. Podobně jako u konvenčních T-lymfocytů dochází u gamma delta buněk k přestavbě TCR receptoru, a tím ke značné diverzitě specifity TCR receptoru. Avšak gamma delta buňky nepotřebují k rozeznání antigenu jeho prezentaci v komplexu MHC a mají schopnost rozeznávat antigeny prostřednictvím PRR. $\gamma\delta$ TCR je tedy schopen rozpoznat širokou škálu vlastních a cizích antigenů, například malých peptidů, solubilních či membránových proteinů, fosfolipidů apod., bez prezentace prostřednictvím MHC (Morita et al., 1995).

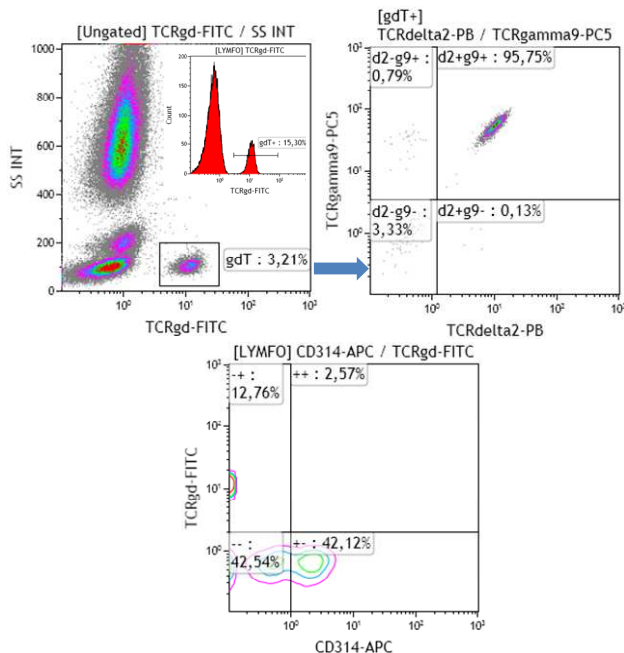
Mezi efektorové funkce $\gamma\delta$ T-lymfocytů patří produkce cytokinů (INF γ , IL-17, TNF α) a chemokinů (MIP-1 α/β , RANTES), stejně jako přímá cytotoxicita (perforin, granzym) a buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách (ADCC) (Kakimi et al., 2014).

U člověka a myši představují $\gamma\delta$ T-lymfocyty zpravidla méně než 5% všech cirkulujících lymfocytů (Groh et al., 1989), naopak u přežvýkavců se jejich zastoupení pohybuje mezi 15-60% a zde $\gamma\delta$ T-lymfocyty mají roli spíše regulační než cytotoxickou (Guzman et al., 2014). Mimo cirkulaci a lymfatické orgány se $\gamma\delta$ T-lymfocyty u člověka nacházejí především v epitelu. Přesné typy $\gamma\delta$ TCR receptoru jsou tkáňově specifické. Konkrétně V γ 9V δ 2 TCR je exprimován na 50-95% $\gamma\delta$ buněk v periferní krvi (Hinz et al., 1997) (Obrázek 27), zatímco TCR složené z jiných V δ elementů se vyskytují na $\gamma\delta$ buňkách ve vnitřních orgánech (V δ 1 a V δ 3) nebo kůži (V δ 1) (Holtmeier et al., 2001).

Publikovali jsme práci, jejímž cílem bylo shrnout literární data o úloze $\gamma\delta$ buněk u onkologických onemocnění¹⁶. Cílem experimentální části tohoto sdělení bylo pak popsat 1/ hladiny cirkulujících $\gamma\delta$ T-lymfocytů v krvi jedinců z běžné populace (Příloha 16 – Obr. 2) a provést exploratorní analýzu 2/ hodnot cirkulujících $\gamma\delta$ T-lymfocytů u pacientů s maligním melanomem a karcinomem prsu (Příloha 16 – Obr. 3) a 3/ detailního imunofenotypu (Příloha 16 – Obr. 4). U pacientů s maligním

¹⁶ Cibulka M, Selingerová I, Fědorová L, Zdražilová-Dubská L. (2015): **Imunologické aspekty v onkologii: cirkulující $\gamma\delta$ T-lymfocyty**. *Klin Onkol*. 28 Suppl 2:2S60-8.

melanemem i u pacientů s karcinomem prsu jsme zachytili několik pacientů, u nichž byly hladiny cirkulujících $\gamma\delta$ T-lymfocytů zvýšené. Zajímavostí je, že pacientka s karcinomem prsu s nejvyšší



Obrázek 27: Převažující subtyp $\gamma\delta$ T-lymfocytů v periferní krvi dospělého člověka.

V periferní krvi dospělého člověka převažuje subtyp V γ 9V δ 2. Tyto buňky částečně exprimují NKG2D (CD314) (dole).

(Das et al., 2001; Rincon-Orozco et al., 2005), v některých případech přímo prostřednictvím $\gamma\delta$ TCR receptoru (Kong et al., 2009). Lidské $\gamma\delta$ T-buňky navíc exprimují receptory rozpoznávající molekulární vzorce (*pattern recognizing receptors*, PRR) jako například Toll-like receptory (TLR), které modulují jejich aktivaci (Shojaei et al., 2009b). Historicky je známá především schopnost mykobakterií reaktivovat $\gamma\delta$ T-lymfocyty (Modlin et al., 1989).

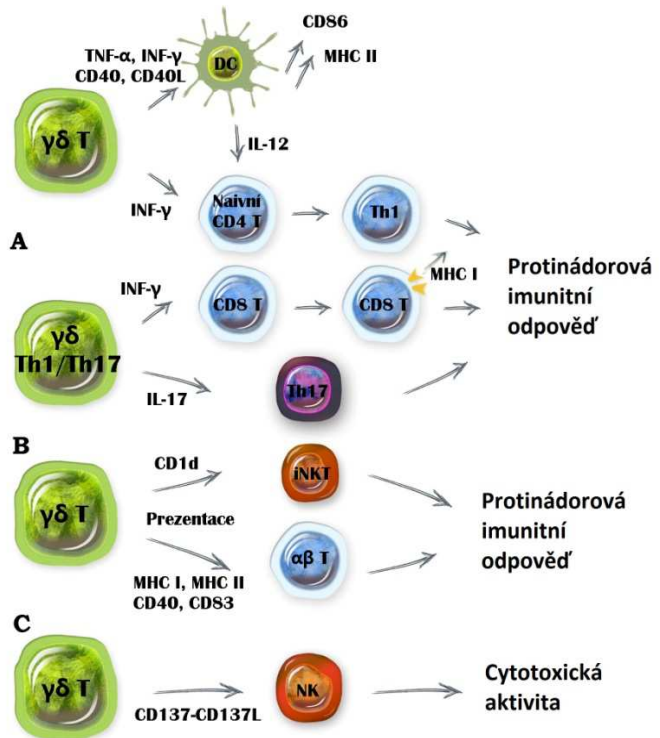
Studie ukázaly, že V γ 9V δ 2 buňky lidské periferní krve dokážou po aktivaci fosfoantigenem vyvolat imunitní odpověď typu Th1 (Dunne et al., 2010), která je charakterizovaná produkcí cytokinů TNF α a IFN γ a cytotoxickou aktivitou (Thedrez et al., 2007). Tato diferenciací V γ 9V δ 2 buněk cestou Th1 pravděpodobně probíhá během jejich periferní expanze po vystavení environmentálním mikrobiálním antigenům. Novorozenecké $\gamma\delta$ buňky produkují IFN γ , schopnost produkovat TNF α získávají po jednom měsíci od vystavení antigenům prostředí po porodu (Gibbons et al., 2009). V *in vitro* podmínkách je ale v závislosti na přítomných cytokinech a stimulech TCR receptoru možno diferencovat $\gamma\delta$ buňky do fenotypů připomínajících Th2, Th17, folikulární pomocné T-buňky (Tfh) nebo regulační T-buňky (Treg) (Casetti et al., 2009; Wesch et al., 2001).

Aktivace a získání efektorových funkcí je u $\gamma\delta$ buněk, stejně jako u ostatních populací T-lymfocytů, podmíněno stimulací TCR receptoru. Ten u $\gamma\delta$ T-lymfocytů specificky rozeznává molekuly, jejichž exprese je zvýšená ve stresových podmínkách. V případě normální buňky je koncentrace izoprenoidních metabolitů (jako např. IPP – izopentyl pyrofosfát) příliš malá na to, aby byla rozpoznána V γ 9V δ 2 buňkami jakožto varovný signál. Deregulace izoprenoidního metabolismu má u některých nádorů za následek nadprodukcii IPP, které je pak detekováno V γ 9V δ 2 buňkami jako nádorový antigen (Gober et al., 2003). K akumulaci IPP dochází například při zablokování

metabolizmu kyseliny mevalonové pomocí aminobisfosfonátů, přičemž se předpokládá, že aktivace $\gamma\delta$ T-lymfocytů může být důvodem pro akutní reakci po podání bisfosfonátů u některých pacientů (Kunzmann et al., 2000). Statiny pak blokují aktivaci a expanzi $\gamma\delta$ T-lymfocytů vyvolanou bisfosfonáty (Thompson and Rogers, 2004). Stimulace NKR exprimovaného $\gamma\delta$ buňkami a částečně také receptoru NKG2D může také efektivně spustit protinádorové funkce těchto buněk. NKG2D je exprimován $V\gamma 9V\delta 2$ buňkami a váže se na nekonvenční MHC molekuly typu MIC nebo ULBP, které jsou exprimovány nádorovými buňkami (Das et al., 2001; Rincon-Orozco et al., 2005). Gammadelta T-lymfocyty stimulují protinádorové efektorové funkce řady komponent imunitního systému (Obrázek 28).

Obrázek 28 **Mechanismy protinádorové imunitní odpovědi prostřednictvím $\gamma\delta$ T-lymfocytů.**

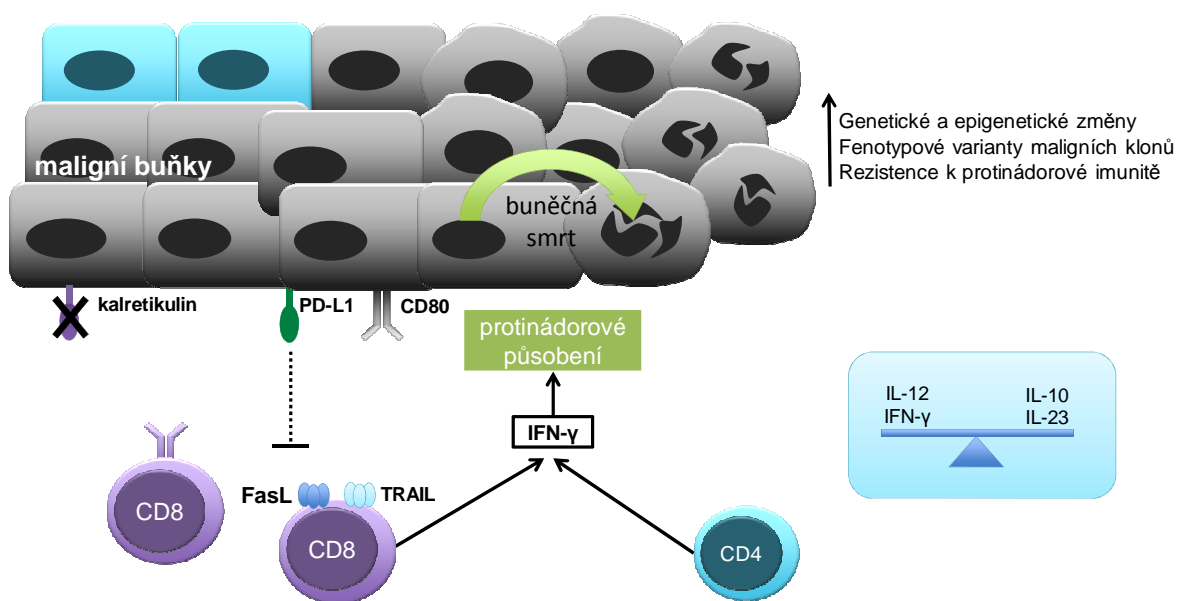
(A) aktivace $\gamma\delta$ buněk vede k produkci $TNF-\alpha$ a $IFN-\gamma$ a expresi CD40L. To napomáhá maturaci dendritických buněk a diferenciaci T-lymfocytů do buněk Th1. $\gamma\delta$ Th17 buňky produkují IL-17 podporující vývoj efektorových Th17 buněk. Buňky Th1 a Th17 vykazují protinádorové funkce. (B) Aktivované $\gamma\delta$ buňky dokáží prostřednictvím trogocytózy získat a exprimovat molekulu CD1d a podporovat aktivaci iNKT buněk. Stejně tak vykazují funkce antigen prezentujících buněk (MHC I a II, CD40, CD83, CD86) a aktivují naivní i efektorové T-lymfocyty s protinádorovou cytotoxickou aktivitou. (C) Aktivované $\gamma\delta$ buňky mohou poskytnout kostimulační signál NK buňkám prostřednictvím exprese molekuly CD137. Adaptováno dle (Lafont et al., 2014).



ROVNOVÁHA A MECHANIZMY ODOLNOSTI NÁDORŮ VŮČI IMUNITNÍMU SYSTÉMU

V případě, že se nádorové buňce podaří uniknout imunitnímu dohledu, dochází v některých případech k rovnováze/*equilibrium*. Během tohoto stavu se imunitnímu systému nedaří nádorové buňky zcela zlikvidovat, jen **potlačit jejich rychlou proliferaci**. V rovnovážné fázi nádorové imunoeditace udržuje imunitní systém maligní tkáň z klinického hlediska v **klidovém stádiu (dormancy)**. Nicméně v nádorové tkáni dochází ke genetickým a epigenetickým změnám a díky konstantnímu **selekčnímu tlaku** imunitního systému dále progredují klony buněk málo imunogenních, rezistentních k imunitní odpovědi a navozujících imunosupresi, což představuje nádorovou imunoeditaci v pravém slova smyslu (Obrázek 29). V současnosti se předpokládá, že tato fáze je dlouhá a často trvá po většinu života jedince. Rovnovážná fáze může nakonec skončit převahou protinádorové složky imunitního systému a dojde k eliminaci tumoru nebo imunitní systém nakonec selekcí zformuje nádor rezistentní k efektorovým mechanismům imunitního systému, který progreduje a klinicky manifestuje.

Ve fázi rovnováhy se tedy uplatňují jak protinádorové mechanismy imunitní obrany, které byly popsány v předchozí kapitole „eliminace“, tak se selektují **mechanizmy odolnosti nádorů vůči imunitnímu systému** a mechanismy navození imunosuprese, kterým je věnována kapitola „únik“. Existuje celá řada mechanismů odolnosti nádorů vůči imunitnímu systému a řada z nich je analogická únikovým mechanismům mikroorganismů. Nádorové buňky mohou i/ up-regulovat anti-apoptotické proteiny (zvýšená exprese bcl-2, bcl-x_L, FLIP, survivin a IAPs, či PI-9 (Ray et al., 2012) a/nebo snížit expresi proteinů spojených s navozením apoptózy např. bax (Manoochehri et al., 2014), CD95/Fas či dalších *death* receptorů (Liu et al., 2015); ii/ snížit expresi proteinů podílejících se na prezentaci antigenů v MHC I a II (Hayakawa and Smyth, 2006; McGranahan et al., 2016); iii/ navodit v nádoru cytokinové a chemokinové prostředí, které snižuje infiltraci nádoru efektorovými T-lymfocyty.



Obrázek 29: **Nádorová imunoeditace – rovnováha.**

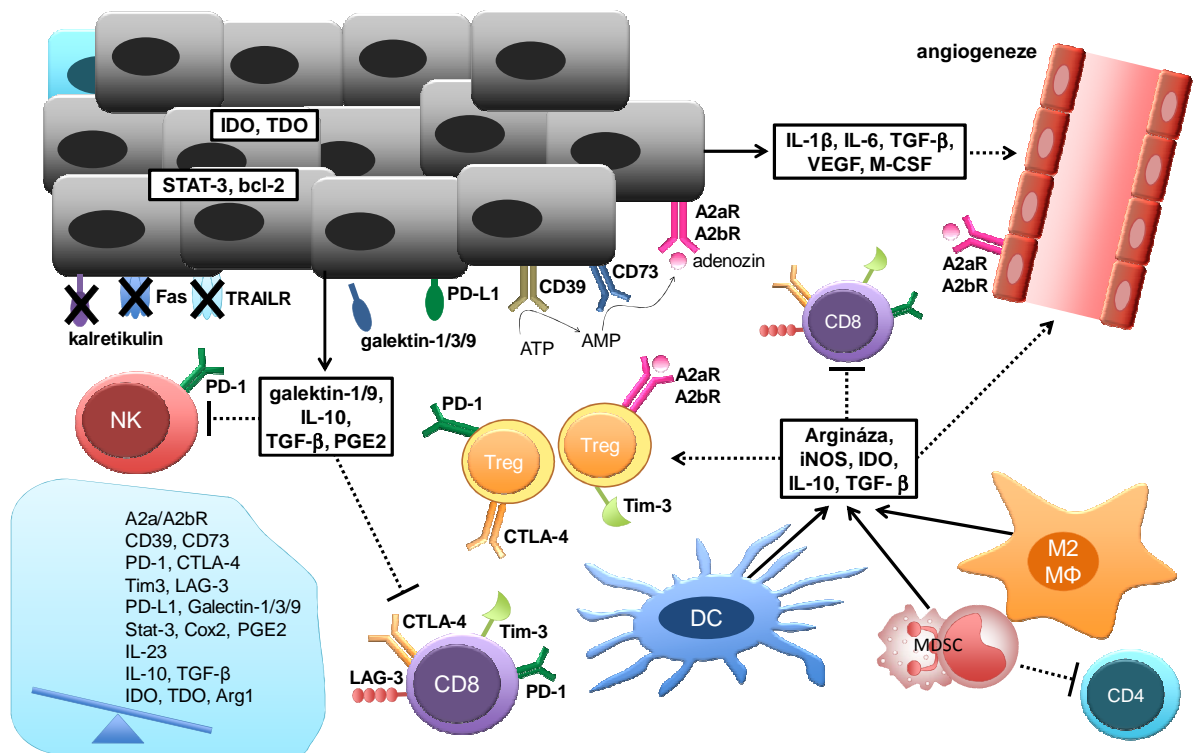
Rovnováha v nádorové imunoeditaci je dočasný stav, kdy nepřevládá schopnost imunitního systému likvidovat maligní buňky ani se nádorová tkáň nevykmane kontrole. Při udržení rovnováhy mezi růstem nádoru a jeho potlačování imunitním systémem se podílejí především složky adaptivní, nikoli nespecifické imunitní odpovědi (jako jsou NK buňky). Nádorové buňky vyvíjejí mechanismy k úniku imunitnímu dohledu jako je snížená prezentace antigenů či exprese PD-L1 navozující buněčnou smrt efektorových T-lymfocytů. Během této fáze jsou v rovnováze protinádorové působky (IL-12, IFN γ) a pronádorové (IL-10, IL-23). Adaptováno dle (Mittal et al., 2014).

Uvedené procesy představují hlavní mechanismy „pasivní“ rezistence nádorových buněk vůči imunitnímu systému. Nádorové buňky a stroma však mají schopnost aktivního potlačení funkce imunitního systému, což je popsáno v následující podkapitole.

ÚNIK IMUNITNÍMU DOZORU A MECHANIZMY IMUNOSUPRESE NAVOZENÉ NÁDOREM

Jako únik/*escape* se označuje stav, kdy mechanismy rezistence a navození imunosuprese nádorovými buňkami převládnu, vzniká **imunosupresivní nádorové mikroprostředí**, dochází k růstu nádoru a ten se začíná klinicky manifestovat. Ke vzniku imunosupresivního nádorového mikroprostředí přispívá celková imunosuprese jedince.

Biologická podstata nástrojů nádorové buňky k navození imunosuprese vychází ze systému imunotolerance buněk plodu; z tolerance neoantigenů, jež se kumulují během senescence jako výsledek somatických mutací nebo jsou exprimovány také normálními buňkami; z potlačení rozvinuté imunitní odpovědi při odeznění signálu, který imunitní odpověď vyvolal. Příklady mechanismů navození aktivní imunosuprese: i/ nádorové buňky nejsou profesionální APC (nemají kostimulační kontext CD80, CD86) a navozují anergii/útlum T-lymfocytů (*tumor-induced anergy*) (Cuenca et al., 2003; Morgan et al., 1998); ii/ protinádorové protilátky podporují růst nádoru; iii/ maligní buňky produkují faktory, které inaktivují T-lymfocyty a dendritické buňky např.IDO, TGFβ, který je velmi účinný při inhibici proliferace T-lymfocytů (Stix, 2007); iv/ maligní buňky exprimují HLA-G, jež navozuje inhibici NK-buněk (Sheu and Shih le, 2010); v/ nádorové buňky exprimují ligandy FasL a PD-L1, jež navozují apoptózu protinádorových T-lymfocytů (Igney and Krammer, 2005); vi/ nádor stimuluje nezralé a tolerogenní dendritické buňky (Rabinovich et al., 2007); další mechanismy a jejich působení je schématicky vyjádřeno na (Obrázek 30) a dále jsou popsány MDSC (str. 58).



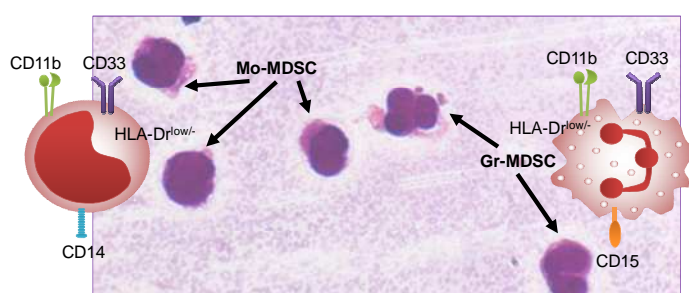
Obrázek 30: **Nádorová imunoeditace – únik.**

V této fázi uniká maligní buňka imunitnímu dohledu (neprezentuje nádorové antigeny, kostimulační molekuly), exprimuje molekuly zvyšující rezistenci (STAT-3), přežívání (anti-apoptotický bcl2), navozující imunosupresi v prostředí nádoru (IDO, TDO, PD-L1, galectin-1/3/9, CD39, CD73, adenosinové receptory) a produkuje působky navozující nádorovou angiogenezi (VEGF, TGFβ, IL-6, M-CSF). MDSC, M2 makrofágy ale také tolerogenní dendritické buňky exprimují imunoregulační látky jako argináza, iNOS, IDO a imunosupresivní cytokiny IL-10 a TGFβ, které potlačují proliferaci cytotoxických CD8+ lymfocytů a indukují apoptózu. MDSC a DC produkující IDO podporují vznik imunosupresivních T-regulačních lymfocytů. Argináza je imunoregulační enzym, který katabolizuje L-arginin na ornitin a ureu. CD39 je ektonukleotidáza metabolizující ATP na AMP, které může být dále štěpeno na adenosin membránovou ektonukleotidázou CD73. Adenosin se váže na receptory A2aR and A2bR na maligních a endoteliálních buňkách. Nádorové mikroprostředí může navodit expresi inhibičních receptorů, jako je PD-1, CTLA-4, Tim-3 či LAG3 na Treg, a cytotoxických T-lymfocytech, což vede k prohloubení lokální imunosuprese. Během fáze úniku převažují imunosupresivní a pronádorové působky a molekuly jako je IL-10, TGF-β, VEGF, IDO, PD-L1. IDO – indol 2,3-dioxygenáza; TDO – tryptofan 2,3-dioxygenáza; iNOS – inducibilní syntáza oxidu dusnatého; MDSC – myeloid-derived suppressor cells; M-CSF – monocyte colony stimulating factor. Adaptováno dle (Mittal et al., 2014).

Z hlediska imunopresivních strategií nádoru stojí v popředí především **regulační T-lymfocyty**, jejichž hlavní funkce je i/ navození a udržení tolerance vlastního (*self-tolerance*), a tím prevence autoimunitních onemocnění; ii/ potlačení alergie a astma; iii/ navození tolerance proti potravinovým antigenům; iv/ navození imunologické tolerance plodu v těle matky; v/ potlačení patogeny navozeného imunopatologického procesu; vi/ regulace typu (Th1 vs Th2) imunitní buněčné reakce; vii/ potlačení aktivace T-lymfocytů navozené slabými podněty; viii/ zpětnovazebná regulace imunitní reakce efektorových T-lymfocytů; ix/ ochrana komenzálních bakterií před eliminací imunitním systémem (Corthay, 2009). T-regulační lymfocyty jsou spojovány s modulací protinádorové imunity ve směru jejího potlačení. T-regulační lymfocyty jsou součástí nádorového stroma a předpokládá se, že jsou jedním z faktorů limitujících účinnou protinádorovou imunitu. U pacientů s ovarialním karcinomem byla elevace T-reg v nádorové tkáni asociována s horší prognózou (Curiel et al., 2004). Nicméně pohled na regulační T-lymfocyty v jiném kontextu, u jiných pacientů a jiným způsobem přinesl různorodé informace o souvislosti hladiny T-reg a prognózy maligního onemocnění. Rozdílné výsledky mohou být dány několika faktory: i/ metodologickým přístupem, např. FoxP3 pozitivita nemusí být limitována na regulační T-lymfocyty, ale může se vyskytovat i u aktivovaných T-lymfocytů; hodnocení lymfocytárního infiltrátu pouze z hlediska supresorových T-reg bez dostatečné informace o přítomnosti imunitních efektorů; ii/ kontextem působení regulačních T-lymfocytů, které mají schopnost potlačovat jak protinádorovou imunitu, tak stroma podporující vznik tumoru (Tzankov et al., 2008), iii/ heterogenitou funkce regulačních T-lymfocytů, která není při vyšetření nádorového infiltrátu zpravidla reflektována, takže z tohoto pohledu není zatím dostatek informací.

VÝSTUP 11: MYELOIDNÍ SUPRESOROVÉ BUŇKY U PACIENTEK S KARCINOMEM PRSU

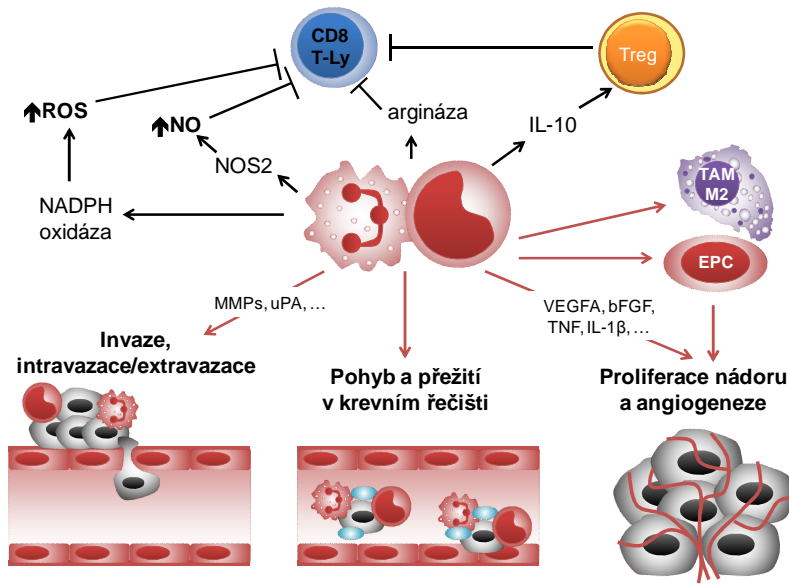
Myeloidní supresorové buňky (MDSCs; myeloid-derived suppressor cells) jsou heterogenní populací multipotentních progenitorových buněk myeloidního původu se sníženou funkcí diferenciací ve zralé myeloidní buňky. Rozeznávají se dvě hlavní populace MDSC: monocytární Mo-MDSC a granulocytární Gr-MDSC (Obrázek 31).



Obrázek 31: **Imunofenotyp a morfologie subtypů MDSC.**

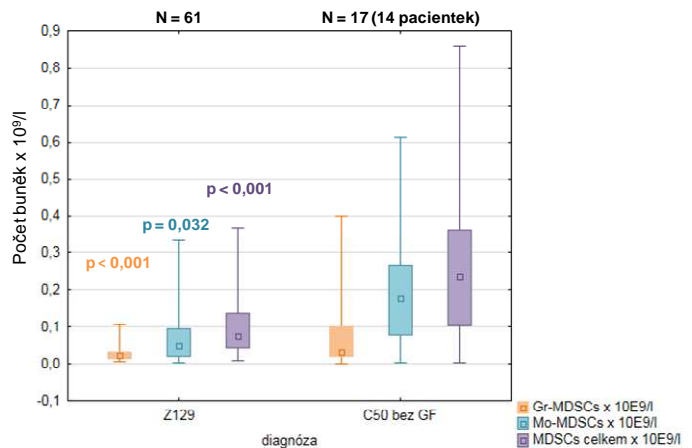
MDSC byly vysortovány na základě imunofenotypu povrchových znaků, z buněčné suspenze byl připraven cytospin a buňky na podložním skle obarveny panoptickým hematologickým barvením (Wright/Giemsa). Mo-MDSC jsou morfologicky podobné monocytům. Gr-MDSC mají členěné jádro jako granulocytární segmenty. Buňky se vyznačují výběžky cytoplazmy.

Nejvíce prostudovanou funkcí MDSCs je útlum imunitní reakce, kde se fyziologicky předpokládá jejich úloha v regulaci nadměrné imunitní odpovědi a tím ochraně tkáně zasažené imunitní reakcí. Z tohoto hlediska se MDSC považují za významné imunoregulátory odpovědné za únik nádoru imunitnímu dohledu a nádorovou progresi, což je dáno ovlivněním imunitních efektorů, ale i jiných buněk v nádorovém mikroprostředí (Obrázek 32).



Obrázek 32 **Mechanismy imunosupresivního a pronádorového působení MDSC.** MDSC produkují IL-10, který navozuje imunosupresi stimulací T-regulačních lymfocytů. MDSC dále produkují arginázu katabolizující L-arginin, což vede k inhibici cytotoxických T-lymfocytů. Díky expresi imunoregulačních enzymů zvyšují MDSC lokální koncentraci ROS a NO, což má také imunosupresivní efekt. Nádorový růst a metastazování však podporují i jinými mechanismy, například napomáhají invazivitě nádoru produkcí proteáz (MMPs, uPA), podílejí se na nádorové angiogenezi diferenciací v endoteliální prekursorové buňky aj. (Brandau et al., 2013; Talmadge and Gabrilovich, 2013).

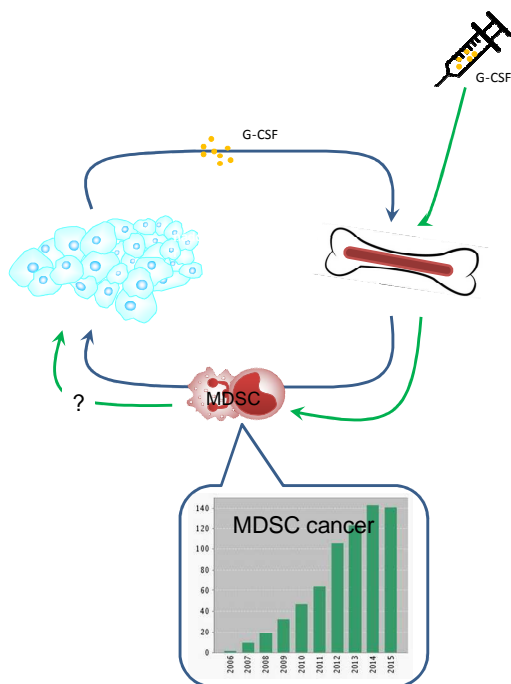
Studie prokazují zvýšený výskyt MDSCs u nádorových onemocnění nejen v okolí nádoru, ale i v periferní krvi, což pozitivně koreluje se špatnou prognózou a mortalitou a naopak negativně koreluje s výskytem a funkcí T-lymfocytů v periferní krvi (Talmadge and Gabrilovich, 2013; Wang et al., 2013; Yu et al., 2013). Zvýšené hladiny MDSC v periferní krvi jsme pozorovali u pacientek s karcinomem prsu (Obrázek 33). Zde je potřeba zdůraznit, že z uvedené analýzy byly vyloučeny pacientky léčené růstovými faktory stimujícími granulocytopoézu (G-CSF) pro zkrácení trvání neutropenie jako důsledku protinádorové chemoterapie. Růstové faktory G-CSF i GM-CSF jsou významným endogenním stimulem MDSC, stimuluji jejich proliferaci či migraci do místa zánětu (Shojaei et al., 2009a). Naše měření prokázala, že farmakologické podání G-CSF vede k elevaci počtu cirkulujících MDSC u pacientek s karcinomem prsu (data zde neprezentují). Zde vyvstává otázka, zda růstové faktory stimující myeloproliferaci podávané k profylaxi febrilní neutropenie nezhoršují prognózu onkologického onemocnění (Obrázek 34). Publikované studie nedávají na tuto otázku jasnou odpověď.



Obrázek 33: **MDSC v periferní krvi pacientek s karcinomem prsu.** Počet Mo-MDSC, Gr-MDSC a jako součet MDSC celkem byl stanoven v periferní krvi jedinců z kontrolní skupiny (Z129) a v periferní krvi pacientek s karcinomem prsu (C50), které neuzívaly růstové faktory pro zkrácení trvání neutropenie. Celkový počet MDSC i obou subpopulací byl vyšší u pacientek s karcinomem prsu v porovnání s kontrolní skupinou.

Obrázek 34: Schéma vztahu nádorové progresi a MDSC.

V mikroprostředí nádoru i v cirkulaci onkologických pacientů byla zaznamenána produkce G-CSF (Waight et al., 2011). Tento G-CSF produkovaný nádorem přispívá ke zvýšení počtu MDSC přímo jejich mobilizací z kostní dřeně a nepřímo uvolňováním hematopoetických progenitorů z KD, ze kterých vznikají MDSC ve slezině. MDSC migrují do prostředí nádoru, kde působí pronádorově ať už imunospupresivně, tak proangiogenně (Obrázek 32Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.). Exogenní růstové faktory přispívají k upregulaci MDSC v cirkulaci. Na myším modelu bylo demonstrováno, že G-CSF produkovaný tumorem zvyšuje počty MDSC a toto je spojeno s chemorezistencí a horším přežitím (Kawano et al., 2015). Otázkou zůstává, jaká je úloha MDSC stimulovaných pomocí exogenních růstových faktorů v biologii nádoru u člověka (Aliper et al., 2014). Dále se předpokládá také úloha G-CSF při navození tolerance T-lymfocytů (Rutella et al., 2005) a publikací věnujících MDSC ve vztahu k maligním onemocněním rychle přibývá, přičemž většina z nich popisuje jejich imunospupresivní pronádorový efekt spojený s chronickým zánětem.



S aktuálním rozvojem poznatků o významném pronádorovém efektu MDSC přibývá prací, které poukazují na možnost protinádorového působení některých léčiv směrem k potlačení chronického zánětu a eliminace MDSC. Příkladem je design léčby odrážející se od vstupní hladiny cirkulujících MDSC a exprese CD247, ve kterém se předpokládá, že pacienti s vysokým počtem MDSC a nízkou expresí CD247 nebudou benefitovat díky imunospupresivnímu prostředí v tumoru z protinádorové terapie a jsou tak kandidáty na anti-MDSC léčbu cestou jejich eliminace (gemcitabin, 5-FU), diferenciaci (ATRA), potlačení jejich akumulace (anti-TNF α , anti-GM-CSF, anti-VEGF, inhibitor CSF-1R či inhibitor COX-2 celecoxib) či inhibice aktivity MDSC (nitroaspirin, sildenafil) (Meirow et al., 2015).

PROTINÁDOROVÁ IMUNOTERAPIE

Počátky protinádorové imunoterapie pocházejí z konce 19. století, kdy byl zformulován koncept specifické imunity a kdy pozorování spontánních regresí malignit byla dávána do souvislosti s probíhajícím infekčním procesem, z čehož vplynuly racionální předpoklady, že progresi nádorů může být utlumena modulací imunitního systému. V té době byly například popsány **regrese** různých typů nádorů v souvislosti se streptokokovým erysipelem (Bush, 1866; Coley, 1891; Fehleisen, 1883). Americký chirurg William Coley z těchto pozorování vycházel a infekční agens použil pro stimulaci imunitního systému u pacientů s malignitami. Extrahoval směs působků ze *Streptococcus pyogenes* a *Serratia marcescens* a tuto směs později nazývanou **Coleyho toxin** či Coleyho vakcína použil u více než 500 pacientů s malignitami různých histotypů a výsledkem byla regrese onemocnění či vyléčení u více než 10 % pacientů (Coley, 1991, 1928, 1910). Po válce začala do onkologické praxe vstupovat cytostatika a radioterapie a tak se imunomodulační přístupy u onkologických pacientů se dostaly do ústraní. Návrat myšlenky imunoterapie nádorových onemocnění přišel s rozvojem poznatků v imunologii, s rozvojem technologií přípravy polyklonálních a monoklonálních protilátek a následným rozmachem přípravy chimérických, humanizovaných a humánních terapeutických protilátek pro cílenou terapii maligních onemocnění.

	Specifická	Nespecifická
Pasivní imunoterapie	Monoklonální protilátky BiovaxID®	
Aktivní imunoterapie	Vakcinace nádorovými antigeny Vakcinace dendritickými buňkami pulzovanými nádorovými antigeny Onkolytický virus T-VEC Chimerické antigenní receptory (CARs)	Humorální: interferony, interleukiny, růstové faktory, checkpoint inhibitory, mifamurtid, imuquimod Buněčné: adoptivní imunoterapie (LAK, TIL, allogenní transplantace GvT efekt, NK-buňky), BCG imunoterapie

Tabulka 5: Přístupy modulace imunitní odpovědi při léčbě onkologických onemocnění.

Imunoterapeutické přístupy lze rozdělit na specifické a nespecifické a z jiného pohledu na aktivní a pasivní (Tabulka 5). **Nespecifická imunoterapie** je založena na obecné modulaci imunitního systému s předpokladem, že díky této imunomodulaci dojde také k posílení protinádorové imunitní odpovědi (viz Coleyho toxin). Nespecifickou imunoterapii můžeme dále rozdělit na humorální, což je typicky podávání rekombinačních interferonů a interleukinů. Do kategorie nespecifické buněčné imunoterapie bychom mohli zařadit adoptivní imunoterapii pomocí expandovaných tumor-infiltrujících lymfocytů či imunoterapii BCG vakcínou obsahující živou oslabenou *Mycobacterium bovis*, která se používá pro léčbu karcinomu močového měchýře. Specifické imunoterapeutické přístupy jsou cíleny na nádorovou buňku respektive na skutečné nebo předpokládané nádorové antigeny. **Specifické přístupy** dále můžeme rozdělit na pasivní a aktivní. Pasivní imunoterapie jsou především terapeutické monoklonální protilátky proti strukturám na povrchu maligních buněk (typicky anti-CD20 rituximab či anti-Her2 trastuzumab) nebo proti solubilním funkčním molekulám (typicky anti-VEGF bevacizumab). Existuje také personalizovaný přístup v podobě BiovaxID pro léčbu folikulárního NHL, což jsou protilátky generované specificky proti antigenům maligní buňky (2012; Villanueva et al., 2011). Specifické imunoterapeutické postupy zahrnují např. i/ vakcinaci nádorovými antigeny spolu se stimulací imunitního systému pomocí adjuvans či cytokinů, ii/ vakcinaci dendritickými buňkami pulzovanými nádorovými

antigeny, iii/ inovativní imunotereputický přístup T-VEC, který byl schválen v říjnu 2015 FDA a na základě pozitivního hodnocení CHMP bude pravděpodobně brzy schválen i evropskou agenturou EMA (Ledford, 2015) pro léčbu pokročilého melanomu. T-VEC je herpesvirový konstrukt, který se replikuje specificky pouze v nádorových buňkách, což vede k produkci GM-CSF kódovaného virem a cytolyze maligní buňky. Následuje atrakce dendritických buněk, pohlcení uvolněných nádorových antigenů a stimulace T-lymfocytů pacienta v obraně proti melanomovým buňkám, iv/ chimerické antigenní receptory T-lymfocytů se testují pro protinádorovou léčbu po vnesení do autologních lymfocytů pacienta, extracelulární doména receptoru se váže na nádorové antigeny a intracelulární doména je arteficiálně připravena tak, aby poskytovala T-lymfocytu aktivační signál.

MONOKLONÁLNÍ PROTILÁTKY

Protinádorové imunoterapeutické protilátky jsou v zásadě dvojího typu: konjugované a nekonjugované. V případě konjugovaných protilátek je na molekulu imunoglobulinu napojena toxická (chemoterapeutikum, např. trastuzumab emtasin) nebo radioaktivní látka. Mechanismus účinku konjugovaných protilátek je pak založen na faktu, že specifická afinita protilátky k cílové struktuře (zpravidla nádorovému antigenu) umožní zacílení chemo či radioterapeutického efektu přímo v místě nádoru. Drtivá většina registrovaných a testovaných protilátek v onkologii jsou protilátky nekonjugované. Jejich efekt je dán především cílovou strukturou, na kterou se vážou.

1/ Historicky největší zkušenosti jsou s protilátkami, které se vážou na **membránové struktury** maligních buněk, které jsou více či méně specifické pro nádorové buňky. Efekt těchto protilátek se odvíjí od povahy antigenní struktury a je pak do různé míry závislý na spoluúčasti imunitního systému. Terapeutický efekt protilátek nezávislý na imunitním systému organismu je spojen např. s blokací vazby přirozeného ligandu na cílový receptor, s internalizací cílové struktury či se změnou struktury cílového receptoru a následnou inhibicí intracelulárních signálních drah, což jsou jevy vedoucí k potlačení buněčného růstu a k navození apoptózy nádorových buněk. Efekt protilátek spojený s imunitním systémem je dán tím, že protilátky opsonizují cílovou buňku, což znamená, že Fab fragment je navázaný na maligní buňce a Fc fragment je k dispozici imunitním buňkám s receptory pro Fc fragment Ig (viz také Výstup 6:) včetně monocytům a NK-buňkám, u kterých dojde po aktivaci Fc receptorů k uvolnění cytolytických perforinů a granzymů a indukci apoptózy u cílových buněk (viz Obrázek 22, str. 49). Tento proces se označuje jako buňkami zprostředkovaná cytotoxicita závislá na protilátkách ADCC. Nově vyvíjené generace monoklonálních protilátek mají konstrukci Fc fragmentu takovou, aby byla zvýšena afinita k FcγRIIIA (CD16), což výrazně zvyšuje ADCC u cílových buněk (Seidel et al., 2013; Weiner et al., 2010). Opsonizace protilátkami IgG1 také spouští aktivaci komplementu, což vede k lýze buněk prostřednictvím CDC, vazba komplementu také zvyšuje ADCC.

2/ V případě, že se protilátky vážou na **solubilní molekuly**, je jejich efekt založen na potlačení dostupnosti cílové molekuly pro patofyziologické procesy spojené s progresí malignity, příklad: bevacizumab, který interaguje s VEGF.

3/ Aktuálně zažívají v onkologii rozmach protilátky, které jsou cílené na klíčové **regulační molekuly buněk imunitního systému**. Jedná se především o protilátky proti CTLA-4, PD-1, či PD-L1. Anti-CTLA-4 protilátka, ipilimumab, blokuje inihibiční molekulu CTLA-4 na povrchu T-lymfocytů.

Povrchový receptor CTLA-4 kompetuje s CD28 o vazbu na kostimulační molekuly B7 (CD80/CD86) antigen prezentujících buněk (Obrázek 19, str. 43). Při blokaci CTLA-4 ipilimumabem dochází k efektivní stimulaci T-lymfocytů pomocí APC. Ipilimumab je v současnosti registrován pro léčbu pokročilého melanomu a v klinickém testování je pro další, především imunoresponzivní malignity, NSCLC, SCLC, nádor močového měchýře, metastatický hormonálně refrakterní karcinom prostaty. Ipilimumab je díky svému mechanismu účinku spojen se zánětlivými či autoimunitními projevy různé závažnosti (Lakomy and Poprach, 2015). Výsledky léčby ipilimumabem u pacientů s pokročilým melanomem jsou slibné, kdy u některých pacientů bylo dosaženo dlouhodobé odpovědi (Ascierto et al., 2014; Wolchok et al., 2013). Druhou skupinou protilátek regulujících přímo funkci imunitního systému jsou protilátky proti povrchové molekule PD-1 nebo jejímu ligandu PD-L1. Interakce PD-L1 na povrchu APC s PD-1 na povrchu T-lymfocytů vede k inhibici proliferace a aktivace T-lymfocytů (Karwacz et al., 2011). Ligand PD-L1 exprimují na svém povrchu také některé maligní buňky, což slouží jako jejich nástroj úniku imunitní odpovědi organismu (Hamanishi et al., 2007; Thompson et al., 2004). Blokace PD-1 či PD-L1 protilátkami (např. nivolumab, pembrolizumab, pidilizumab, lambrolizumab a další) pak vede k eliminaci signalizace blokující T-lymfocyty. Toxicita spojená s inhibicí PD-1 systému je mírnější než v případě blokace CTLA-4 a klinické výsledky při léčbě imunoresponzivních malignit jsou významné (Ivashko and Kolesar, 2016; Topalian, 2013; Viteri et al., 2015). Uvedené monoklonální protilátky tedy stimulují imunitní systém organismu díky potlačení blokace imunitního systému; díky tomu je řadíme spíše do oblasti aktivní imunoterapie a jsou nazývány checkpoint inhibitory (Littman, 2015; Ribas, 2015).

Dle **technologie**, jakou byly připraveny, a tím souvisejícího obsahu zvířecích (zpravidla myších) versus lidských proteinů rozlišujeme protilátky na myší, chimerické (s označením končícím na „ximab“; cetuximab, rituximab), humanizované (s označením končícím na „zumab“; bevacizumab, trastuzumab) a humánní (s označením končícím na „umab“; panitumumab). Obecně lze říci, že s vyšší proporcí lidských proteinů se stává protilátka z medicínského hlediska vhodnější; klesá její antigenicita pro lidský imunitní systém a s tím nežádoucí účinky a zároveň roste její schopnost aktivovat žádoucím způsobem imunitní systém ve smyslu navození ADCC a CDC (Obrázek 22, str. 49).

VÝSTUP 12: PARADOXNÍ EFEKT TRASTUZUMABU NA TRAIEM INDUKOVANOU APOPTÓZU NÁDOROVÝCH BUNĚK

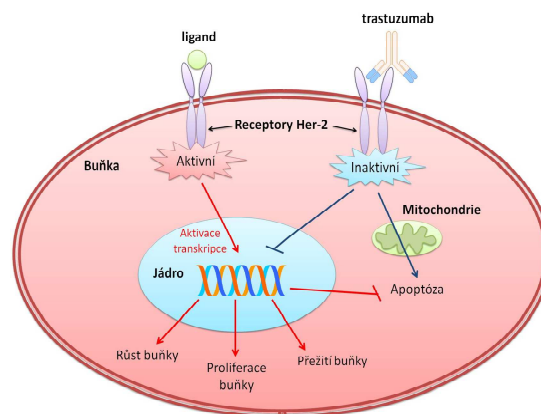
Receptor HER2/neu je nadměrně exprimován u přibližně 10–15 % pacientek s karcinomem prsu a u některých dalších nádorů např. karcinomu žaludku. Overexprese Her-2 je díky intracelulární signalizaci vedoucí od tohoto receptoru spojena s horší prognózou nemoci (Obrázek 35). Humanizovaná anti-Her2 protilátka trastuzumab (Herceptin) byla vyvinuta pro léčbu karcinomu prsu se zvýšenou expresí Her-2 receptoru (Shepard et al., 1991) (Obrázek 35).

V dnešní době je trastuzumab registrován 1/ pro terapii Her2-positivního karcinomu prsu: v 1. linii metastatického onemocnění v kombinaci s paklitaxelem nebo v kombinaci s docetaxelem, v 1. linii metastatického onemocnění v kombinaci s inhibitorem aromatáz nebo v monoterapii u pacientek, které jsou předlčeny 2 liniemi paliativní chemoterapie, 2/ pro adjuvantní terapii Her2-positivního karcinomu prsu po chirurgickém zákroku, po chemoterapii a po radioterapii, 3/ v kombinaci

s chemoterapií pro neadjuvantní terapii lokálně pokročilého Her-2-positivního karcinomu prsu, 4/ pro paliativní léčbu metastatického Her-2-positivního karcinomu žaludku v kombinaci s chemoterapií (cisplatinou + kapecitabin nebo 5-fluorouracil (EMA, 2015b). V současnosti jsou dostupné i další terapeutické monoklonální anti-Her-2 protilátky (např. pertuzumab, trastuzumab emtansin) a v různé fázi klinického hodnocení jsou biosimilary trastuzumabu (GaBi, 2015). Overexprese proteinu Her-2 a/nebo amplifikace genu Her-2/neu je prediktivním faktorem pro léčbu karcinomu prsu trastuzumabem. Nicméně úspěšnost léčby trastuzumabem je významně zatížena tím, že většina pacientek s karcinomem prsu vyvine rezistenci k léčbě anti-Her2 (Cardoso et al., 2002).

Na efektu trastuzumabu na nádorové buňky *in vitro* se dominantně podílí zvýšení hladiny inhibitoru cyklin dependentní kinázy p27^{Kip1} a následné zastavení buněčného cyklu (Le et al., 2003; Yakes et al., 2002). *In vivo* je ale efekt na buněčný cyklus minimální a uplatňuje se indukce apoptózy v nádorových buňkách (Mineo et al., 2004; Mohsin et al., 2005). Vazba trastuzumabu na Her-2 molekuly na povrchu nádorových buněk vede v kontextu hostitele ke stimulaci NK-buněk a k ADCC (Carson et al., 2001; Kubo et al., 2003; Sliwkowski et al., 1999) a cytotoxicitě po fixaci komplementu (Spiridon et al., 2002). Vzhledem

k tomu, že jednou z protinádorových zbraní efektorových buněk (cytotoxické T-lymfocyty a NK-buňky) je aktivace *death* receptorů na maligních buňkách (Obrázek 22, str. 49), zjišťovali jsme na modelu buněčných linií karcinomu prsu efekt trastuzumabu na indukci apoptózy prostřednictvím ligandu TRAIL¹⁷. Překvapivým zjištěním bylo, že u jedné z testovaných buněčných linií se zvýšenou expresí Her-2 BT474 (ale ne SKBr-3) vedlo působení trastuzumabu ke snížení buněčné smrti navozené TRAILem (Příloha 17 - Fig. 1). Dále jsme zkoumali, která komponenta signální dráhy Her-2 je za tento efekt zodpovědná, a zjistili jsme, že inhibice PI3K/Akt kinázové dráhy (ale ne MAPK kinázové dráhy) zachrání buňky BT474 zcela před apoptózou navozenou TRAILem (Obrázek 36) ale ne mitomycinem C (Příloha 17 - Fig. 4). Dále jsme zkoumali vliv trastuzumabu a inhibice PI3K/Akt kinázové dráhy na buněčné komponenty TRAIL-receptorové apoptotické dráhy, přičemž jsme zjistili, že trastuzumab a ještě výrazněji samotná inhibice PI3K/Akt vede k redukcí povrchové exprese pro-apoptotických TRAIL-R1 a TRAIL-R2 a anti-apoptotického Bcl-x_L, a nemá významný vliv na Bcl-2, FLIP_L, FLIP_S, IAP-1, IAP-2, XIAP, fosforylovaný Bad, p27 (Příloha 17 - Fig. 3, Fig. 5, Fig. 6).



Obrázek 35: Schématické znázornění efektu Her-2 overexprese a trastuzumabu na biologii nádorové buňky.

Zvýšená exprese Her-2 vede k dimerizaci receptoru a aktivaci jeho intracelulární domény. Intracelulární signalizace od tohoto receptoru pak vede k rezistenci buňky k apoptóze, proliferaci a buněčnému růstu. V případě vazby trastuzumabu na receptor Her-2 dochází k blokaci intracelulární signalizace downstream Her-2, na které je maligní buňky závislá, a dochází k inhibici buněčného růstu.

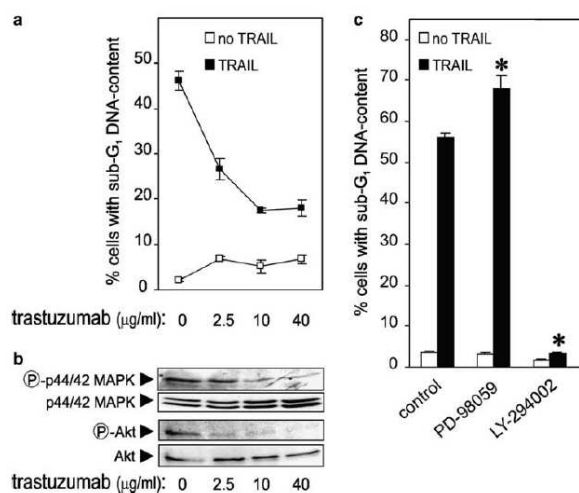
¹⁷ Dubská L., Andera L., Sheard M. A. (2005): **HER2 signaling downregulation by trastuzumab and suppression of the PI3K/Akt pathway: an unexpected effect on TRAIL-induced apoptosis.** *FEBS Lett.* 579(19):4149-58. IF 3,341, citace WOS 19

Zjištěný antiapoptotický efekt trastuzumabu je specifický pro buňky s určitým kontextem, pravděpodobně takovým, kdy pro apoptózu navozenou prostřednictvím *death* receptorů není třeba amplifikace apoptotického signálu mitochondriální apoptotickou dráhou.

Naše práce ukazující, že v určitém buněčném kontextu může mít inhibice „pronádorové“ signální transdukce specifický (TRAIlem navozený) antiapoptotický efekt, je mezi publikacemi demonstrujícími kauzální vztah mezi aktivací PI3K/Akt kinázové dráhy a rezistencí k TRAIlem navozené apoptóze, ojedinělá. V širším pohledu však existuje podobně rozporuplný efekt aktivace Ras, jež je jedním z aktivátorů PI3K/Akt kinázové dráhy (Obrázek 5, str. 16), na apoptózu navozenou ligandem TRAIL. Některé práce popisují, že antiapoptotický efekt

aktivace Ras zahrnuje také rezistenci k apoptóze navozené ligandem TRAIL (Abdulghani et al., 2013; Chen et al., 2014; Xu et al., 2013). Jiné práce ale ukazují opačný jev, kdy zvýšená exprese Ras vede ke zvýšené citlivosti k apoptóze navozené TRAIlem u buněk karcinomu žaludku (Drosopoulos et al., 2005) či pankreatu (Kanzaki et al., 2013) a to prostřednictvím navození zvýšené exprese receptorů pro TRAIL na cílových buňkách (Oh et al., 2012), (Sahu et al., 2011), (Wang et al., 2005), což je v souladu s našimi výsledky.

V době, kdy jsem se TRAIlem indukovanou apoptózou zabývala, se díky slibným preklinickým výsledkům velká naděje vkládala v indukci apoptózy maligních buněk právě pomocí tohoto ligandu v jeho rekombinantní solubilní podobě nebo v podobě buněčné terapie (T-lymfocyty nebo kmenové buňky) buňkami exprimujícími TRAIL nebo v indukci apoptóza pomocí agonistické protilátky proti TRAIL-R2 (conatumumab) (Stuckey and Shah, 2013). Byla iniciována i řada klinických hodnocení, z nichž některá byla předčasně ukončena. Klinické hodnocení fáze Ib/II neprokázalo efektivitu conatumumabu v kombinaci s modifikovaným režimem FOLFOX6 a bevacizumabem v 1. linii léčby pacientů s metastatickým kolorektálním karcinomem (Fuchs et al., 2013). Ve světle nových poznatků o zásadním významu typu buněčné smrti a jejich konsekvencích pro stimulaci imunitního systému a pro následné rozvinutí imunitní reakce proti maligním buňkám a navození udržitelného protinádorového efektu je třeba pohlížet na buněčnou smrt navozenou ligandem TRAIL i kontextu imunogenního potenciálu (McCray, 2014).



Obrázek 36: **Inhibice MAPK a inhibice PI3K kinázové má rozdílný efekt na apoptózu navozenou TRAIlem u buněk BT474.**

(a, b) Buněčná linie byla pěstována v přítomnosti trastuzumabu po 48 hodin. (a) Buňky byly vystaveny působení TRAIL v koncentraci 20 ng/ml. Po 40 hodinách byla apoptóza stanovena jako zastoupení buněk se sub-G₁ obsahem DNA. (b) Efekt trastuzumabu na MAPK a PI3K/Akt kinázovou dráhu byl stanoven pomocí imunoblotu s anti-fosfo-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204) protilátkou a anti-fosfo-Akt (ser473) protilátkou. (c) Buňky byly inkubovány za přítomnosti 20 µM PD-98059 (inhibitor MAPK) nebo za přítomnosti 20 µM LY-294002 (inhibitor PI3K/Akt) a po 48 hodinách jim byl podán TRAIL. Apoptóza byla stanovena jako v (a).

PROTINÁDOROVÉ VAKCÍNY

Počátky tohoto imunoterapeutického přístupu byly spojeny s využitím imortalizovaných nádorových buněk, lyzátů z nádorových buněk, definovaných nádorových peptidů, komplexů HSP, které byly spolu s adjuvans aplikovány onkologickým pacientům. Jako adjuvans jsou používány i/ mikrobiální látky např. inkompletní Freundovo adjuvans, CpG, ii/ cytokiny jako je GM-CSF, IL-2, IL-12, IFN α . Tento přístup předpokládá, že aplikace nádorových antigenů spolu s adjuvans spustí přirozenou imunitní odpověď, tedy správnou prezentaci antigenů prostřednictvím APC efektorovým T-lymfocytům, což způsobí cytolýzu nádorových buněk v primárním ložisku i v metastázách. Ve vakcinačních strategiích lze využít i **preexistující imunitu** např. přítomnost určitého druhu protilátek a jejich cílové antigenní struktury aplikovat intratumorálně a prostřednictvím daných protilátek vyvolat sekundárně imunitní odpověď vůči nádoru. Takovými protilátkami mohou být například anti-Gal, jejichž cílem jsou $\alpha(1,3)$ galaktosylované epitopy.

VÝSTUP 13: PŘIROZENÉ PROTILÁTKY PROTI ALFA(1,3)-GALAKTOSYLOVÉMU EPITOPU

Přirozené protilátky proti sacharidovým antigenům jsou součástí lidských sér; nejvíc je jich namířeno proti α -galaktosylovému epitopu (Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc-R). Tyto anti-Gal protilátky se vyskytují pouze u lidí, lidoopů a opic Starého světa, u kterých došlo během evoluce (před 20-28 miliony let) ke konstitutivní inaktivaci genu pro α 1,3-galaktosyltransferázu. U savců mimo primáty, poloopice a opice Nového Světa vede funkční α 1,3-galaktosyltransferáza k syntéze α -gal epitopů, navození tolerance k nim, což má za následek nepřítomnost anti-Gal protilátek u těchto skupin savců. Tvorba anti-Gal protilátek u hominoidů je indukována fyziologickou střevní mikroflórou (Galili, 2013). Protilátky se produkují ve třídách IgG, IgA, IgM, ale u některých jedinců (především v souvislosti s napadením klíštětem (Commins et al., 2011; Gonzalez-Quintela et al., 2014)) dochází také k tvorbě anti-Gal IgE protilátek a tyto protilátky pak způsobují specifické typy alergií včetně pozdní přecitlivělosti na červené maso a želatinu a anafylaxi po expozici cetuximabu (viz dále) (Chung et al., 2008; Morisset et al., 2012; Nunez et al., 2011). Vznik anti-Gal IgE protilátek byl popsán v souvislosti s napadením klíšťaty v Americe, kde vznik protilátek způsobuje klíště americké *Amblyomma americanum* (Commins et al., 2011), zatímco v Evropě a Austrálii jsou to klíšťata rodu *Ixodes* (Hamsten et al., 2013; Villalta et al., 2015).

Napadení klíštětem a následné uvolnění slin a střeva do kůže a krve hostitele může mít různý dopad: rezistence či tolerance k následnému kousnutí klíštětem. Na experimentálních zvířecích modelech (morčata, určitá plemena skotu) bylo popsáno navození rezistence ke klíšťatům na základě opakované expozice klíšťatům (Allen, 1973). Tato rezistence vede jednak ke snížení nasátosti klíštěte, ale také k redukci infekce klíštětem přenášenými patogeny, což bylo popsáno u patogenů jako je *Francisella tularensis* (Bell et al., 1979) či *Borrelia burgdorferi* (Nazario et al., 1998). Navození získané rezistence ke klíšťatům není obecným fenoménem; bylo popsáno pouze u určitých druhů živočichů, v rámci druhů např. u jednotlivých plemen skotu či ras psů (Ferreira et al., 2003; Piper et al., 2009; Wambura et al., 1998) a u člověka byla v tomto kontextu popsána interindividuální variabilita (Sutherst, 2001). Rezistenci ke klíšťatům, která se projevovala jednak nízkou nasátostí klíšťat a také velmi nízkou přítomností boreliových spirochet u klíšťat, jsme pozorovali u pěvušky modré (*Prunella modularis*), čímž se tento druh významně odlišoval od

jiných druhů řádu Passeriformes¹⁸. Rezistence ke klíšťatům je spojena s modulací řady komponent imunitního systému hostitele jako jsou protilátky, komplement, stimulační vlastnosti APC, Th1 imunitní odpověď (Brown, 1988; Wikel, 1996).

Na druhou stranu bylo popsáno, že komponenty slin a gastrointestinálního traktu klíšťat modulují imunitní odpověď směrem k posílení Th2 a potlačení prozánětlivé reakce (Preston et al., 2013; Wikel, 2013), což navozuje stav, který méně poškozuje sající klíště a usnadňuje přenos patogenů přenášených klíšťaty na hostitele. Tato Th2 imunitní odpověď je spojená s produkcí IgE protilátek právě proti α -gal epitopům (Conrad et al., 2010) obsaženým v gastrointestinálním traktu klíšťat. Vzhledem k tomu, že inokulace α -gal epitopy samotnými nenavozuje stimulaci anti-Gal IgE (Yilmaz et al., 2014), je zřejmé, že kontext Th2 stavu imunitního systému, do kterého přichází nebo ho navozuje přísátí klíštěte je zásadní pro produkci anti-Gal IgE protilátek. Otázkou také zůstává, co je zdrojem α -gal epitopů v gastrointestinálním traktu klíštěte; zdali jsou to glykoproteiny produkované klíštětem či bakterie, které osidlují střevo klíštěte jako je např. *E. coli* (Andreotti et al., 2011) či jiné symbiotické případně patogenní bakterie¹⁹, jež nejsou doposud zcela popsány. Dle současných poznatků jsou anti-Gal protilátky významné z onkologického hlediska z několika důvodů:

1/ Vzhledem k přítomnosti α -gal epitopů na Fab fragmentu cetuximabu dochází v případě výskytu anti-Gal IgE protilátek k systémovým alergickým reakcím, které mohou být velmi vážné a vedoucí až k anafylaktickému šoku (Chung et al., 2008). Přítomnost α -gal epitopů v cetuximabu je dána faktem, že se jedná o chimérickou protilátku obsahující 34 % myších proteinů. Pro klinickou praxi je z tohoto hlediska podstatné, že při hypersenzitivitě na cetuximab je možné pacienty s *KRAS*-wt kolorektálním karcinomem léčit jinou anti-EGFR protilátkou panitumumabem, který je plně humánní (Brugger, 2010).

2/ Vzhledem k rozvoji poznatků vztahu mezi střevním mikrobiomem a rozvojem a prognózou maligních onemocnění (viz dříve, str. 35) je nasnadě otázka, jakou hrají přirozené anti-Gal protilátky, které vznikají proti sacharidům střevní mikroflóry, úlohu v systémové biologii maligních onemocnění. Při vývoji testovacího kitu ke kvantitativní detekci anti-Gal protilátek jsme vyšetřovali hladiny anti-Gal protilátek třídy IgG, IgA, IgM u pacientů s vybranými malignitami a tyto hladiny porovnávali s hodnotami u kontrolní skupiny zdravých jedinců²⁰. Naše výsledky ukázali, že koncentrace antigalaktosylových protilátek v séru je závislá na pohlaví: IgM anti-Gal jsou u zdravých žen ve vyšších titrech než u zdravých mužů ($p < 0,01$). V séru pacientů s karcinomem prsu, kolorektálním karcinomem, karcinomem pankreatu a maligním melanomem jsou přítomny přirozené protilátky proti galaktosylovému epitopu v koncentracích podobných jako u zdravých osob, a to v izotypech IgG, IgM a IgA. U pacientů, mužů, s kolorektálním karcinomem byly zjištěny koncentrace IgA (třída imunoglobulinou související se slizniční imunitou) anti-Gal

¹⁸ Dubska L., Literak I., Kocianova E., Taragelova V., Sverakova V., Sychra O., Hromadko M. (2011): **Synanthropic birds influence the distribution of *Borrelia* species: analysis of *Ixodes ricinus* ticks feeding on passerine birds.** *Appl Environ Microbiol.* 77(3):1115-7. IF 3,952, citace WOS 8

¹⁹ Hajduskova, E., Literak I., Papousek, I., Costa F.B., Novakova, M., Labruna, M.B., Zdražilova-Dubska, L. (2016): '***Candidatus Rickettsia mendelii***', a novel basal group rickettsia detected in *Ixodes ricinus* ticks in the Czech Republic. *Ticks Tick Borne Dis.* 7: 482-486. IF 2,878

²⁰ Hamanová M., Zdražilová- Dubská L., Valík D., Lokaj J. (2014): **Natural antibodies against α (1,3) galactosyl epitope in the serum of cancer patients.** *Epidemiol Mikrobiol Imunol.* 63(2):130-3. IF 0,306, Citace PubMed 1

vyšší než u zdravých mužů ($p < 0,01$) (Příloha 20 – Graf 3), z čehož vyvstává otázka, zda má tato vyšší hladina souvislost s rozvojem kolorektálního karcinomu či je produkce IgA anti-Gal protilátek reakcí na přítomnost tumoru. U pacientů s gastrointestinálními tumory bylo pozorováno, že vyšší hladiny anti-Gal protilátek souvisí s horším klinickým průběhem onemocnění (Smorodin et al., 2013). Nicméně v této studii nebyla provedena analýza hladiny anti-Gal s ohledem na stádium onemocnění, není tedy zřejmé, jaký je vztah anti-Gal protilátek v prognóze kolorektálního karcinomu. Tato problematika je v současné době předmětem výzkumu a klinických hodnocení.

3/ Posledním aspektem anti-Gal v onkologii je potenciální využití těchto protilátek v imunoterapii maligních onemocnění. Vzhledem k abundanci anti-Gal protilátek v lidském organismu je testována imunoterapie pomocí α -gal glykolipidů aplikovaných intratumorálně (Whalen et al., 2012). Byla provedena klinická studie fáze I s eskalací dávky α -gal glykolipidů u pacientů s karcinomem pankreatu s cílem posouzení toxicity a proveditelnosti, přičemž nebyla zaznamenána vážná imunologická toxicita včetně alergie (NCT00668382). Klinické hodnocení fáze I s eskalací množství intratumorálně podaných α -gal glykolipidů bylo ukončeno také u pacientů s maligním melanomem, výsledky zatím nejsou k dispozici (NCT00668512). Při intratumorální aplikaci α -gal glykolipidů dochází k opsonizaci maligních buněk a následné aktivaci APC, což spouští systémovou imunitní reakci vůči nádorovým antigenům v místě aplikaci i případných metastáz (Abdel-Motal et al., 2009; Qiu et al., 2011; Tanemura et al., 2013). Principem imunoterapie α -gal glykolipidy je tedy přeměnit léčený tumor na dočasnou vakcínu, která „naučí“ imunitní systém díky preexistujícím anti-Gal protilátkám rozeznat a zlikvidovat metastatické nádorové buňky exprimující nádorové antigeny.

Výše uvedené imunoterapeutické postupy předpokládají adekvátní preexistující imunitu a/nebo adekvátní funkci imunitního systému, kdy manipulace imunitního systému spočívá pouze v prezentaci nádorových antigenů v kontextu nespecifické stimulace imunitního systému. Nedostatečnou aktivaci imunitní odpovědi směrem k nádorovým antigenům lze efektivněji překonat terapeutickou aplikací přímo antigen prezentujících buněk tedy **dendritických buněk stimulovaných *in vitro* nádorovými antigeny**. Jedná se o technologicky poměrně náročný postup, kdy se dendritické buňky získávají diferenciací z autologních prekurzorů v periferní krvi pacienta. Prekurzory dendritických buněk mohou být CD34+ buňky nicméně v dnešní době se využívají spíše relativně snadno dostupné cirkulující monocyty, které působením IL-4 a GM-CSF diferencují do imunokompetentních dendritických buněk. Takovéto buňky je možné stimulovat nádorovými antigeny, nativními nebo syntetickými peptidy nádorových antigenů či cDNA nádorových antigenů. Pulzované dendritické buňky jsou dále vystaveny maturačním faktorům nejčastěji typu PAMPs (např. LPS či poly(I:C)) a stimulačním cytokinům např. IFN γ či TNF α . Takto vznikají semimaturované nebo maturované dendritické buňky, které jsou následně v dávkách aplikovány onkologickým pacientům. Aplikace je zpravidla intradermální případně intranodální.

V současné době je jediným registrovaným léčivým přípravkem – protinádorovou vakcínou na bázi dendritických buněk **sipuleucel-T** (komerční název Provenge), což je autologní buněčná imunoterapie na bázi DC, která je indikovaná u asymptomatického nebo minimálně symptomatického hormonálně refrakterního karcinomu prostaty. Tato vakcína je registrována FDA a její registrace v EU u Evropské lékové agentury byla na žádost výrobce z komerčních důvodů v květnu 2015 ukončena. Cena vakcíny v USA byla při registraci v roce 2010 93 tis. USD (Begley, 2012). V České republice jsou protinádorové vakcíny na bázi dendritických buněk vyráběny na

dvou pracovištích a jsou předmětem klinických hodnocení. Přípravky biotechnologické firmy **SOTIO** jsou v současnosti v I-III fázi klinických hodnocení; konkrétně se jedná o i/ přípravek DCVAC/PCa testované ve fázi III u pacientů s metastazujícím kastročně rezistentním karcinomem prostaty, ii/ přípravek DCVAC/OvCa testovaný ve fázi II v kombinaci se standardní léčbou u pacientek s epitelálním karcinomem vaječníků a iii/ přípravek DCVAC/LuCa testovaný ve fázi I/II v kombinaci se standardní chemoterapií u pacientů s pokročilým metastatickým nemalobuněčným karcinomem plic. Vyjmenované přípravky jsou *in vitro* připravené autologní dendritické buňky pulzované imortalizovanými nádorovými buněčnými liniemi (Podrazil et al., 2015). Druhým pracovištěm, které má povolení k výrobě protinádorové imunoterapie na bázi dendritických buněk, v České republice je Masarykova univerzita cestou centra **ACIU** Farmakologického ústavu Lékařské fakulty. Masarykova univerzita v současné době vyrábí a v klinickém hodnocení fáze I (zadavatel: Masarykova univerzita, zkoušející pracoviště: Klinika dětské onkologie FN Brno a LF MU) testuje v klinickém hodnocení „Kombinovaná protinádorová terapie s *ex vivo* manipulovanými dendritickými buňkami produkujícími interleukin-12 u dětských, adolescentních a mladých dospělých pacientů s progredujícími, relabujícími nebo primárně metastatickými malignitami vysokého rizika“ (eudraCT 2014-003388-39)(KDO_DC1311, 2015) dendritické buňky pulzované nádorovým lyzátem získaným z tumoru daného pacienta (více od str. 70).

Z hlediska regulačního spadají protinádorové vakcíny na bázi dendritických buněk do skupiny tzv. **léčivých přípravků pro moderní terapie (ATMP)**, jež podléhají Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1394/2007 ze dne 13. listopadu 2007 o léčivých přípravcích pro moderní terapii a o změně směrnice 2001/83/ES a nařízení (ES) č. 726/2004. Pokud nejsou registrované, lze ATMP podat pouze v rámci schválených klinických hodnocení nebo na základě nemocniční výjimky dle Zákona č. 378/2007 Sb., o léčivech a o změnách některých souvisejících zákonů (zákon o léčivech) §49a. ATMP se rozděluje do 3 základních kategorií a dále regulace rozeznává kombinované a hraniční ATMP (Tabulka 6).

ATMP	Definice
<p>léčivý přípravek pro somatobuněčnou terapii (sCTMP) definovaný v části IV přílohy I směrnice 2001/83/ES, ve znění pozdějších předpisů</p>	<p>biologický léčivý přípravek, který má <u>obě</u> následující vlastnosti: (a) obsahuje buňky nebo tkáň, které byly předmětem zásadní manipulace, čímž došlo ke změně biologických vlastností, fyziologických funkcí nebo strukturálních vlastností relevantních pro zamýšlené klinické použití, nebo buňky nebo tkáň, které nejsou určeny k použití pro stejnou základní funkci (stejně základní funkce) u příjemce a dárce, nebo z takových buněk nebo tkání sestává; (b) je představen s tím, že má vlastnosti pro léčbu, prevenci nebo diagnostiku v případě onemocnění na základě farmakologického, imunologického nebo metabolického působení svých buněk nebo tkání, nebo je za tímto účelem používán u lidí nebo podáván lidem. Pro účely písmene a) se zejména manipulace uvedené v příloze I Nařízení (ES) č. 1394/2007 nepovažují za zásadní manipulace: řezání, rozmělnění, tvarování, odstředování, namáčení v antibiotických nebo antimikrobiálních roztocích, sterilizace, ozařování, oddělení, zahušťování nebo čištění buněk, filtrování, lyofilizace, zmrazení, kryokonzervace a vitrifikace. Je třeba poukázat na to, že tento seznam manipulací, které nejsou považovány za zásadní, není vyčerpávající.</p>
<p>přípravek tkáňového inženýrství (TEP) definovaný v odst. 1, písmenu b) článku 2 Nařízení (ES) č. 1394/2007</p>	<p>přípravek, který: - obsahuje upravené buňky nebo tkáň nebo se z nich skládá a - je prezentován jako přípravek mající vlastnosti, jež slouží k obnově, opravě nebo nahrazení lidských tkání, nebo je za tímto účelem u lidí používán nebo je jim podáván. Přípravek tkáňového inženýrství může obsahovat buňky nebo tkáň lidského nebo zvířecího původu nebo obojí. Buňky nebo tkáň mohou být životaschopné nebo neživotaschopné. Mohou rovněž obsahovat další látky jako buněčné výrobky, biomolekuly, biomateriály, chemické látky, nosné struktury nebo matrice. Z této definice jsou vyňaty přípravky obsahující nebo sestávající výlučně z lidských nebo</p>

	<p>zvířecích buněk nebo tkání, které nejsou životaschopné, neobsahují žádné životaschopné tkáně nebo buňky a jejich hlavním účinkem není farmakologický, imunologický nebo metabolický účinek.</p> <p>Odstavec 1, písmeno c) článku 2 Nařízení (ES) č. 1394/2007 dále uvádí, že: „Upravenými“ buňkami nebo tkáněmi se rozumí buňky nebo tkáně, které splňují alespoň jednu z těchto podmínek:</p> <ul style="list-style-type: none"> - buňky nebo tkáně byly předmětem podstatné manipulace, v jejímž důsledku bylo dosaženo biologických vlastností, fyziologických funkcí nebo strukturálních vlastností podstatných pro zamýšlenou regeneraci, opravu nebo výměnu. Za podstatné manipulace nejsou považovány zejména manipulace uvedené v příloze I, - buňky nebo tkáně nejsou určeny k použití ke stejné základní funkci nebo funkcím u příjemce shodným se základní funkcí nebo funkcemi u dárce.
<p>léčivý přípravek pro genovou terapii (GTMP) definovaný v části IV přílohy I směrnice 2001/83/ES, ve znění pozdějších předpisů</p>	<p>Léčivým přípravkem pro genovou terapii se rozumí biologický léčivý přípravek, který má <u>obě</u> následující vlastnosti:</p> <p>(a) obsahuje účinnou látku, která obsahuje rekombinantní nukleovou kyselinu používanou u lidí nebo podávanou lidem k regulaci, reparaci, výměně, doplnění nebo odstranění genetické sekvence, nebo z takové rekombinantní nukleové kyseliny sestává;</p> <p>(b) jeho terapeutický, profylaktický nebo diagnostický účinek se vztahuje přímo na sekvenci rekombinantní nukleové kyseliny, kterou obsahuje, nebo na produkt genetické exprese této sekvence.</p> <p>Léčivé přípravky pro genovou terapii nezahrnují vakcíny proti infekčním onemocněním.</p>
<p>kombinovaný léčivý přípravek pro moderní terapii podle odstavce 1, písmena d) článku 2 Nařízení (ES) č. 1394/2007</p>	<p>ATMP, který splňuje tyto podmínky:</p> <ul style="list-style-type: none"> - musí obsahovat jako nedílnou součást přípravku jeden nebo více zdravotnických prostředků ve smyslu čl. 1 odst. 2 písm. a) směrnice 93/42/EHS, nebo jeden nebo více aktivních implantabilních zdravotnických prostředků ve smyslu čl. 1 odst. 2 písm. c) směrnice 90/385/EHS a - jeho buněčná nebo tkáňová část musí obsahovat životaschopné buňky nebo tkáně, nebo - jeho buněčná nebo tkáňová část obsahující neživotaschopné buňky nebo tkáně musí být schopna působit na lidské tělo takovým účinkem, který lze vzhledem k účinku uvedených zdravotnických prostředků považovat za hlavní. <p>Požadavky na zdravotnické prostředky a implantabilní zdravotnické prostředky jsou uvedeny v příslušných pokynech Evropské komise a v legislativě, jíž se řídí zdravotnické prostředky.</p>

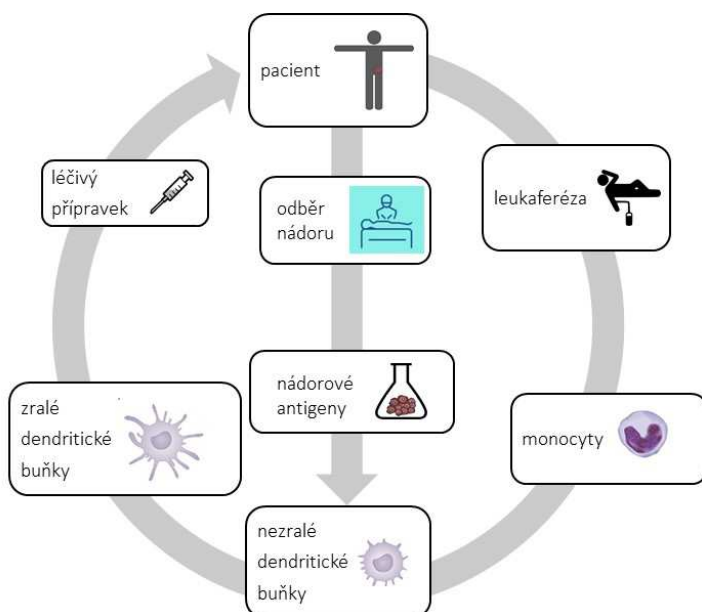
Tabulka 6: **Klasifikace léčivých přípravků pro moderní terapii.**

Dle Diskusní dokument o klasifikaci léčivých přípravků pro moderní terapii EMA/CAT/600280/2010 rev.1 (Reflection paper).

VÝSTUP 14: PROTINÁDOROVÁ TERAPIE NA BÁZI DENDRITICKÝCH BUNĚK PRODUKUJÍCÍCH IL-12

Vakcíny z dendritických buněk lze tedy vyrábět a aplikovat pouze jako somato-buněčné léčivé přípravky, z čehož vyplývá, že výroba DC vakcín se řídí správnou výrobní praxí dle GMP guide (The Rules Governing Medicinal Products in the European Union, Volume 4, Good manufacturing practice) a dozor nad výrobní činností provádí SÚKL. Vzhledem k tomu, že přípravek obsahující živé buňky nemůže projít koncovou sterilizací, jsou DC vakcíny vyráběny sterilně v čistých prostorech (ČP), což je definováno jako prostor, ve kterém je řízena koncentrace částic ve vznosu tak, aby byla splněna specifikovaná třída čistoty pro částice ve vznosu, a ve kterém jsou řízeny ostatní relevantní parametry, např. teplota, vlhkost, tlak. ČP pro sterilní výrobu mají 4 třídy čistoty: A, B, C, D, jež jsou klasifikovány podle počtu částic o velikosti 0,5 µm a 5 µm v 1m³ ve stavu za klidu a za provozu. Výstupní kontrola kvality DC vakcíny je zaměřena na imunobiologické vlastnosti léčivého přípravku (diferenciace do DC, maturace, schopnost produkovat aktivační cytokiny, schopnost stimulovat imunitní systém v MLR) a na ověření neinfekčnosti (sterilita, nepřítomnost *Mycoplasma* spp.).

K výrobě léčivého přípravku na bázi dendritických buněk, jak je definována protokolem (KDO_DC1311, 2015), se pro pulzaci antigeny využije nádor pacienta, který je odebrán při chirurgickém zákroku, a monocyty pacienta, které jsou získány leukaferézou. Následuje výrobní a kontrolní proces a do 30 dnů od zahájení výroby je možné LP propustit k aplikaci (Obrázek 37).

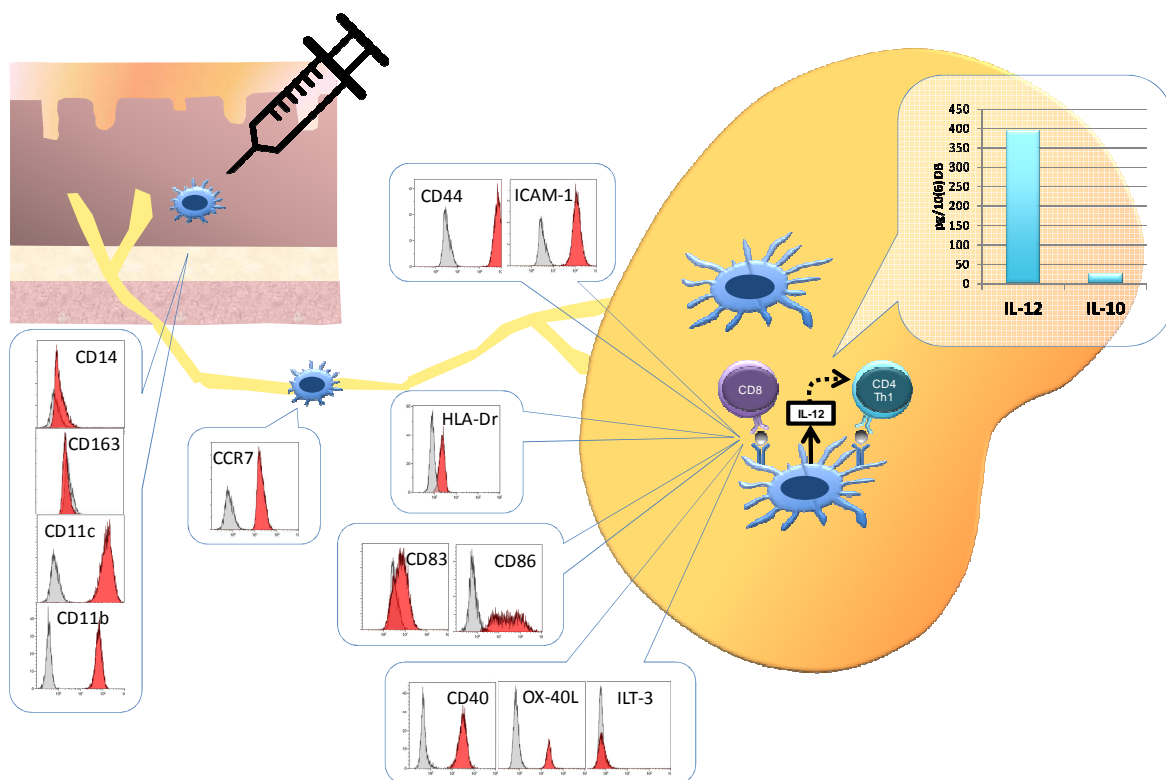


Obrázek 37: Schéma přípravy personalizované protinádorové vakcíny z autologních dendritických buněk.

Při diagnostické a/nebo terapeutické resekci tumoru je část tkáně odebrána. Bezprostředně po odběru nádorové tkáně je z ní připraven nádorový lysát, který je zamražen a následně použit pro výrobu vakcíny. Pacientovi jsou odebrány leukaferézou mononukleáry, které jsou rozděleny elutriací do několika frakcí a frakce bohatá na monocyty je nasazena k diferenciaci pomocí IL-4 a GM-CSF do dendritických buněk. Po několikadenní kultivaci jsou k nezralým dendritickým buňkám přidány připravené nádorové antigeny a maturační cytokiny LPS a IFN γ . Po další krátké kultivaci jsou dendritické buňky sklizeny a v zamrazovacím médiu rozalikvotovány na dávky, které jsou připraveny k aplikaci a ke kontrolním procesům. Pokud úspěšně proběhne kontrola kvality vyrobené šarže

léčivého přípravku, může být propuštěn k aplikaci pacientovi. Aplikace DC vakcíny probíhá intradermálně a místo vpichu je před aplikací ošetřeno imiquimodem, který stimuluje TLR-7 a -8 (Schon and Schon, 2007a; Schon and Schon, 2007b). DC vakcína se aplikuje opakovaně s odstupem několika týdnů. Veškeré činnosti týkající se výroby DC vakcíny od odběru nádorové tkáně po transport léčivého přípravku k aplikaci probíhají v režimu SVP.

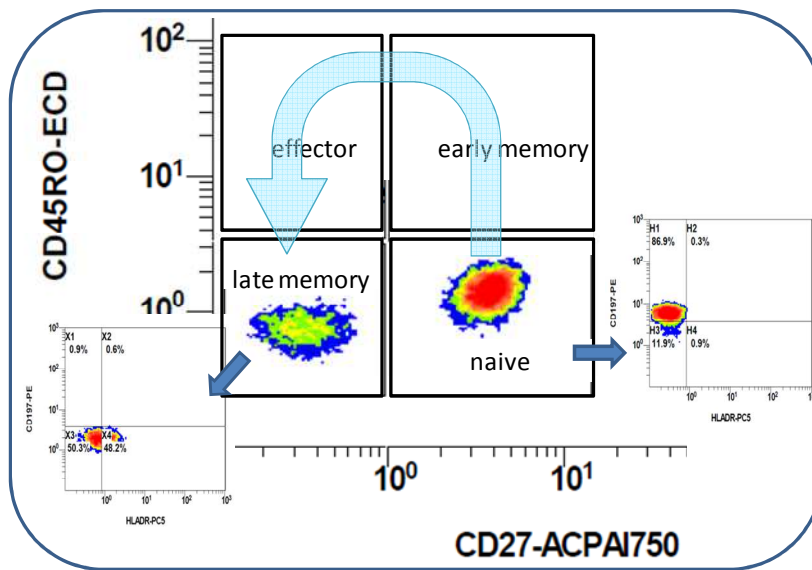
Analýza klinických hodnocení DC vakcín u pacientů s pokročilým melanomem, karcinomem prostaty a renálním karcinomem prokázala objektivní klinickou odpověď mezi 7,7 a 12,7 % a objektivní klinický benefit 30-54 % (Draube et al., 2011; Engell-Noerregaard et al., 2009). Časná klinická hodnocení prokázala, že využití protinádorové imunoterapie založené na dendritických buňkách má vyšší klinický efekt oproti přímé vakcinaci antigeny bez APC (Rosenberg et al., 2004). Podíl přirozené imunity v podobě dendritických buněk je při rozvoji efektivní protinádorové obrany rozhodující. Bez stimulačního kontextu v podobě interakce s kostimulačními molekulami a působení aktivačních cytokinů, který T-lymfocytům poskytuje přirozená imunita, se v lymfatických uzlinách nerozvíjí účinná protinádorová obrana. Bez uvedeného kontextu je u T-lymfocytů navozena anergie nebo apoptóza a maligní klon, který antigenně stimuloval imunitní systém, může být tolerován. Z tohoto důvodu se v dnešní době provádí protinádorová vakcinace dendritickými buňkami po aplikaci maturačních stimulů v podobě TLR a cytokinů. Stimulační dendritická buňka je vybavena kostimulačními molekulami, adhezivními molekulami pro interakci s T-lymfocyty a produkuje vysokou koncentraci IL-12 a malé množství inhibičního cytokinu IL-10 (Obrázek 38).



Obrázek 38: Základní imunobiologie protinádorové vakcíny z autologních dendritických buněk.

Expresí povrchových znaků a cytokinů představuje charakteristiku dendritických buněk = LP vyrobeného ve studii KDO_DC1311. Vakcína z dendritických buněk je aplikována intradermálně a viabilní dendritické buňky migrují do spádové lymfatické uzliny, kde probíhá antigenní stimulace T-lymfocytů. Základní imunofenotyp dendritických buněk je CD14- CD163- CD103+/- CD11c+ CD11b+. **CD11c** a **CD11b** (receptor pro C3b složku komplementu) jsou integrinové molekuly typické pro myeloidní buňky. Ztráta molekuly **CD14** (monocyty jsou pozitivní) poukazuje na úspěšnou in vitro diferenciaci. **CD163** je scavenger receptor pro komplex hemoglobin-haptoglobin a jeho exprese je typická pro monocyty a makrofágy (Fabriek et al., 2005); negativita **CD163** svědčí o tom, že z monocytů nebyly in vitro diferencovány makrofágy. **CD197** je chemokinový receptor **CCR7** a jeho exprese je zásadní pro migraci dendritické buňky v chemokinovém gradientu do parafolikulárních oblastí lymfatické uzliny, kde je značná koncentrace T-lymfocytů (Ohl et al., 2004). **CD44**, povrchový glykoprotein odpovědný za mezibuněčné interakce, je nazýván také HCAM (homing cell adhesion molecule). Tato molekula na povrchu dendritických buněk je důležitá pro interakci s T-lymfocyty při jejich antigen-dependentní stimulaci (Hegde et al., 2008), ale také pro shlukování dendritických buněk (Termeer et al., 2001). **CD54** neboli **ICAM1** (InterCellular Adhesion Molecule-1) je ligandem leukocytárního integrinového komplexu **CD11a/CD18** (**LFA-1**). Interakce mezi **CD54** a **LFA-1** usnadňuje mezibuněčný kontakt (Dustin et al., 1986) a to i při imunitním spoji (Carrasco et al., 2004). Expresí **CD54** na dendritických buňkách je ukazatelem jejich aktivace a schopnosti efektivně prezentovat antigeny T-lymfocytům (Sheikh and Jones, 2008). **HLA-Dr** je antigen prezentační komplex MHC II; je pozitivně exprimován na APC. **CD86** je kostimulační molekula důležitá pro poskytnutí 2. signálu T-lymfocytům (viz Obrázek 19, str. 43). **CD83** je maturační znak dendritických buněk (Zhou and Tedder, 1995). Expresí **CD40** na dendritických buňkách zvyšuje jejich antigen-prezentační schopnost (viz Obrázek 19, str. 43). **OX-40L** na povrchu dendritických buněk interaguje s **OX-40** na povrchu T-lymfocytů, což zvyšuje přežití efektorových buněk a tím pravděpodobně zajišťuje produkci paměťových T-lymfocytů (Sugamura et al., 2004). Negativita **ILT-3** poukazuje na to, že dendritické buňky z protinádorové vakcíny nemají tolerogenní potenciál (Manavalan et al., 2003), stejně jako produkce **IL-12**, která je výrazně vyšší než produkce **IL-10**.

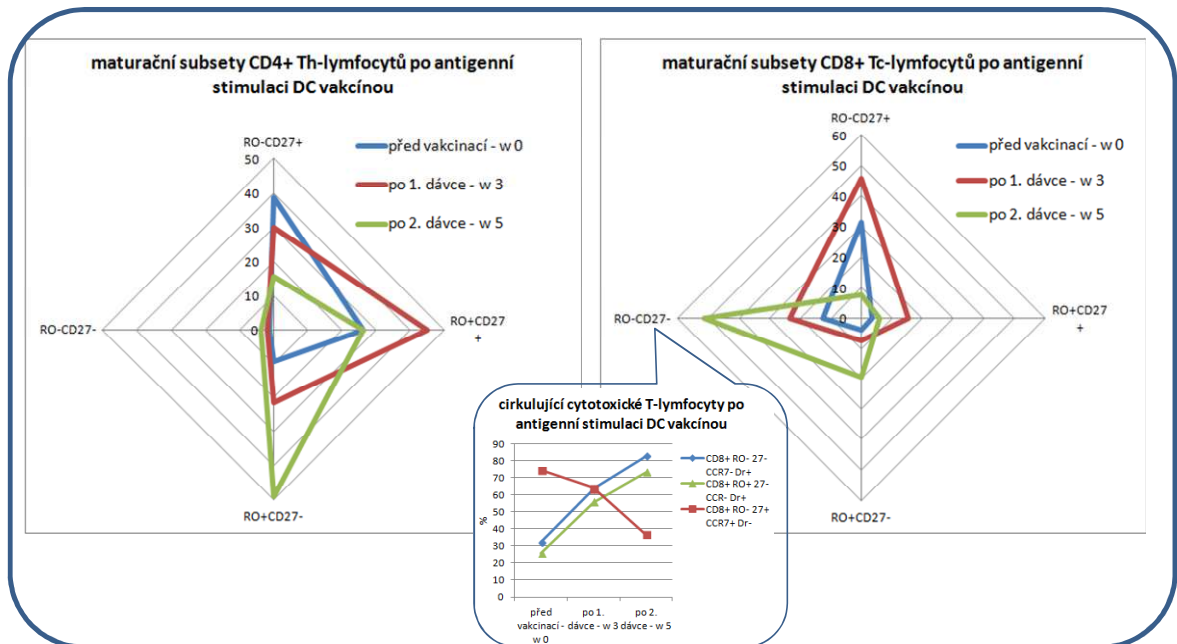
Součástí sledování pacientů v klinickém hodnocení KDO_DC1311 je i podrobný imunomonitoring cirkulujících elementů periferní krve. Imunomonitoring, který jsem sestavila, zahrnuje kvantitativní (proporčně i absolutní hodnoty) stanovení MDSC; T-reg; subpopulací monocytů; maturační a aktivační subsety T-lymfocytů (Obrázek 39) a subsety T-lymfocytů dle exprese ICOS, PD-1, Tim-3; NK-buňky a NKT-like buňky včetně aktivačních znaků; $\gamma\delta$ T-lymfocyty včetně subsetů a exprese NKG2D. Parametry imunomonitoringu máme k dispozici před vakcinací (baseline hodnoty) a dále sledujeme dynamiku v čase s postupujícími dávkami protinádorové vakcíny (Obrázek 40).



Obrázek 39: **Maturační subtypy T-lymfocytů.**

Jednotlivá stádia T-lymfocytů dle historie expozice antigenům lze rozoznat dle přítomnosti určitých molekul na povrchu buněk. Směr postupujícího získávání efektorových a paměťových funkcí je demonstrován šipkou. Naivní lymfocyty jsou CD45RO- CD27+, časné paměťové lymfocyty CD45RO+ CD27+ se schopností produkovat IL-2 a IFN γ , bez výraznějších efektorových funkcí, efektorové lymfocyty CD45RO+ CD27- se schopností produkovat IL-2, IFN γ , s vysokou hladinou granzymů

a perforinů a pozdní antigenem stimulované buňky CD45RO- CD27-. Tento obrázek je ukázkou subtypů u CD8+ cytotoxických T-lymfocytů, nicméně analogicky lze klasifikovat i CD4+ Th-lymfocyty. Subtypy lymfocytů lze dále subkategorizovat dle exprese CD197 = CCR7 ukazující na schopnosti migrace do lymfatických uzlin a exprese HLA-Dr = MHC II sloužící jako aktivační znak. Naivní lymfocyty bez dosavadní stimulace jsou CD27+ RO- CCR7+. Efektorové T-lymfocyty exprimují HLA-Dr.



Obrázek 40: **Ukázka dynamiky maturačních subtypů T-lymfocytů v kontextu podání protinádorové vakcíny na bázi dendritických buněk.**

Dynamika subtypů T-lymfocytů představuje reálné výsledky pacienta, jemuž byla aplikována protinádorová vakcína z dendritických buněk v rámci klinického hodnocení KDO_DC1311.

VLEVO - maturační subtypy u CD4+ Th-lymfocytů. VPRAVO - maturační subtypy u CD4+ Th-lymfocytů. Posun v maturačních subtypech je po směru hodinových ručiček. DOLE – s aplikací DC vakcíny narůstá proporce cytotoxických T-lymfocytů s aktivovaným imunofenotypem CD27- HLA-Dr+ a klesá proporce naivních T-lymfocytů CD45RO- CD27+ CCR7+.

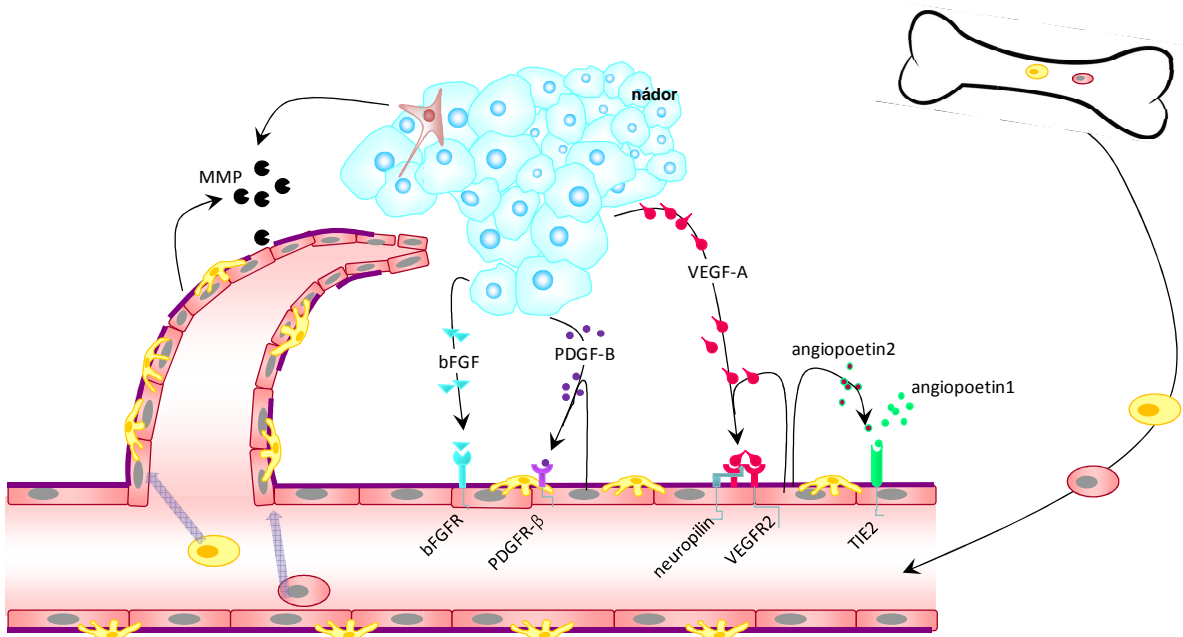
NÁDOROVÁ ANGIOGENEZE – ZÁKLADNÍ PRINCIPY

Angiogeneze, neboli novotvorba cév, je nezbytnou podmínkou pro růst nádoru přesahující velikost 1–2 mm³, jelikož při této velikosti již nestačí **prostá difúze** k zásobení nádoru živinami a kyslíkem a také k odstranění odpadů z metabolismu (Folkman, 1971). Následně je nádorová neovaskulatura významná pro další aspekty progresu rakoviny jako deregulace metabolismu nádoru a tvorba metastáz.

Za fyziologických podmínek jsou u dospělého jedince **klidové endoteliální buňky** cév udržovány autokrinní signalizací (VEGF, Notch, angiopoetin-1, FGFs). Endoteliální buňky jsou vybaveny senzory hladiny kyslíku a faktory indukovanými hypoxií jako jsou proteiny s PHD2 doménou a HIF-2 α , jejichž aktivace umožňuje upravit tvar cévy, aby byl zajištěn optimální průtok krve. Endoteliální buňky vzájemně propojené molekulami jako jsou VE-kadherin či klaudiny tvoří jednovrstevnou hydrodynamickou výstelku cévy, která je v bezprostředním kontaktu s krví. Vrstva endoteliálních buněk je pokryta pericyty, které přispívají k integritě endoteliální vrstvy, např. inhibují proliferaci endotelií a produkují signály potřebné k přežití endotelií (VEGF, Ang-1). Endoteliální buňky a pericyty produkující proteiny tvořící bazální membránu.

Nádorová angiogeneze je iniciována chemickými látkami produkovanými nádorem. Zásadní počáteční stimul pro iniciaci nádorové angiogeneze je **hypoxie** v rostoucím nádoru. Hypoxie vede k up-regulaci hypoxií indukovaných transkripčních faktorů HIF-1 α a HIF-2 α , které jsou hlavní regulátory homeostázy kyslíku a klíčové regulátory proangiogenních signálů (rodina VEGF). Při stimulaci angiogeneze dochází k aktivaci původně klidových endoteliálních buněk a jejich rychlému růstu. Mechanismus angiogeneze je složitý vícestupňový proces, který je regulován větším počtem humorálních působků, zejména cytokinů, adhezivních molekul, proteolytických enzymů a nízkomolekulárních látek, které jsou exprimovány několika buněčnými typy – buňkami samotného nádoru, endoteliálními buňkami, pericyty a fibroblasty, ale také buňkami imunitního systému a trombocyty (Obrázek 41, dále pak Obrázek 51).

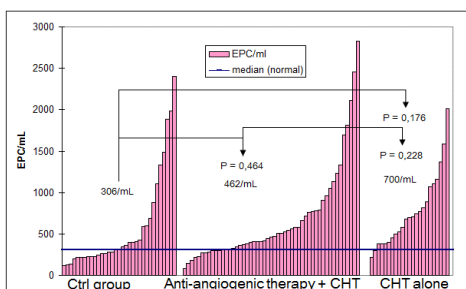
Na úrovni tvorby nových cév byly pozorovány různé způsoby a aspekty vaskulogeneze. Při nádorové angiogenezi se velmi často uplatňuje i/ tzv. **pučení** (angl. *sprouting*), kdy z jedné z endoteliálních buněk vzniká tzv. vrcholová buňka (angl. *tip cell*) která změní polaritu, částečně migruje a vytváří počátek výběžku nově vzniklé cévy; ii/ **migrace endoteliálních progenitorů** (EPC) z kostní dřeně a jejich integrace do nově vznikajících cév; iii/ **intususcepce**, kdy po vchlípení původní cévy vznikají nové cévy; iv/ nádorové mikroprostředí může **kooptovat** stávající cévy; v/ tzv. vaskulární mimikry (angl. *vascular mimicry*), kdy stěny kapilár v nádoru mohou být spolutvořeny přímo nádorovými buňkami; a byla popsána i vi/ **diferenciace** cytogeneticky nestabilních nádorových kmenových buněk do buněk endoteliálních a jejich následná inkorporace do vznikající nádorové vaskulatury (Carmeliet and Jain, 2011).



Obrázek 41: Základní kroky v nádorové angiogenezi.

Angiopoetin-1 (Ang1) je exprimován řadou buněk a jeho vazba na receptor endoteliálních buněk Tie2 umožňuje udržení integrity cév. Hypoxické maligní buňky produkují VEGF-A, jehož určité izoformy se váží na VEGFR-2 (Ferrara, 2009) a ko-receptor neuropiliny NRP-1 či NRP-2 (mohou transdukovat signál po vazbě VEGF i nezávisle na VEGFR-2 (Neufeld and Kessler, 2008) na povrchu endoteliálních buněk. Isoformy VEGF produkují také buňky nádorového stromatu a samotné endoteliální buňky. Vazba VEGF na jeho receptory na endoteliálních buňkách vede k jejich proliferaci, migraci, přežívání a přispívá k permeabilizaci cév. Nádorové buňky, buňky nádorové stromatu a také VEGFem stimulované endoteliální buňky produkují matrixové metaloproteinázy (MMP), které štěpí bazální membránu a extracelulární matrix. Degradace bazální membrány zvyšuje mobilitu endoteliálních buněk a signální molekuly uvolněné z extracelulární matrix dále přispívají k regulaci angiogeneze. Za hypoxických podmínek a/nebo stimulaci pomocí VEGF exprimují endoteliální buňky angiopoetin-2 (Fiedler et al., 2004). Angiopoetin-2 kompetuje s Ang1 o vazbu na Tie2, což vede k abnormálnímu pokrytí cévy pericyty, destabilizaci cév a zvýšení vaskulární permeability a to následně umožňuje větvení (angl. sprouting) stávajících kapilár. VEGFem stimulované endoteliální buňky a některé nádorové buňky produkují PDGF-B a bFGF stimuluje pericyty k expresi receptoru pro PDGF-B, tedy PDGFR-β (Kano et al., 2005). PDGF-B je významným atraktorem pericytů jak z lokálního prostředí tak progenitorů perivaskulárních buněk (PP) z kostní dřeně (Song et al., 2005). Bez PDGFR signalizace je vaskulatura nezralá, bez dostatku pericytů a náchylná k regresi (Bergers et al., 2003).

Nádorová hypoxie a stimulace angiogeneze během progresu maligního tumoru vede k produkci působků (VEGF, SDF-1), stimulujících mobilizaci endoteliálních progenitorů (EPC, Obrázek 41) z kostní dřeně a jejich inkorporaci do nově vznikající aplastické nádorové vaskulatury. EPC je možné detekovat v periferní krvi (Obrázek 42) a jejich hladina koreluje s progresí onemocnění (Ammendola et al., 2015; de la Puente et al., 2013) a může být prediktorem progresu u renálního karcinomu (Yu et al., 2014).



Obrázek 42: Hladina EPC u pacientů s kolorektálním karcinomem a kontrolní skupiny.

Endoteliální progenitory byly detekovány jako CD146+ CD34+ CD45dim/+ buňky s kvantifikací v návaznosti na fluorescenční kuličky. Přestože nebyl pozorován statisticky významný rozdíl mezi třemi definovanými skupinami, trend k nejvyšší hladině EPC byl u pacientů s maligním onemocněním léčených chemoterapií bez kombinace s cílenou anti-angiogenní látkou.

Poté co Judah Folkman postuloval a experimentálně potvrdil klíčovou roli **angiogenního přepnutí** (angl. *angiogenic switch*) pro progresi tumoru, začal se vývoj protinádorové terapie ubírat směrem k potlačení vzniku nových cév v nádorovém mikroprostředí s cílem snížit denzitu kapilár a tím eliminovat nádor (Teng et al., 2010).

V současné době je registrováno několik specifických léčivých přípravků cílících na nádorovou angiogenezi – bevacizumab, aflibercept, ramucirumab. Další přímé regulátory/inhibitory angiogeneze jsou předmětem vývoje, preklinického a klinického hodnocení. Dále jsou pro protinádorovou léčbu k dispozici cílené přípravky, jejichž efekt je více či méně spojen s regulací angiogeneze.

Bevacizumab je rekombinantní humanizovaná monoklonální protilátka (k rekombinantním protilátkám více na str. 62) proti endotheliálnímu růstovému faktoru (VEGF). Vazba bevacizumabu na VEGF interferuje s vazbou VEGF na VEGF-R a bevacizumab tak inhibuje pro-angiogenní funkci VEGF. V současnosti je v Evropě bevacizumab indikován pro léčbu i/ metastatického kolorektálního karcinomu v kombinaci s chemoterapií (viz Výstup 15) ii/ pokročilých, metastatických nebo rekurentních nádorů plic, pleury a mediastina v kombinaci s chemoterapií, iii/ pokročilých nebo rekurentních karcinomů ovarií nebo tuby v kombinaci s chemoterapií, iv/ metastatického karcinomu ledvin v kombinaci s IFN- α , v/ metastatického karcinomu prsu v kombinaci s chemoterapií (EMA, 2015a), vi/ přetrvávajícího, rekurentního nebo metastazujícího karcinomu děložního čípku v kombinaci s paklitaxelem a cisplatinou nebo alternativně u pacientek, kterým nemůže být podaná léčba platinou, s paklitaxelem a topotekanem. V současné době probíhají klinická hodnocení bevacizumabu pro další indikace.

Aflibercept (VEGF trap) je rekombinantní fúzní protein skládající se z extracelulární domény lidského VEGFR-1 a VEGFR-2 a z Fc fragmentu lidského IgG1. Aflibercept váže VEGF v cirkulaci a tím blokuje jeho dostupnost pro VEGF-receptory. Aflibercept je nově registrován pro léčbu mCRC.

Ramucirumab je monoklonální protilátka proti VEGFR-2. Ramucirumab je indikován pro léčbu 2. linie pokročilého karcinomu žaludku nebo gastroezofageální junkce v kombinaci s paklitaxelem.

Nízkomolekulární tyrozinkinázové inhibitory interferují s fosforylací a transdukcí signálu z tyrozinkináz. Jejich léčebný efekt vychází z poznatku, že určité tyrozinkinázy jsou v nádorových buňkách konstitutivně aktivovány nebo jejich aktivace přispívá k progresi malignity. Nízkomolekulární tyrozinkinázové inhibitory blokují transdukcí signálu z tyrozinkinázových receptorů včetně PDGF-receptorů, VEGF-receptorů, a tím potlačují také nádorovou angiogenezi. Nízkomolekulární tyrozinkinázové inhibitory se používají klíčbě maligních onemocnění v monoterapii, v kombinaci s chemoterapií jsou toxické. V současnosti je v Evropě **sunitinib** indikován pro léčbu i/ inoperabilních nebo metastatických gastrointestinálních stromálních nádorů po progresi na imatinibu, ii/ metastatického karcinomu ledvin, iii/ metastatického neuroendokrinního nádoru pankreatu (EMA, 2015c). **Sorafenib** působí jako inhibitor několika tyrozinkináz (včetně receptorových VEGFR, PDGFR) a Raf kináz. V současnosti je sorafenib registrován pro léčbu hepatocelulárního karcinomu, pokročilého renálního karcinomu a v určitém stádiu diferencovaného karcinomu štítné žlázy. **Pazopanib** je multikinázový inhibitor je

registrován pro léčbu pokročilého renálního karcinomu a u některých typů sarkomů měkkých tkání.

Anti-angiogenní komponentu mají také **mTOR inhibitory** (temsirolimus, everolimus). Inhibice mTOR interferuje se syntézou proteinů, které regulují proliferaci, růst a přežívání nádorových buněk. Vzhledem k tomu, že jednou z *downstream* molekul mTOR je klíčový regulátor faktor angiogeneze HIF-1 α , tlumí inhibice mTOR také syntézu VEGF a potažmo reguluje nádorovou angiogenezi (Wan et al., 2006). Tento efekt se významně uplatňuje u renálního karcinomu, s jehož etiopatogenezi je běžně spojena mutace nádorového supresoru VHL, který je klíčovým faktorem degradace HIF-1 α (Thomas et al., 2006).

VÝSTUP 15: BEVACIZUMAB A CHEMOTERAPIE V 1. LINII LÉČBY METASTATICKÉHO KOLOREKTÁLNÍHO KARCINOMU V KONTEXTU MUTACE GENU KRAS

Mutace genu KRAS (v současnosti s rozšířením na celou skupinu genu RAS (Výstup 1, str. 15) je v současnosti jediným prediktivním faktorem v algoritmu léčby metastatického kolorektálního karcinomu anti-EGFR monoklonálními protilátkami. Nicméně vzhledem k interakci aktivovaného genu KRAS s buněčnou signalizací regulující angiogenezi (Tabulka 7) je racionální položit si otázku, zda mutace genu KRAS intereferuje s léčbou bevacizumabem.

<i>Ras signalizace vede k produkci VEGF (Matsuo et al., 2009; Okada et al., 1998; Rak et al., 1995; Rak et al., 2002; Takahashi et al., 1995).</i>
<i>Ras signalizace vede k produkci proangiogenního IL-8 (Sparmann and Bar-Sagi, 2004)</i>
<i>Ras signalizace vede ke snížené produkci anti-angiogenního trombospondinu-1 (Watnick et al., 2003).</i>
<i>Inhibice konstitutivně aktivovaného KRAS vedla k snížené expresi proangiogenních IL-6, IL-8, VEGF-A (Wang et al., 2015b).</i>

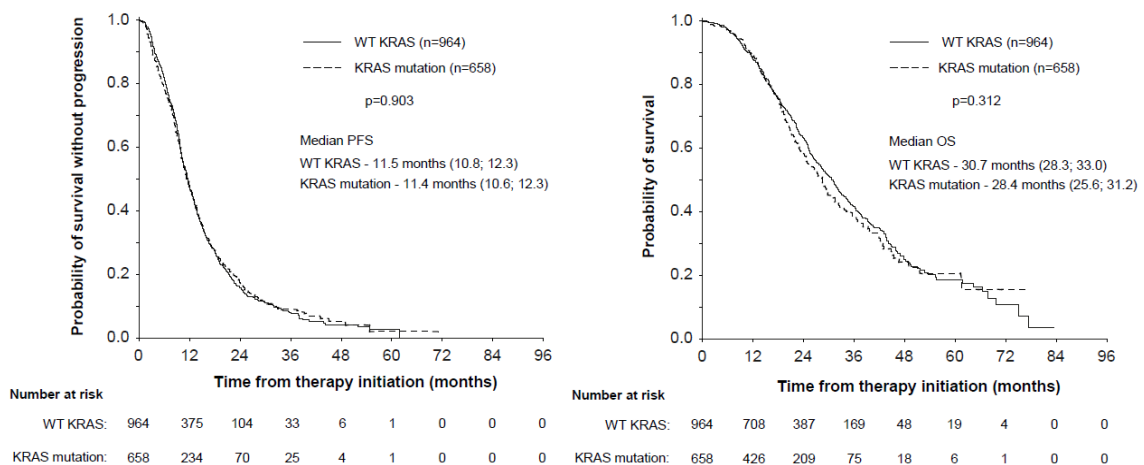
Tabulka 7: **Vliv signalizace Ras a aktivační mutace genu Ras na angiogenezi.**

Provedli jsme analýzu dat v registru CORECT, který obsahuje informace o pacientech s kolorektálním karcinomem léčených cílenou léčbou²¹. Analyzovali jsme 1622 pacientů, kteří byli léčeni mezi lednem 2005 a dubnem 2013 pro metastatický kolorektální karcinom v první linii bevacizumbem s chemoterapií FOLFOX, XELOX, FOLFIRI nebo XELIRI a měli známý statut mutace v genu KRAS. Mutace v genu KRAS (detekována dle soudobých postupů tedy v kodonech 12 a 13 (Výstup 1) zjištěna u 40,6 % jedinců. Incidence somatické mutace v genu KRAS neměla souvislost s pohlavím pacientů, lokalizací primárního tumoru, výkonostním stavem, reseabilitou metastáz, ani metastatickým postižením 2 a více orgánů. Významný rozdíl s ohledem na mutaci v KRAS byl ve věku v čase zahájení léčby; kupodivu byl medián u podskupiny s mutovaným genem KRAS 63 let a u podskupiny s WT KRAS 61 let (p<0,001). Z hlediska metastatického postižení nebyl rozdíl v incidenci jatrních (přítomny u 67,7 % pacientů s WT KRAS a 64,0 % s mutací KRAS) ani peritoneálních metastáz. Pacienti s mutací v KRAS měli spíše méně metastáz v lymfatických uzlinách (u 26,1% pacientů s mutací KRAS a u 30,7 % pacientů s WT KRAS, p=0,073). Naopak

²¹ Bencsikova B, Bortlíček Z, Halamkova J, Ostrizkova L, Kiss I, Melichar B, Pavlík T, Dusek L, Valík D, Vyzula R, Zdrzilova-Dubská L. (2015): **Efficacy of bevacizumab and chemotherapy in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer: broadening KRAS-focused clinical view.** BMC Gastroenterol. 24;15(1):37. IF 2,115, citace PubMed 2

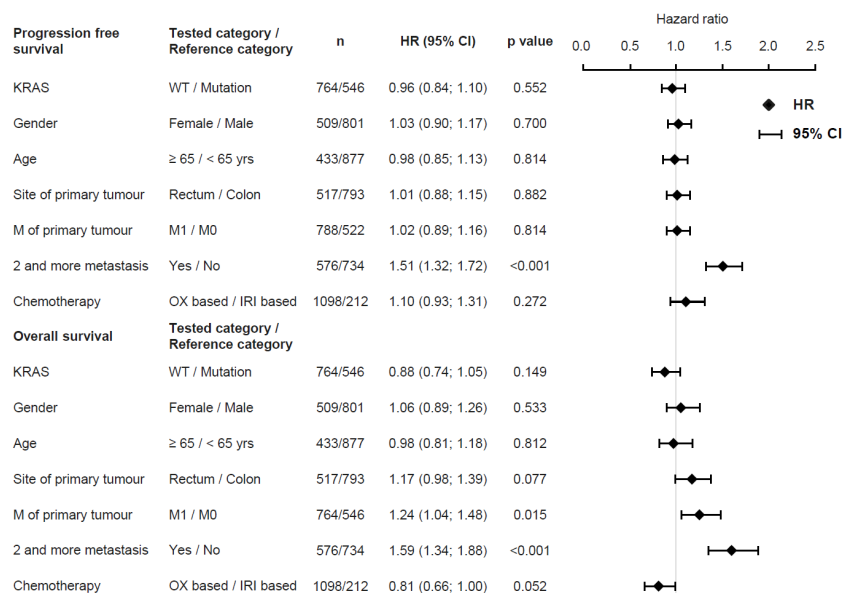
pacienti s mutací KRAS měli častěji plicní metastázy (32,0 %) než podskupina bez mutace (23,8 %), $p = 0,001$ (Příloha 21 – Table 1). Důvod pro zvýšený počet plicních metastáz v souvislosti s mutací KRAS není doposud znám. Vezmeme-li v úvahu také trend k nižší frekvenci postižení lymfatických uzlin, můžeme se domnívat, že maligní buňky s mutací KRAS se šíří spíše hematogenní cestou. V tomto případě může mutace KRAS poskytovat buňce výhodu v podobě aktivace drah spojených s produkcí tkáňového faktoru (Rao et al., 2011), cyklooxygenázy-2, MMP-9 (Wang et al., 2009) či katepsinu B (Chan et al., 2010), což následně přispívá k efektivnější interakci maligní buňky s trombocyty, čímž se zvyšuje ochrana maligních buněk v cirkulaci a tedy i metastatický potenciál.

Analýza přežití bez progresu a celkového přežití ukázala, že medián PFS u a skupiny pacientů s wild-type KRAS bylo 11,5 měsíců a u skupiny pacientů s mutací v KRAS bylo 11,4 měsíců a medián OS byl u wild-type KRAS 30,7 měsíců a u pacientů s mutací v KRAS 28,4 měsíců (Obrázek 43). Jednoleté celkové přežití bylo u wt-KRAS 88,1% (95% CI 85,9% - 90,3%) oproti 89,2 % (95% CI 86,6 % - 91,8 %) u mutKRAS. Dvouleté celkové přežití bylo u wt-KRAS 63,0 % (95% CI 59,5 % - 66,5 %) oproti 58,5 % (95% CI 53,8 % - 63,2 %) u mutKRAS. Třileté celkové přežití bylo u wt-KRAS 41,8 % (95% CI 37,8 % - 45,8 %) oproti 38,1 % (95% CI 32,8 % - 43,5 %) u mutKRAS. Je tedy zřejmé, že aktivační mutace KRAS (detekována v kodonu 12 nebo 13) neovlivňuje léčebných efekt bevacizumabu a chemoterapie v první linii léčby metastatického kolorektálního karcinomu.



Obrázek 43: **Klinický efekt léčby mCRC v první linii bevacizumabem a chemoterpií dle statutu genu KRAS.** Analýza přežití bez progresu (PFS) (vlevo) a celkového přežití (OS) (vpravo).

Multivariační analýza tohoto souboru pacientů ukázala, že na přežití bez progresu onemocnění nemá kromě mutačního stavu KRAS vliv ani pohlaví, věk, místo primárního nádoru, synchronní metastázy, typ chemoterapie podávané v první linii s bevacizumabem. Významně horší PFS bylo povrženo v případě metastatické postižení 2 a více orgánů. Na celkové přežití měly negativní vliv synchronní metastázy a metastatické postižení dvou a více orgánů. Pacienti, kteří měli v první linii s bevacizumabem chemoterapii s oxaliplatinou, měli tendenci k lepšímu přežití oproti těm, kteří začali léčbu pro metastatické onemocnění s chemoterapií s irinotekanem (Obrázek 44).



Obrázek 44: Výsledky multivariační Cox analýzy u pacientů s mCRC léčených v první linii bevacizumabem a chemoterapií.

Podrobnější pohled s ohledem na mutační status KRAS ukázal, že přežití bez progresu je negativně ovlivněno multiorgánovým metastatickým postižením nezávisle na KRAS. V případě kolorektálního karcinomu s mutací genu KRAS vedly synchronní metastázy k významně kratšímu přežití bez progresu. Naopak u pacientů s wild-type KRAS nebyly synchronní metastázy negativním faktorem z hlediska přežití bez progresu. Z hlediska celkového přežití bylo postižení dvou a více orgánů negativním prognostickým faktorem nezávisle na mutaci KRAS. V případě, že kolorektální karcinom nebyl mutovaný v genu KRAS, znamenaly synchronní metastázy kratší celkové přežití. Pacienti s mutací v genu KRAS (ale ne WT KRAS), kteří byli v první linii léčení chemoterapií s irinotekanem měli tendenci ke kratšímu celkovému přežití (Tabulka 8). Medián celkového přežití byl následující: WT KRAS / oxaliplatinová cht 31,0 měsíců (95% CI 28,7-33,4), KRAS mutace / oxaliplatinová cht 29,1 měsíců (95% CI 26,2-32,1), WT KRAS / cht s irinoteknem 29,2 měsíců (95% CI 21,9-36,6), KRAS mutace / cht s irinoteknem 24,2 měsíců (95% CI 21,9-26,4).

Progression free survival	Tested category / Reference category	WT KRAS			KRAS mutation		
		N	HR (95% CI)	p-value	n	HR (95% CI)	p-value
Gender	Female / Male	371/593	0.97 (0.83; 1.12)	0.642	253/405	1.01 (0.84; 1.22)	0.910
Age	≥ 65 / < 65 yrs	271/691	1.08 (0.92; 1.27)	0.358	250/406	0.91 (0.75; 1.10)	0.328
Site of primary tumour	Rectum / Colon	371/593	1.09 (0.94; 1.26)	0.266	260/398	0.92 (0.76; 1.10)	0.353
M of primary tumour	M1 / M0	563/401	0.96 (0.83; 1.11)	0.545	417/241	1.32 (1.09; 1.59)	0.005
2 and more metastasis	Yes / No	338/427	1.37 (1.16; 1.62)	<0.001	238/309	1.77 (1.43; 2.18)	<0.001
Chemotherapy	OX based / IRI based	806/158	1.07 (0.89; 1.30)	0.464	550/108	1.12 (0.88; 1.43)	0.351
Overall survival	Tested category / Reference category	WT KRAS			KRAS mutation		
		N	HR	p-value	n	HR	p-value

			(95% CI)			(95% CI)	
Gender	Female / Male	371/593	1.00 (0.83; 1.21)	0.993	253/405	0.91 (0.71; 1.16)	0.443
Age	≥ 65 / < 65 yrs	271/691	1.10 (0.88; 1.36)	0.408	250/406	0.95 (0.75; 1.22)	0.715
Site of primary tumour	Rectum / Colon	371/593	1.12 (0.93; 1.35)	0.238	260/398	1.09 (0.85; 1.39)	0.506
M of primary tumour	M1 / M0	563/401	1.25 (1.03; 1.50)	0.020	417/241	1.20 (0.93; 1.54)	0.155
2 and more metastasis	Yes / No	338/427	1.43 (1.15; 1.77)	0.001	238/309	2.00 (1.52; 2.63)	<0.001
Chemotherapy	OX based / IRI based	806/158	0.90 (0.71; 1.13)	0.345	550/108	0.79 (0.58; 1.05)	0.108

Tabulka 8: Výsledky jednorozměrné Coxovy analýzy celkového přežití a přežití bez progresu pro podskupiny s wild-type KRAS a mutovaným KRAS.

Statisticky významný rozdíl je vyznačen červeně.

Zajímalo nás také, zda má lokalizace metastatického postižení prognostický význam v kontextu mutace KRAS. Obecně jsme nepozorovali významný rozdíl v přežití v závislosti na lokalizaci metastáz. Pouze u skupiny pacientů s mutací v KRAS jsme pozorovali tendenci k delšímu přežití u pacientů s plicními metastázami (Příloha 21, Figure 4).

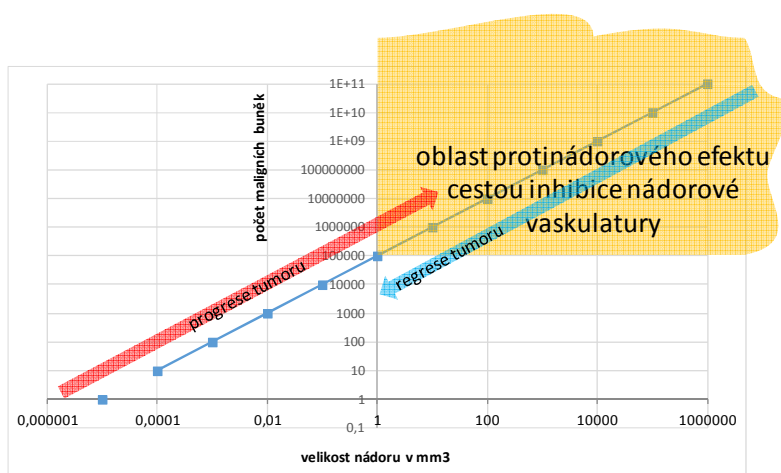
Doposud bylo publikováno několik studií hodnotící mutaci v genu KRAS v kontextu terapie s bevacizumabem u metastatického kolorektálního karcinomu. Většina výsledků byla získána sekundárně z klinických hodnocení porovnávajících efekt bevacizumabu a anti-EGFR terapie. V těchto hodnoceních stejně tak jako v naší studii je obtížné hodnotit celkové přežití, jelikož pacienti jsou po první linii léčby s bevacizumabem dále léčeni v různých režimech (Tabulka 9).

Hodnocení	Terapeutický režim	n KRAS WT/MT (%)	PFS KRAS WT/MT (měsíce)	OS KRAS WT/MT (měsíce)
AVF2107g (Hurwitz et al., 2009)	B+IFL	85/44 (66/34)	13.5 vs 9.3; p=NS	27.7 vs 19.9; p=NA
PACCE (Hecht et al., 2009)	B+oxaliplatin-based	261/164 (61/39)	11.5 vs 11.0; p=NA	24.5 vs 19.3 p=NA
	B+irinotecan-based		12.5 vs 11.9 p=NA	19.8 vs 20.5 p=NA
AGITG MAX (Price et al., 2011)	B+Capecitabine+/-mitomycin	224/90 (71/29)	8.8 vs 8.2; p=NS	19.8 vs 17.6; p=NS
(Saltz et al., 2012)	B+mFOLFOX6	49/36 (58/42)	10.9 vs 12.1; p=NA	18.8 vs 22.4; p=NA
CAIRO-2 (Tol et al., 2009)	B+CAPOX	156/108 (59/41)	10.6 vs 12.5; p=0.80	22.4 vs 24.9; p=0.82
MACRO (Diaz-Rubio et al., 2012)	B+XELOX	219/175 (56/44)	10.9 vs 9.2; p=0.0038	26.7 vs 18.4; p=0.0002
FIRE-3 (Stintzing et al., 2013)	B+FOLFIRI	334/62	10.4 vs 12.2; p=NA	25.9 vs 20.6; p=NA
Naše analýza – CORECT	B+oxaliplatin-based	964/658	11.4 vs 11.4; p=0.970	31.0 vs 29.1; p=0.558
	B+irinotecan-based		12.1 vs 11.3; p=0.704	29.2 vs 24.2; p=0.212

Tabulka 9: Přehled dosavadních studií a klinických hodnocení srovnávajících parametry přežití v kontextu KRAS mutace u pacientů s kolorektálním karcinomem léčených bevacizumabem.

Klinický efekt bevacizumabu, jak byl stanoven v klinických studiích, je nejvýznamnější právě u metastatického kolorektálního karcinomu, kde se díky jeho přidání k chemoterapii PFS i OS prodlužuje řádově o jednotky měsíců (1 - 5) (Hurwitz et al., 2004). Obdobný efekt na PFS byl pozorován u metastatického karcinomu prsu a metastatického karcinomu ledvin, bez významného efektu na prodloužení celkového přežití (Escudier et al., 2010).

Mimo **limitovanou účinnost bevacizumabu** u léčby pacientů s metastatickým maligním onemocněním jsou další významné aspekty klinického efektu anti-VEGF terapie: i/ neúčinnost bevacizumabu v monoterapii (Giantonio et al., 2007), ii/ vznik rezistence k bevacizumabu (Bergers and Hanahan, 2008), iii/ neúčinnost bevacizumabu mimo makroskopicky metastatické onemocnění, např. v adjuvanci (Allegra et al., 2011). Tato pozorování svědčí o tom, že původní koncept inhibice angiogeneze vedoucí k zásadní regresi tumoru díky eliminaci přísunu kyslíku a živin není tak přímočarý, jak se předpokládalo. Pokud bychom navíc uvažovali, že existuje schopnost difúze kyslíku a živin do nádoru o určité velikosti a tato velikost pak představuje limitu protinádorového efektu inhibice nádorové angiogeneze a vaskularizace, tak by samotnou inhibicí angiogeneze (skutečně ve smyslu eliminace kapilár v nádoru) nebylo možné dosáhnout kompletní regrese nádoru (Obrázek 45). Na základě uvedených a dalších pozorování je dnes již všeobecně přijímán fakt, že klinicky pozorovaný protinádorový efekt antiangiogenní terapie není výsledkem prosté inhibice nádorové vaskulatury ale spíše **normalizací** abnormální nádorové vaskulatury, která umožňuje transport a distribuci protinádorové terapie (chemoterapie) k maligním buňkám (Hernandez-Agudo et al., 2015), infiltraci nádoru imunokompetentními buňkami a určitou roli při eliminaci maligních buněk hraje pravděpodobně i navození normoxie nádoru potažmo vznik dostatečného množství ROS (Garg et al., 2013). Přechodná normalizace nádorové vaskulatury je pak prostředkem umožňujícím protinádorový efekt konkomitantním léčebným postupům (chemo-, radio-, imunoterapie), které působí jak na maligní buňky tak na nádorovou angiogenezi a finálním efektem je pak za optimálních terapeutických podmínek regrese nádoru tedy maligních buněk a stroma včetně nádorové vaskulatury.



Obrázek 45: Objem nádorové masy a efekt inhibice nádorové vaskulatury.

Pokud vycházíme z předpokladu, že pro oxysličení tkáně/nádoru o velikosti 1-2 mm³ je dostatečná prostá difúze a nádorová vaskulatura nehraje do této velikosti zásadní roli (Folkman, 1971), byla by z mechanistického hlediska inhibice nádorové vaskulatury účinným protinádorovým prostředkem v oblasti velikosti tumoru nad 1 mm³ tj. cca 100 tis. buněk (Del Monte, 2009). Pokud tuto úvahu otočíme, tak za předpokladu, že inhibice angiogeneze vede k regresi nádorové vaskulatury a tím i regresi tumoru, tak by dosah anti-angiogenní terapie nesahal pod 100 tis. buněk, které by při eliminaci nádorové vaskulatury byly dostatečně zásobovány kyslíkem a živinami prostou difúzí.

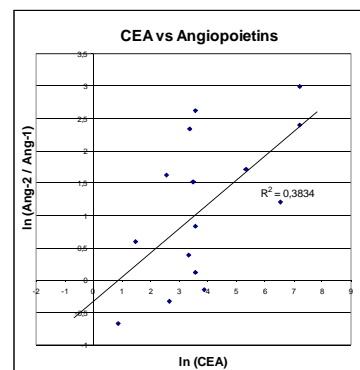
Hypoxie v nádoru působí na populaci maligních buněk; u některých buněk navozuje buněčnou smrt, na druhou stranu **hypoxické podmínky vyvíjejí selekční tlak**, dochází ke změně parametrů prostředí nádorů, zvyšuje se genetická nestabilita maligních buněk; objevují se například mutace genu *p53*, aktivuje se onkogen *KRAS*, a tím dochází k potlačení produkce thymospondinu, důležitého antiangiogenního faktoru. Hypoxie tedy přispívá k selekci klonů buněk s vyšším maligním potenciálem, schopností metastazovat a se zvýšenou rezistencí k terapii.

Hypoxií navozený angiogenní switch vede k produkci nádorové vaskulatury, která se strukturou a funkčními parametry zásadně **liší od normální uspořádané vaskulatury** v orgánech s fyziologickou funkcí. Morfologicky jsou cévy nádorového stroma křivolaké, neuspořádaně se větvící a spojující, s nerovnoměrným průsvitem, heterogenní denzitou v různých oblastech tumoru (Jain, 2005; Nagy et al., 2010). Nádorové kapiláry se vyznačují většími mezerami mezi endotelovými buňkami, narušenou bazální membránou, jsou nerovnoměrně pokryty pericyty a jsou propustné (Feng et al., 2000; Jain, 2005), což je dále potencováno hypoxií stimulovanou produkcí VEGF, která dále zvyšuje permeabilitu nádorových cév (Jain, 2013).

VÝSTUP 16: CIRKULUJÍCÍ BIOMARKERY NÁDOROVÉ ANGIOGENEZE

Hypoxie vede k upregulaci angiopoetinů Ang-1 a Ang-2. Stabilizačním působkem nádorové vaskulatury je angiopoetin-1 a naopak jeho funkčním antagonistou a kompetitorem o vazbu na receptor Tie2 je angiopoetin-2. Na základě funkčních vlastností nelze angiopoetiny jednoznačně přiřadit do kategorie „inhibitor“ či „aktivátor“ angiogeneze. Nicméně se dá předpokládat, že zvýšená hladina angiopoetinu-2 bude spojena s propagací abnormální nádorové vaskulatury. Při analýze plazmatických hladin angiopoetinů u pacientů s kolorektálním karcinomem jsme zachytily vyšší hladiny obou angiopoetinů v porovnání s kontrolní skupinou. Nicméně Ang2 byl u pacientů s malignitou elevován více než Ang1 a pokud jsme dále zkoumali poměr Ang2/Ang1 ve vztahu k rozsahu nádorového onemocnění (pro kvantifikaci zastoupeno hladinou CEA), zjistili jsme pozitivní korelaci mezi poměrem „destabilizačního“ a „stabilizačního“ angiopoetinu a hladinou CEA (Obrázek 46).

Angiopoetin 2 lze tedy považovat za faktor přispívající k vzniku abnormální propustné chaotické nádorové vaskulatury (Ogawa et al., 2004), jehož efekt je v konečném důsledku pronádorový. U pacientů s NSCLC bylo popsáno horší 5-leté přežití u pacientů s vyššími hladinami Ang-2 (Carter et al., 2000). Souvislost vysoké hladiny Ang2 s horším přežitím byla popsána i u pacientů s kolorektálním karcinomem léčených bevacizumabem (Goede et al., 2010) a u pacientů s rekurentním glioblastomem léčených cediranibem (Batchelor et al., 2010). Naopak angiopoetin-1, jež přispívá ke vzniku zralé normální vaskulatury, má ulohu spíše protinádorovou. U myšího modelu byla popsána regrese jatrných metastáz karcinomu tlustého střeva a peritoneální karcinomatózy po podání angiopoetinu-1 (Curley et al., 2002; Stoeltzing et

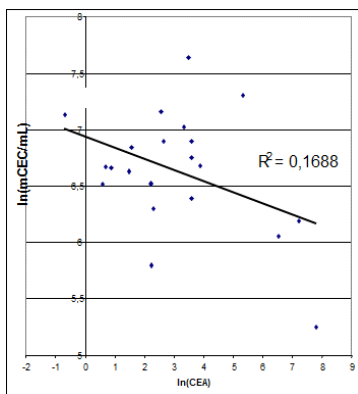


Obrázek 46: **Vztah mezi poměrem plazmatických hladin angiopoetinů a CEA.**

U pacientů s kolorektálním karcinomem je korelace mezi poměrem Ang2/Ang1 a nádorovým markerem CEA, který je určitou reflexí rozsahu nádoru (nádorové masy) a může být i prognostickým faktorem průběhu onemocnění.

al., 2003). Nabízí se tedy otázka, jaký je klinický výsledek inhibice angiopoetinu-2 u onkologických pacientů. Na myších modelech vedla inhibice obou faktorů VEGF a Ang2 k potlačení progresu nádoru (Coutelle et al., 2015; Hashizume et al., 2010; Kienast et al., 2013). V současné době jsou již dostupné výsledky klinického hodnocení fáze III u pacientek s rekurentním ovariálním karcinomem (TRINOVA-1) srovnávající paklitaxel+trebanabid, což je tzv. peptibody (konstrukt skládající se z Fc oblasti a peptidové vazebné oblasti) inhibující oba angiopoetiny, a placebo+paklitaxel; přičemž efektem trebanabidu je mírné statisticky signifikantní prodloužení PFS (Monk et al., 2014).

Konečný efekt anti-angiogenní terapie je regrese nádorové vaskulatury, při níž se mohou do cirkulace uvolňovat apoptotické endoteliální buňky, jež můžeme v periferní krvi detekovat jako zralé (angl. *mature*) cirkulující endoteliální buňky mCEC. Pozorovali jsme, že u pacientů léčených anti-angiogenní terapií jsou hladiny mCEC vyšší (medián 779 mCEC/ml) než u kontrolní skupiny (bez onkologického onemocnění; medián 541 mCEC/ml; $p = 0,047$ t-test), ale také trend k vyšším hodnotám oproti pacientům léčeným chemoterapií (medián 677 mCEC/ml, $p = 0,058$ t-test)²². U pacientů léčených anti-angiogenní terapií jsme pozorovali trend k inverzní korelaci mezi hladinou mCEC a CEA naznačující, že zralé/apoptotické endoteliální buňky mCEC uvolněné z nádorového mikroprostředí do periferní krve mohou být biomarkerem regrese nádorové vaskulatury.



Obrázek 47: Vztah mezi hladinou zralých cirkulujících endoteliálních buněk a sérovou hladinou CEA.

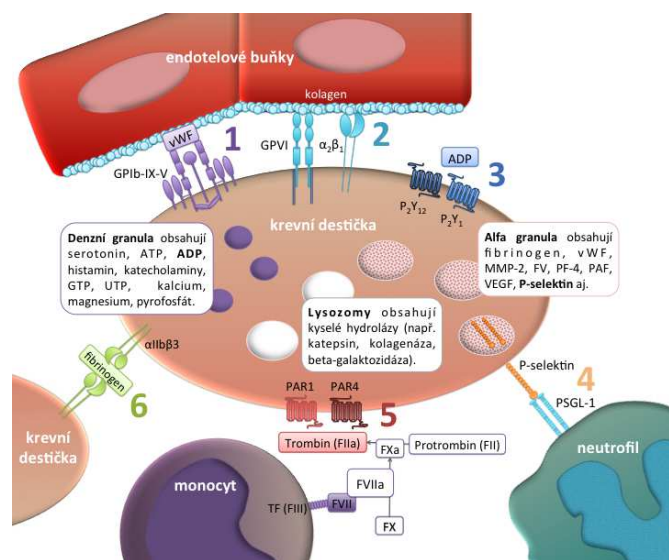
U pacientů s kolorektálním karcinomem je korelace mezi poměrem Ang2/Ang1 a nádorovým markerem CEA, který je určitou reflexí rozsahu nádoru (nádorové masy) a může být i prognostickým faktorem průběhu onemocnění.

Cirkulující markery angiogenezy a popis imunofenotypu pro detekci cirkulujících endoteliálních buněk a cirkulujících endoteliálních progenitorů je součástí aktuálního Doporučení k využití nádorových markerů pro klinickou praxi (Příloha 11, str. 35).

²² Dubska L. (2007): **Circulating endothelial cells and precursor cells as predictors of cancer spread and metastasis: pilot data on colorectal and breast cancer.** *Tumor biology.* 28(1):35-35. abstrakt zvané přednášky, IF 2,840

KREVNÍ DESTIČKY: NÁDOROVÁ ANGIOGENEZE A PROGRESE TUMORU

Již v 60. letech 19. století byla popsána agregace trombocytů navozená nádorovými buňkami, která je částečně odpovědná za **protrombotické působení nádoru** (Trousseau, 1865). Později bylo demonstrováno, že blokáci tvorby agregátů destiček s nádorovými buňkami dojde k inhibici tvorby metastáz (Gasic et al., 1968; Jurasz et al., 2004) a že schopnost nádorových buněk aktivovat krevní destičky koreluje s metastatickým potenciálem nádorových buněk (Karparkin et al., 1988a; Karparkin et al., 1988b). V roce 2012 jsme publikovali přehledový článek shrnující aktuální poznatky o úloze krevních destiček v patogenezi a léčbě solidních malignit²³. Trombocyty mají významnou úlohu při hemostáze. Základní funkce krevních destiček jsou i/ adheze – destičky přilnou na poraněním obnažený subendoteliální kolagen, ii/ agregace – destičky agregují prostřednictvím fibrinogenu, pro který exprimují receptory, iii/ konstriktce – díky kontraktilním bílkovinám dochází ke změně tvaru destiček a uvolnění účinných látek, iv/ tvorba trombu → vzniká provizorní destičkový trombus a navazují procesy vzniku červeného trombu a hemokogulace, v/ hojení – trombocyty obsahují látky, které regulují angiogenezi a regeneraci poraněné tkáně. Základní funkce krevních destiček se uplatňují v interakci s ostatními buněčnými komponentami organismu (Obrázek 48), funkci krevních destiček ovlivňuje přímo v nádorovém mikroprostředí nádorová buňka (příloha 7, str. 79-80) a nádorové stroma (především endotel, ale i imunokompetentní buňky).



Obrázek 48: Adheze a aktivace trombocytů s implikací pro efekt v mikroprostředí nádoru

Převzato z (Andrews and Berndt, 2004; Chen et al., 2001; Yip et al., 2005). **1)** Vazba receptoru GPIb-IX-V na von Willebrandův faktor (vWF) umožňuje adhezi krevních destiček na subendoteliální kolagenové fibrily a jejich rolování po endoteliu. **2)** Vazba receptorů GPIIb/IIIa na kolagen vede k pevné adhezi, zastavení destičky na povrchu kolagenu a následné aktivaci trombocytů. Interakce se subendoteliem, tj. aktivace receptorů GPIb-IX-V a GPIIb/IIIa způsobuje aktivaci trombocytů: vylití obsahu denzních a α -granul, aktivaci integrinů, zejména receptoru α IIb β 3 (GPIIb/IIIa). **3)** Po vazbě ADP na receptory P_2Y_1 nebo P_2Y_{12} dochází k primární stimulaci agregace destiček a k aktivaci receptoru α IIb β 3. **4)** P-selektin je skladován v α -granulích krevních destiček. Po jejich aktivaci destičkovými agonisty (tj. trombin, ADP, kolagen) je vystaven na povrch destičky (membrane flipping), kde zprostředkovává adhezi leukocytů na krevní destičky a vazbu krevních destiček navzájem. Interakce P-selektinu s povrchovými molekulami nádorových buněk se uplatňuje v procesu metastazování. **5)** Krevní destičky jsou aktivovány také prostřednictvím receptorů PAR-1 a PAR-4, jejichž ligandem je trombin. K přeměně protrombinu na trombin je nezbytný tkáňový faktor (TF, FIII). TF je glykoprotein přítomný na subendotelových buňkách, monocytu a makrofágy tkáňový faktor produkují po jejich aktivaci. TF zahajuje koagulační kaskádu vazbou FVII, aktivovaný FVIIa katalyzuje aktivaci FX na FXa, který dále katalyzuje přeměnu protrombinu (FII) na trombin (FIIa). **6)** α IIb β 3 (GPIIb/IIIa) receptor zprostředkovává agregaci krevních destiček vazbou fibrinogenu a vWF. Vazba jiných ligandů, jako je vitronectin a fibrinogen, agregaci moduluje.

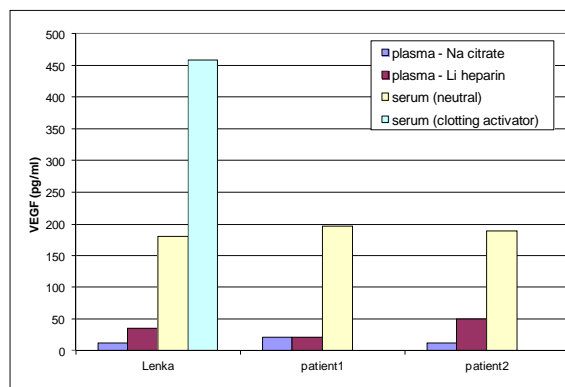
6) α IIb β 3 (GPIIb/IIIa) receptor zprostředkovává agregaci krevních destiček vazbou fibrinogenu a vWF. Vazba jiných ligandů, jako je vitronectin a fibrinogen, agregaci moduluje.

²³ Pilatova K., Zdrzilova-Dubská L., Klement G. L. (2012): **The role of platelets in tumour growth. Klin Onkol.** 25(2): S2 50-57.

VÝSTUP 17: KREVNÍ DESTIČKY JAKO SYSTÉMOVÁ KOMPONENTA PATOGENEZE SOLIDNÍCH NÁDORŮ

Rozvoj poznatků o vztahu trombocytů a malignit je v posledních letech dán především faktem, že antiangiogenní protinádorová terapie je často založená na inhibici VEGF (a v budoucnosti jistě i na dalších modulátorech angiogeneze, např. Ang-2) a že destičky jsou hlavními transportéry VEGF; více než 80 % cirkulujícího VEGF se nachází v krevních destičkách (Holmes et al., 2008; Peterson et al., 2010), (Obrázek 49). Krevní destičky obsahují mimo VEGF také řadu dalších pro- a anti-angiogenních faktorů (Příloha 7, Tabulka 1), které jsou za fyziologických podmínek uvolňovány regulovaným způsobem, tak aby byla zajištěna optimální neovaskularizace v místě poškození tkáně. Obecně lze říci, že při hojení rány jsou v první fázi z trombocytů uvolněny proangiogenní faktory a v druhé fázi je proces neovaskularizace potlačen anti-angiogenními působky krevních destiček a stromálních buněk. S tímto jevem souvisí kupříkladu různá odpověď na selektivní stimulaci trombinových receptorů. Po stimulaci PAR-1 dochází k uvolnění VEGF za současné inhibice sekrece endostatinu. Aktivací PAR-4 dochází k sekreci endostatinu s potlačením VEGF sekrece, a tím k inhibici nádorové angiogeneze (Italiano et al., 2008; Sabrkhany et al., 2011). Z trombocytů aktivovaných trombinem byl dále izolován destičkový faktor-4 (PF-4) neboli CXCL4, chemokin inhibující angiogenezi. Angiostatický účinek je zprostředkován například vazbou PF-4 na VEGF a bFGF a kompeticí s těmito růstovými faktory o vazbu na heparan sulfát, čímž inhibuje jejich vazbu na receptory a brání tak angiogenezi (Pilátová et al., 2013; Vandercappellen et al., 2011, 2008).

Odlíšný efekt trombinu na uvolnění destičkových faktorů a fakt, že angiogenní a angiostatické proteiny jsou umístěny odděleně v různých subpopulacích α -granulí, poukazuje na selektivní regulaci angiogeneze prostřednictvím krevních destiček. V souvislosti s vysokým obsahem regulátorů angiogeneze v trombocytech a jejich v řadě případů anti-angiogenní úlohou se uvažuje také o potenciálu destiček zadržovat tyto látky a blokovat tak jejich dostupnost v místě procesu neovaskularizace. Trombocyty pacientů s kolorektálním karcinomem obsahují vyšší hladiny proangiogenního VEGF i anti-angiogenního endostatinu a trombospondinu-1 (Peterson et al., 2012) a bylo pozorováno, že trombocyty preferenčně vychytávají faktory (GM-CSF, TPO, $\text{TNF}\alpha$, $\text{TGF}\beta$ a MCP-1) produkované nádorem oproti faktorům produkovaným zdravou tkání (Kerr et al., 2010). Na druhou stranu mohou regulátory angiogeneze uvolněné z krevních destiček po stimulaci jejich adheze/aktive/konstrikce nádorem (maligní buňky + stroma) přispívat k rozvoji tumoru jak v primárním tumoru, tak v místě vzdálených metastáz. Stimulační vlastnosti obsahu trombocytů na endoteliální buňky jsme pozorovali v experimentu u několika onkologických pacientů, přestože na celkovém malém souboru pacientů nebyl pozorovaný rozdíl statisticky významný (Obrázek 50), nelze vyloučit, že chemoatraktanty endoteliálních buněk v trombocytech onkologických pacientů

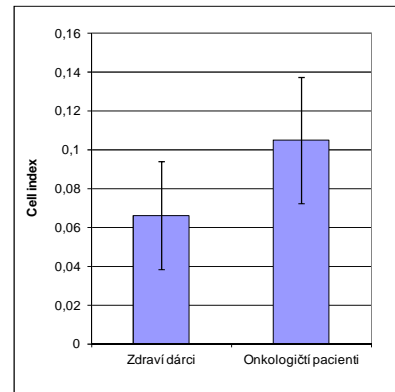


Obrázek 49: **Hladiny VEGF v biologickém materiálu odvozeném z krve zásadně závisí na preanalytice/typu odběru.**

Hladina VEGF byla stanovena 1/ v plazmě s antikoagulans citrát sodný, 2/ v plazmě a antikoagulans lithium heparin, 3/ v séru bez aktivátoru srážení, 4/ v séru s aktivátorem srážení (kaolin; tento odběr bylo možné pouze na zdravém dobrovolníkovi). Variabilita hladiny VEGF daná různými odběry překračuje několikanásobně interindividuální variabilitu při použití stejného odběrového systému.

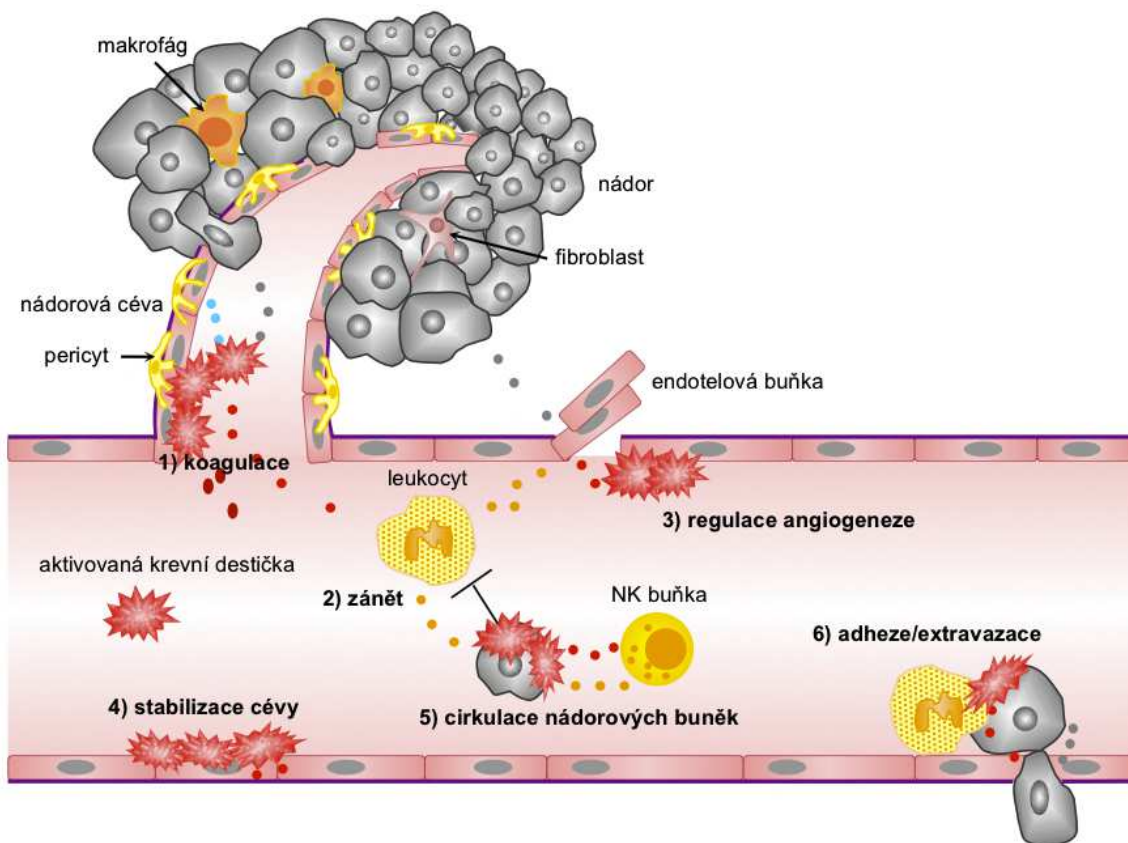
stimulují migraci endotelií v nádorovém mikroprostředí stejně jako v uvedeném experimentu, což přispívá k neovaskularizaci tumoru.

Přestože krevní destičky obsahují také antiangiogenní faktory (Italiano et al., 2008) a jejich funkční efekt na inhibici nádorové neovaskularizace byl popsán na myším modelu (Manegold et al., 2003), považuje se obecně působení trombocytů spíše za proangiogenní a podporující růst a šíření nádoru a to na několika úrovních (Obrázek 51). Z pohledu neovaskularizace/angiogeneze i úlohy imunitního systému je možné progredující nádor považovat za nehojící se ránu (Dvorak, 1986). V prvních fázích hojení rány, podobně jako při progresi tumoru, dochází k aktivaci koagulace; trombocyty a leukocyty uvolňují cytokiny podporující prokrvení a začínají se tvořit nové cévy. Ve finální fázi hojení krevní destičky zajišťují potlačení angiogeneze, k čemuž při progresi nádoru zpravidla nedochází. Naopak, nádor se chová spíše jako zanícená rána, ve které jsou cévní stěny propustné a leukocyty (neutrofilly a monocyty) přispívají k angiogenezi a růstu nádorových buněk. Krevní destičky přispívají ke vzniku hematogenních metastáz a konzistentně s tímto faktem vede protideštičková léčba v řadě případů k lepšímu průběhu či prevenci onkologických onemocnění (Příloha 7, str. 83).



Obrázek 50: Vliv obsahu trombocytů na migraci endoteliálních buněk.

Cell index představuje míru migrace buněk endoteliálních buněk HUVEC po stimulaci migračním médiem s obsahem lyzovaných trombocytů. Migrace byla stanovena po optimalizaci metody na přístroji xCELLigence a cell index představuje míru migrace end-point ve 24. hodině. Byly testovány 3 vzorky od zdravých dárců a 4 vzorky trombocytů onkologických pacientů (Volejnikova, 2012).



- Faktory exprimované endotelovými buňkami (glykoproteiny, prokoaglační, prozánětlivé, angiogenní faktory)
- Faktory exprimované nádorovými buňkami (glykoproteiny, prokoaglační, prozánětlivé, angiogenní faktory)
- Faktory uvolňované z α - a denzních granúl trombocytů (glykoproteiny, koagulační faktory, angiogenní faktory, prozánětlivé cytokiny)
- Trombocytární mikropartikule
- Faktory exprimované leukocyty (glykoproteiny, prozánětlivé, angiogenní faktory)

Obrázek 51: Úloha destiček v nádorovém růstu a angiogenezi.

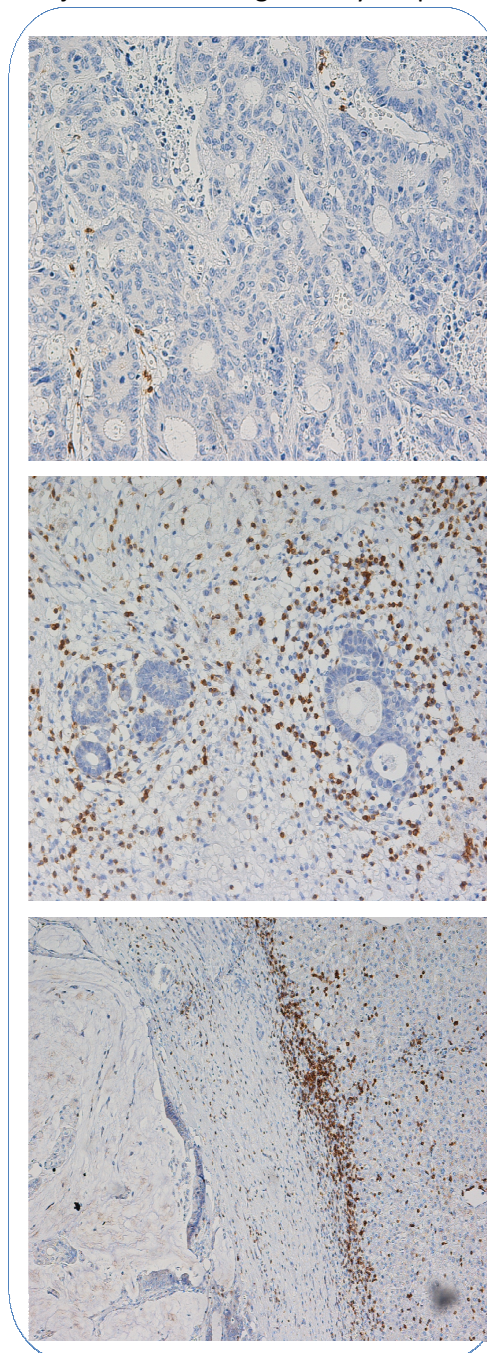
1) **Koagulace:** stimul k aktivaci trombocytů přichází z endotelových buněk, ale i ze samotného nádoru nebo z buněk nádorového stromatu (exprese tkáňového faktoru, trombinu, ADP atd.) Po aktivaci trombocytů dochází ke změně jejich tvaru a k uvolnění mikropartikulí, obsahu α - a denzních granúl a ke spuštění koagulační kaskády (Andrews and Berndt, 2004). 2) **Zánět:** chemokiny (IL-8, histamin atd.) uvolňované z trombocytů způsobují chemotaxi leukocytů a prekurzorových buněk z kostní dřeně. Tyto buňky mohou také přispívat k progresi nádoru uvolňováním různých růstových a angiogenních faktorů (Pollard, 2004; Solinas et al., 2009). 3) **Angiogeneze:** trombocyty se uplatňují také při regulaci angiogeneze uvolňováním pro- a antiangiogenních faktorů (VEGF, bFGF, PF-4 atd.), ale také jejich aktivním „sbíráním“ z cirkulace (Browder et al., 2000b; Sabrkhany et al., 2011). 4) **Stabilizace cévy:** trombocyty stabilizují cévu a udržují mezibuněčné spoje uvolňováním faktorů, jako je EGF, S1P, ang-1 atd., aby zabránily krvácení v místě angiogeneze a zánětu (Lippi et al., 2007). 5) **Cirkulace nádorových buněk:** naadherované trombocyty chrání nádorové buňky před rozpoznáním imunitním systémem a před cytotoxickým působením TNF- α , což umožňuje jejich migraci do vzdálenějších míst (Kopp et al., 2009; Philippe et al., 1993; Shau et al., 1993). 6) **Adheze/extravazace:** tvorba agregátů nádorových buněk s leukocyty a trombocyty usnadňuje jejich adhezi na endotelium a následnou extravazaci na nové místo. Trombocyty dále uvolňují faktory podporující proliferaci nádorových buněk a zvyšující permeabilitu cévy (např. VEGF) (Chen and Geng, 2006; Konstantopoulos and McIntire, 1996).

Nádorové bujení způsobuje závažné narušení vzájemných vztahů ve společenství buněk organismu jako celku. Základem maligní transformace je akumulace genetických poruch v (pre)nádorové buňce a vznik těchto změn je potencován selekčními procesy nádorového stroma působícími na populaci nádorových buněk. Selektce buněk pak vede k patofyziologické přeměně buněk ve smyslu morfologických a funkčních parametrů, včetně vymknutí se kontrole mezibuněčných signálních sítí což nakonec vyústí v invazivitu a metastazování (Lou et al., 2016).

Klinicky se maligní onemocnění manifestuje, ve fázi, kdy maligní buňky unikly imunitnímu dozoru (fáze escape) a imunitní systém má schopnost maligní buňky rozeznávat, ale není schopen růst a šíření nádoru kontrolovat. Předpokládá se, že během života jedince dojde nesčetněkrát k **inaparentní eliminaci** premaligních či maligních buněk (jednotlivých či malých populací) imunitním systémem. Velmi vzácně je pozorována spontánní regrese (tedy bez aplikace protinádorové léčby) již makroskopického tumoru.

Nádorová tkáň může být **infiltrována** různými komponentami imunitního systému; *in situ* se nachází makrofágy, dendritické buňky, mastocyty, NK-buňky, naivní a paměťové B-lymfocyty, subtypy efektorových T-lymfocytů, jako jsou Th-lymfocyty, Th1-lymfocyty, Th2-lymfocyty, Th17-lymfocyty, regulační T-lymfocyty, Tfh-lymfocyty (folikulární pomocné), cytotoxické T-lymfocyty. Imunitní buňky mohou být ve středu nádoru, v invazivním okraji, nebo v přilehlé tkáni mohou tvořit tzv. terciární lymfoidní struktury, což jsou lymfoidní agregáty tvořící se v místě chronické stimulace imunitního systému, které mají strukturu podobnou jako sekundární lymfoidní orgány (Germain et al., 2015). Infiltrace nádoru a okolí nádoru imunitními buňkami je heterogenní (Obrázek 52) a je spojena s progresí tumoru a prognózou onemocnění.

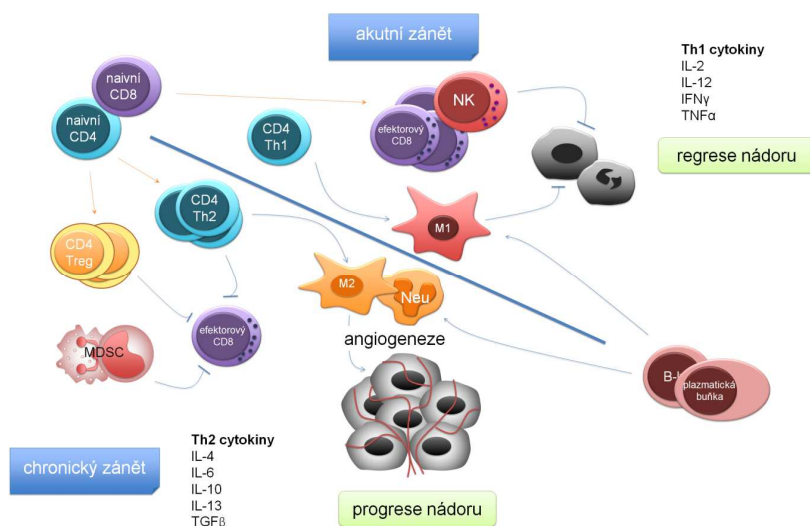
Na eliminaci tumoru se podílejí imunitní efekторы, které se překrývají s komponentami akutního zánětu (Obrázek 53), což již vyvozoval Coley při aplikaci nespecifické imunoterapie bakteriálními působy, jejichž



Obrázek 52: **Infiltrace jaterních metastáz kolorektálního karcinomu T-lymfocyty.** Imunohistochemicky jsou barveny CD3+ buňky. NAHOŘE je tkáň s nízkou infiltračí T-lymfocyty; UPROSTŘED je metastáza s vysokou disperzní denzitou CD3+; DOLE je vysoká denzita CD3+ buněk v okraji tumoru. Fotografie poskytl MUDr. Rudolf Nenutil, CSc.

mechanismus působení popisoval: „..., the action of the toxins appears to me to produce certain changes in the blood or serum that restore weakend or lost immunity or natural resisting power of the tissues, and the sarcoma-cell, no longer finding conditions favourable for further growth and development, undergoes a process of degeneration, with absorption in some cases and the formation of a slough in others.“ (Coley, 1910).

Z hlediska aktuálních poznatků se ukazují efektorové komponenty imunitní reakce jako **pozitivní prognostický faktor** napříč různými histotypy maligních onemocnění a to především vysoká denzita CD3+ T-lymfocytů, CD8+ cytotoxických T-lymfocytů a CD45RO+ paměťových T-lymfocytů v nádorové tkáni. Imunitní buňky přítomné v nádorovém stroma vytváří a jsou regulovány cytokinovým a chemokinovým prostředím, ve kterém pozitivní roli vzhledem ke klinické prognóze pacienta hrají Th1 cytokiny jako je IFN γ , IL-12 a chemokiny jako jsou CXCL1, CXCL9, CXCL10, CCL5, CCL2 (Fridman et al., 2012).



Obrázek 53: Komponenty akutního a chronického zánětu v imunobiologii nádoru.

V průběhu akutní zánětlivé reakce se cytotoxické CD8+ lymfocyty a NK-buňky přímo účastní cytotoxické reakce namířené proti maligním buňkám. Protinádorový efekt Th1-lymfocytů spočívá v produkci cytokinů s inhibičním efektem směrem k nádorovým buňkám a se stimulačním efektem směrem k M1 makrofágům. Komplement a B-lymfocyty secernované B-lymfocyty resp. plazmatickými buňkami zprostředkují migraci M1 a NK

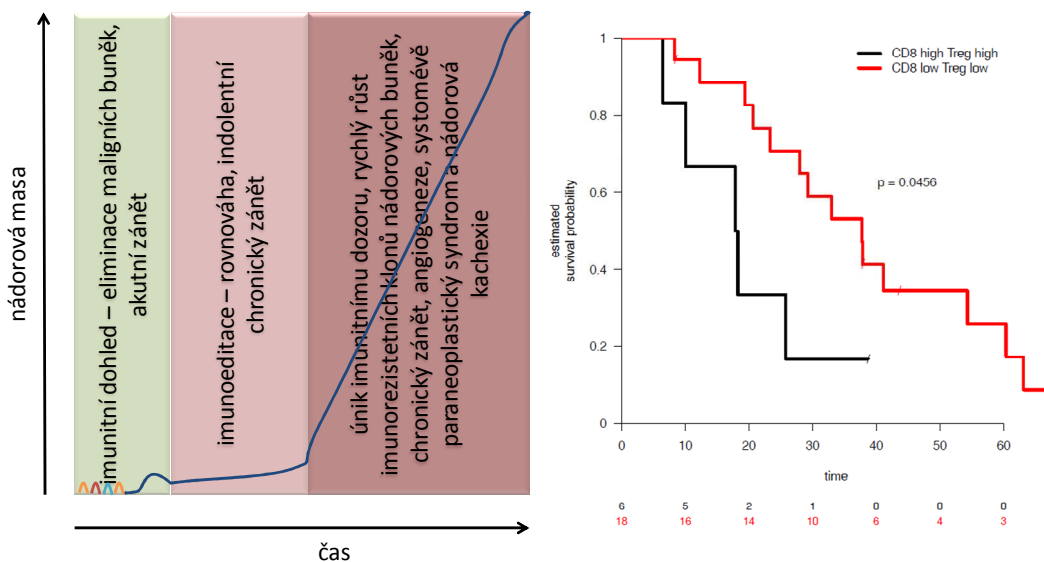
buněk do místa nádoru a také cytotoxickou reakci proti maligním buňkám (např. ADCC).

V podmínkách chronického zánětu dochází k rozvoji buněčných subpopulací regulujících/potlačujících cytotoxickou reakci proti maligním buňkám; jedná se především o MDSC (myeloid-derived suppressor cells), T-regulační lymfocyty (T-reg) a Th2-lymfocyty, které zároveň prostřednictvím produkce Th2 cytokinů navozují polarizaci makrofágů směrem k pronádorovým M2. Chronicky aktivované B-lymfocyty přispívají produkcí imunoglobulinů a cytokinů k infiltraci nádoru buňkami nespecifické imunity (Shalapour et al., 2015), které jsou v podmínkách chronického zánětu polarizovány směrem k M2 typu s výrazně proangiogenní (VEGF) a pronádorovou cytokinovou produkcí.

Na druhou stranu za určitých podmínek podporuje **zánětlivá reakce** rozvoj maligního onemocnění. Z epidemiologických dat je známo, že chronický zánět je predispozičním faktorem pro různá maligní onemocnění; např. zánětlivá střevní onemocnění a karcinom tlustého střeva, gastritida spojená s infekcí *H. pylori* a karcinom žaludku či MALT lymfom, autoimunitní tyreoiditida a papilární karcinom štítné žlázy, prostatitida a karcinom prostaty, pankreatitida a karcinom slinivky chronická virová hepatitida a hepatocelulární karcinom (Výstup 5, str. 34). Chronický zánět moduluje většina systémových faktorů organismu vydefinovaných v úvodu textu (Obrázek 7, str. 19). Hlavní pronádorové zánětlivé procesy jsou: leukocytární infiltrace prominující v infiltraci makrofágy asociovanými s tumorem (Frohlich et al., 1980), MDSC, remodelace tkáně a nádorová angiogeneze (Obrázek 53).

Chronický zánět tedy propaguje růst tumoru a recipročně maligní buňky modifikují mikroprospeď nádoru směrem k imunitní reakci typu Th2/M2 a chronickému zánětu (Sousa et al., 2015). Chronický zánět, především díky systémovému působení cytokinů IL-1 β , IL-6, TNF α či BAFF (Příloha 24 – Figure 2), pak přispívá nejen k rozvoji maligního onemocnění, ale potencuje také celkovou symptomatologii pacienta s malignitou včetně rozvoje **nádorové kachexie**²⁴, která významně zhoršuje průběh maligního onemocnění.

Z hlediska kontroly pronádorového efektu chronického zánětu je zajímavá problematika **regulačních T-lymfocytů u pacientů s kolorektálním karcinomem**. U časných stádií karcinomu kolorekta se zdá, že vysoká infiltrace nádorové tkáně regulačními T-lymfocyty je asociována s příznivou prognózou (Frey et al., 2010; Ladoire et al., 2011; Salama et al., 2009), což se vysvětluje právě tím, že T-regulační lymfocyty limitují zánětlivou reakci, která by vedla k propagaci nádoru (Whiteside, 2012). Naopak u pokročilých stádií kolorektálního karcinomu jsou T-regulační lymfocyty spojeny s horší prognózou pravděpodobně díky převažujícímu imunosupresivnímu efektu na imunitní efektoři (Brudvik et al., 2012; Deng et al., 2010).



Obrázek 54: **Progrese tumoru z hlediska lokálních a systémových zánětlivých procesů.**

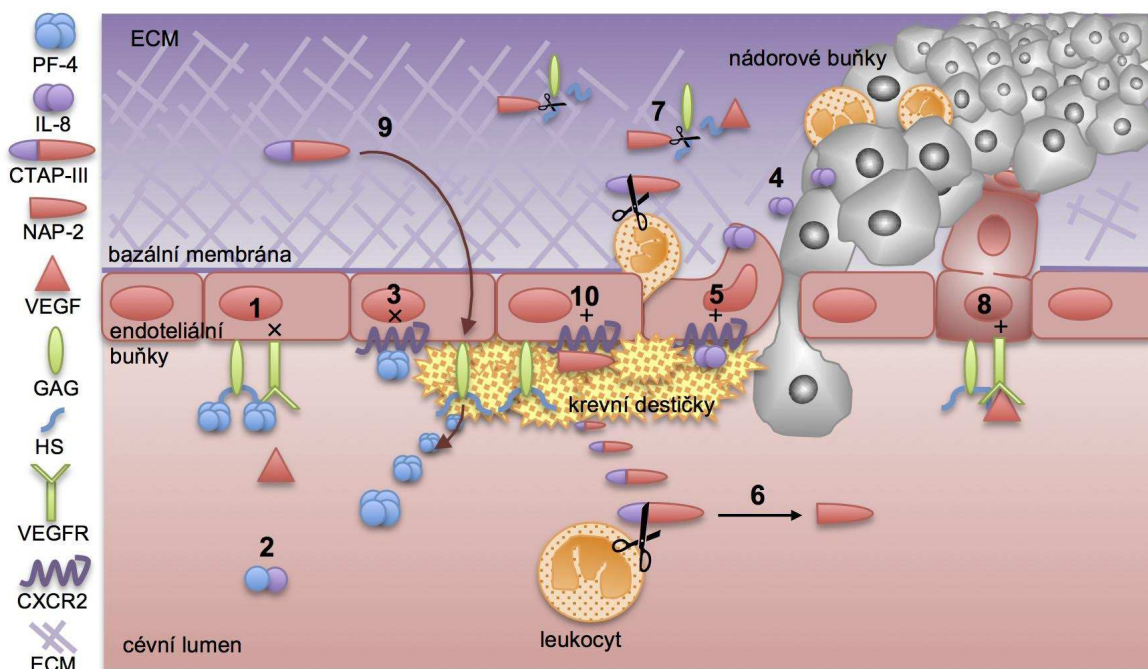
VLEVO Během života jedince jsou maligní buňky často eliminovány imunitním systémem. Díky imunoeditaci v prostředí indolentního chronického zánětu se selektují imunorezistentní klony buněk. Následuje únik imunitnímu dohledu, angiogenní switch a při pokročilém onemocnění se může manifestovat inflamatorní nádorová kachexie.

VPRAVO Při analýze hladin cirkulujících regulačních T-lymfocytů a cirkulujících cytotoxických T-lymfocytů byl nejhorší klinický průběh z hlediska OS u pacientů, kteří měli zároveň vysokou hladinu T-regulačních lymfocytů a cytotoxických lymfocytů. Důvodem uvedeného pozorování může být fakt, že u pacientů CD8^{high}Treg^{high} dochází ke kombinaci imunosupresivního efektu T-regulačních lymfocytů směrem k potlačení protinádorové imunity a naopak vysoká hladiny CD8+ cytotoxických T-lymfocytů reflektuje zánětlivé pozadí, které podporuje progresi tumoru.

Vzhledem k faktu, že zánětlivé prostředí podporuje nádorový růst prostřednictvím stimulace endoteliálních buněk a nádorové angiogeneze se také používá pojem **zánětlivá angiogeneze** (angl.

²⁴ Rihacek, M., Bienertova-Vasku, J., Valik, D., Sterba, J., Pilatova, K., Zdrzilova-Dubská, L. (2015): **Cell Activating Factor as a Cancer Biomarker and Its Implications in Cancer-Related Cachexia.** *BioMed Res Int.* 792187, *IF 2,706*, citace WOS 1

inflammatory angiogenesis), která se za fyziologických podmínek uplatňuje při poškození tkáně, kdy k její regeneraci a neovaskularizaci přispívají buňky imunitního systému. V patofyziologii maligních onemocnění má zánětlivá angiogeneze pronádorové působení, kdy nádorové mikroprostředí stimuluje buňky imunitního systému uvolňovat cytokiny a růstové faktory navozující remodelaci tkáně a nádorovou angiogenezi a růst nádoru (Noonan et al., 2008). V tomto kontextu se uplatňují mimo neutrofilů, M2 makrofágů či MDSC také krevní destičky obsahující řadu faktorů s imunoregulačními vlastnostmi a schopností modulovat neovaskularizaci. V nádorovém stroma, které se z pohledu regenerace chová jako **zanícená nehojící se rána** (Dvorak, 1986), může být regulováno uvolnění obsahu trombocytů ve smyslu stimulace zánětu a nádorové angiogeneze. Příkladem destičkových cytokinů propojujících regulaci angiogeneze a zánětu s implikací pro progresi nádoru je destičkový faktor 4 (PF-4) (Příloha 25 – Table 2) a CTAP-III (*connective tissue activating peptide III*) (Příloha 25 – Table 1) (Obrázek 55)²⁵. Trombocyty se uplatňují v modulaci zánětu také díky expresi TLR (Semple et al., 2011) a selektinu CD154 (CD40L), čímž stimuluji neutrofilů k aktivaci směrem k infiltraci poškozené tkáně a produkci cytokinů, což



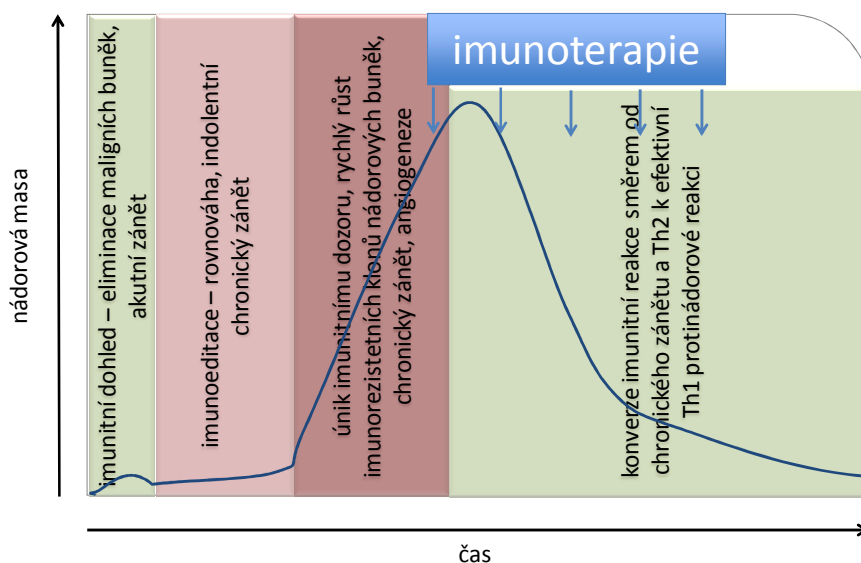
Obrázek 55: **Úloha trombocytárních chemokinů PF-4 a CTAP-III/NAP-2 při regulaci angiogeneze a nádorové progresi.** Interakce komponent stroma nádoru či rány je regulováno aktivitou tkáňových proteáz a interakcí buněk v nádorovém mikroprostředí. PF-4 inhibuje nádorovou angiogenezi (1) kompeticí s růstovými faktory o vazebná místa na heparan sulfátových (HS) koreceptorech růstových faktorů jako je např. VEGFR2 (Perollet et al., 1998); (2) vazbou na IL-8 za vzniku IL-8/PF-4 heterodimerů (Nesmelova et al., 2005); (3) blokáci membránového CXCR2, receptoru pro IL-8, regulujícího angiogenezi a průběhu zánětlivé reakce (Jones et al., 1997). (4) IL-8 produkovaný nádorovými buňkami i stroma např. endoteliálními buňkami stimuluje chemotaxi zánětlivých buněk (Ehlert et al., 2000) a angiogenezi (Li et al., 2003) (5) prostřednictvím signalizace přes chemokinový receptor CXCR2 (Li et al., 2003). Chemokin CXCL7/CTAP-III ovlivňuje mikroprostředí nádorů různými způsoby: (6) CTAP-III je štěpen leukocytárními proteázami za vzniku NAP-2; NAP-2 odštěpuje HS z glykozaminosulfátů (GAG) ve stroma, což vede k rozrušení proteinových interakcí v extracelulární matrix (ECM) a následnému uvolnění růstových faktorů (včetně VEGF) vázaných v ECM na heparansulfáty. Remodelovaná ECM umožňuje vazbu uvolněných růstových faktorů na receptory, což vede k modulaci angiogeneze a šíření nádorových buněk; CTAP-III stimuluje syntézu GAG na povrchu poraněných endoteliálních buněk, což vede k produkci PF-4. (10) NAP-2 reguluje signalizaci a expresi prostřednictvím receptoru CXCR2 (Ehlert et al., 2000).

²⁵ Pilatova K., Greplova K., Demlova R., Bencsikova B., Klement G. L., Zdrzilova - Dubska L. (2013): **Role of platelet chemokines, PF-4 and CTAP-III, in cancer biology.** *J Hematol Oncol.* 6(42). IF 4,458, citace WOS 8

může stimulovat nádorové stroma (Dewitte et al., 2015). Na druhou stranu trombocyty aktivují prostřednictvím CD154 také monocyty a dendritické buňky (viz také Obrázek 19), což vede k posílení specifické antigen-dependentní T-lymfocytární imunitní odpovědi.

Řada maligních onemocnění produkuje značnou desmoplastickou reakci s produkcí abundatní extracelulární matrix s proliferací fibroblastů asociovaných s nádorem a buněk podobných myofibroblastům (*myofibroblast-like cells*) (Mahadevan and Von Hoff, 2007). **Extracelulární matrix** se skládá z kolagenu typu I, III, IV, fibronektinu, lamininu, hyaluronanu či osteonektinu. Na složky ECM se váží funkční molekuly (cytokiny, chemokiny) regulující maligní buňky (Obrázek 55) a některé komponenty ECM mají signální funkci. Tyto molekuly ovlivňují buněčnou proliferaci, migraci a adhezivitu a zvyšují zánětlivou komponentu v nádorovém mikroprostředí atrakcí neutrofilů. Výsledkem je fibroinflatorní prostředí, které díky fyzikálním (především vazba vody) a biologickým vlastnostem zvyšuje intersticiální tlak v tumoru, zabraňuje perfúzi protinádorové terapie, což vede k progresi tumoru a zvýšené chmoresistenci (Minchinton and Tannock, 2006). V posledních letech se objevují v klinických hodnoceních látky, které složky extracelulární matrix rozkládají ve snaze zvýšit prostupnost chemoterapie do nádorového mikroprostředí. Příkladem je studie NCT01959139 zkoumající efekt rekombinantní pegylované **hyaluronidázy** podávané s chemoterapií u pacientů s metastatickým karcinomem pankreatu.

Snahou imunomodulačních a imunoterapeutických protinádorových přístupů je překlopení fungování imunitního systému opět směrem k typu 1 ve snaze obnovit efektivní imunitní dozor, který není blokován imunosupresivním mikroprostředím nádoru (Obrázek 56). Imunomodulací a imunoterapií se v tomto kontextu rozumí aktivní imunoterapeutické přístupy jako jsou anti-PD1, anti-PD-L1, anti-CTLA-4 protilátky, protinádorové vakcíny, CARs, ale také historické imunoterapeutické postupy při léčbě maligních onemocnění bakteriálními půsovkami, které prováděl Coley a další (viz str. 61), které v některých případech navodily regresi maligních tumorů, či koncept devitalizace a hypertermické terapie solidních malignit. V širším slova smyslu je imunoterapeutickým přístupem navození buněčné smrti maligní buňky, kterou následuje akutní

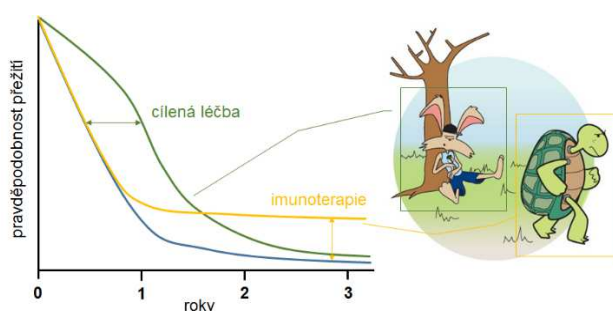


Obrázek 56:
Předpokládaná úloha
imunoterapie v konverzi
funkce imunitního
systému směrem
k efektivní eliminaci
maligních buněk.

stimulace imunitní odpovědi proti nádorovým antigenům z cílových buněk. S tímto konceptem pracuje radioterapie a některé typy chemoterapie, která obsahuje látky navozující imunogenní buněčnou smrt (např. antracykliny), která je spojena a expresí DAMPs eliminovanou maligní buňkou (Garg et al., 2015b; Pol et al., 2015; Zitvogel et al., 2010). Tyto DAMP molekuly (např. kalretikulin) pak slouží jako „eat-me“ signál pro APC stimulující antigen-dependentní aktivaci T-lymfocytů (Adkins et al., 2014; Garg et al., 2015a).

Protinádorová terapie, která nenavozuje efektivní protinádorovou imunitní odpověď, nenavozuje při aplikaci na makroskopické onemocnění zpravidla trvalou odpověď (jsou výjimky, např. vysoce chemosenzitivní ne-epiteliální nádory jako testikulární tumor) ve smyslu udržitelné kontroly maligního onemocnění. Díky cytotoxické léčbě dochází k rychlé redukci nádorové masy, kterou velmi často následuje získání rezistence a opětovný růst tumoru lokálně a diseminovaně. Totéž platí pro cílenou terapii (nízkomolekulární TK inhibitory, anti-EGFR, anti-VEGF). Naproti tomu imunoterapie může navodit **trvalou odpověď na léčbu** i u pokročilých agresivních onemocnění jako je maligní melanom (Sznol and Chen, 2013; Yushak et al., 2013) (Obrázek 57). Odpověď na imunoterapii (checkpoint inhibitory, protinádorové vakcíny) je patrná pouze na části léčených pacientů. Předmětem výzkumu jsou v současné době prediktivní faktory klinického efektu checkpoint inhibitorů. V případě terapeutické blokace se zdá být jedním z faktorů exprese PD-L1 na povrchu maligních buněk, nicméně i v případě PD-L1 negativních nádorů lze dosáhnout klinického efektu při léčbě anti-PD-1/anti-PD-L1 (Meng et al., 2015).

Hledání prediktivních faktorů = cílů protinádorové terapie tak jak je dáno konceptem personalizované onkologické léčby (viz cílení na KRAS, Her-2, apod.) naráží i v cílené imunoterapii na selekční tlak vyvolaný léčbou a na fakt, že imunoeditace se uplatňuje také v případě protinádorové imunoterapie; byl publikován případ pacienta s maligním melanomem, který byl iniciálně pozitivní na antigeny NY-ESO-1, MAGE-C1 a Melan-A. Po vakcinaci cílené NY-ESO-1 došlo k selektivní proliferaci buněk negativních na NY-ESO-1 a pozitivních na MAGE-C1 a Melan-A (von Boehmer et al., 2013). Toto pozorování bylo potvrzeno na kohortě pacientů zařazených do klinického hodnocení fáze I NY-ESO vakcíny (Nicholaou et al., 2011). Z tohoto hlediska je pravděpodobně výhodnější strategií protinádorové vakcinace cestou polyantigenní stimulace např.



Obrázek 57: Efekt cílené protinádorové léčby vs imunoterapie.

U pokročilých stádiích maligních onemocnění dochází díky cílené léčbě zpravidla k rychlé regresi nádorové masy nebo je zastavena její progres, což je jev dočasný, jelikož jsou díky selekčnímu tlaku terapie vyselektovány klony buněk, které mohou progredovat i za přítomnosti protinádorové terapie. Klinické praxi se tento stav označuje jako navození rezistence k dané látce. Výsledkem působení cílené terapie je zlepšení přežití v krátkodobém horizontu. Imunoterapie, kterou se v tomto kontextu myslí aktivní imunoterapie, není efektivní u všech pacientů. Dosažení léčebné odpovědi je pomalé a dle konvenčních RECIST kritérií není spolehlivé a vhodné, jelikož díky navození konverze nádorového stroma směrem k Th1/M1 imunitní odpovědi, což zvyšuje infiltrace nádoru lymfocyty, dochází v počátcích imunoterapeutické léčby k zvětšení objemu tumoru (Wolchok et al., 2009). Efekt cílené protinádorové léčby vs imunoterapie má paralelu v Ezopově bajce Želva a zajíc (Schlom, 2012). Modrá křivka představuje křivku přežití u neléčeného onemocnění; zelená = cílená léčba; žlutá = imunoterapie.

dendritickými buňkami pulzovanými kompletním nádorovým lyzátem získaným přímo z nádoru léčeného pacienta (viz str. 70).

Klinický efekt imunoterapeutických přístupů, pro který je podstatná efektivní protinádorová imunitní odpověď v nádorovém mikroprostředí může narážet na **imunosupresivní mechanismy** vyvolané maligními buňkami a nádorovým stroma, které jsou diskutovány výše. K „imunitně nepříznivému“ prostředí přispívá u rostoucího tumoru také propagace abnormální neovaskulatury. Abnormální struktura a funkce nádorové vaskulatury vede ke vzniku nepříznivého nádorového mikroprostředí, jež je charakterizováno hypoxií, nízkým pH, vysokým intersticiálním tlakem, což následně ovlivňuje vlastnosti maligních buněk především ve smyslu selekce klonů buněk s vyšším maligním potenciálem, které mohou opouštět primární nádorové ložisko přes abnormální propusté nádorové cévy (Baluk et al., 2005; Jain, 2005; Nagy et al., 2010; Shi et al., 2013). Abnormální nádorová vaskulatura brání dostatečné infiltraci nádoru imunokompetentními buňkami a přísunu chemoterapeutika a kyslíku do nádoru. Výsledkem jsou rezistentní nádorové buňky (např. k radioterapii či chemoterapii). Prohloubení hypoxie pak vede ke zvýšení produkce dalších pro-angiogenních faktorů nádorovými buňkami či buňkami stromatu, což přispívá k **propagaci neorganizované neproduktivní vaskulatury**, což je jeden z faktorů, které brání efektivní infiltraci cytotoxických imunitních efektorů do mikroprostředí nádoru (Huang et al., 2015). Přínos normalizace nádorové vaskulatury, modulace zánětu a infiltrace lymfocyty pomocí anti-VEGF při kombinaci s anti-CTLA-4 ipilimumabem byl prokázán u pacientů s maligním melanomem (Hodi et al., 2014). Nicméně byl popsán i opačný efekt, kdy anti-VEGF terapie pak může vést k redukci efektivní infiltrace imunokompetentních buněk do nádorového mikroprostředí, a tak ve výsledku působit progresi nádoru (Doloff and Waxman, 2012). Tento rozpor je pravděpodobně výsledkem šířky tzv. **normalizačního okna** (Hernandez-Agudo et al., 2015; Chen et al., 2015), kdy po podání bevacizumabu dochází k normalizaci nádorové vaskulatury, která je nicméně při dalším působení bevacizumabu překlopena do stavu nádorové hypoxie se zvýšením intersticiálního tlaku a nedostupností chemoterapie k maligním buňkám. V současné době je předmětem studií, jak určení šířky normalizačního okna (Zhang et al., 2016), tak její klinická použitelnost v podobě sekvenčního podávání bevacizumabu a chemo- či radio-terapie (Becker et al., 2015; Chen et al., 2015). Na margo tohoto konceptu protinádorového mechanismu působení anti-VEGF terapie vyvstává otázka, jestli je racionální podávat bevacizumab v monoterapii jako udržovací léčbu do progresu.

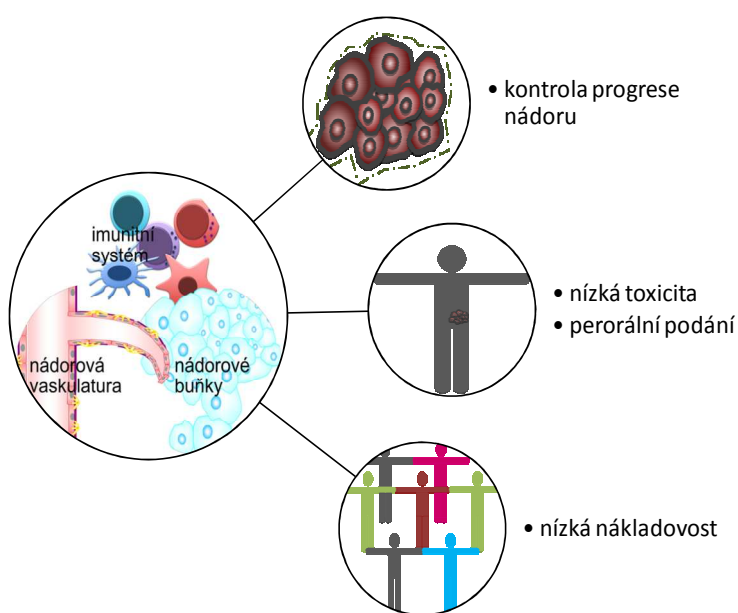
S kombinací terapeutického ovlivnění jak maligních buněk, tak nádorového stroma ve smyslu imuno- a angio-modulačním pracuje koncept kombinované nízkodávkované metronomické terapie. **Nízkodávkovaná metronomická terapie** (LDM) je režim protinádorové léčby spočívající v častém podávání nízkých dávek chemoterapie bez přestávek v léčbě (Kerbel and Kamen, 2004). Koncept metronomické terapie se rozvíjí od počátku tohoto století (Browder et al., 2000a; Hanahan et al., 2000; Klement et al., 2000). Cílem metronomické terapie není eradikace tumoru, ale jeho kontrola tedy potlačení progresu maligního onemocnění ať lokální tak diseminované. Hlavní výhody metronomických režimů oproti standardní vysokodávkované terapii (MTD) spočívají v i/ podstatně nižší toxicitě a tedy nižší zátěži pacienta periterapeutickými a dlouhodobými nežádoucími účinky, ii/ efektu léčby, který je dán kombinací regulace nejen maligních buněk ale také buněk nádorového stromatu, především imunitních buněk a nádorové neovaskulatury, iii/ udržitelnosti efektu léčby, kdy se předpokládá, že u metronomických režimů se neprojevuje

neblahý výsledek selekčního tlaku vyvolaného MTD, jež vede k selekci rezistentní nádorových buněk, jež po ukončení léčby rychle progredují (Oronsky et al., 2014) (Obrázek 57, str. 94).

Biologický efekt metronomické protinádorové léčby je dán konkrétním složením LDM medikace. U většiny režimů se nicméně předpokládá udržitelný anti-angiogenní a imunomodulační efekt, a v menší míře přímá toxicita pro maligní buňky (Obrázek 58), na rozdíl od MTD chemoterapie, jejíž nejpodstatnější komponentou je omezení proliferace a navození buněčné smrti u maligních buněk a v menší míře efekt antiangiogenní a vliv na stimulaci protinádorové imunity, přičemž paradoxně mohou být výsledkem MTD chemoterapie jevy vedoucí spíše k pronádorovému efektu na nádorové mikroprostředí, jako je uvolňování EPCs z kostní dřeně a jejich migrace do nádorového stromatu po podání bolusové dávky paklitaxelu (Shaked et al., 2006); weekly gemcitabin ale ne metronomicky podávaný gemcitabin vedl ke stimulaci MDSC (Hasnis et al., 2014).

Obrázek 58: Racio konceptu metronomické protinádorové terapie.

LDM má imunomodulační vlastnosti, anti-angiogenní vlastnosti, kdy působí na endoteliální buňky nádorové neovaskulatury i na endoteliální progenitorové buňky v cirkulaci. U nádorových buněk tlumí LDM proliferaci, schopnost přežít, může vést k diferenciaci. Výsledkem je kontrola progresu nádoru, kdy cílem není eliminace tumoru, ale omezení jeho lokální progresu a diseminace. Z hlediska pacienta spočívá výhoda LDM především v podstatně nižší toxicitě oproti MTD chemoterapii a také v perorálním užívání, které nevyžaduje hospitalizaci ani častou návštěvu zdravotnického zařízení. Pro metronomickou chemoterapii se obvykle využívají dlouho známé látky (nejčastěji cyklofosfamid (Lien et al., 2013)), které se dávají zpravidla v 10-30% MTD (Kerbel and Kamen, 2004; Maraveyas et al., 2005). Z výše uvedeného je zřejmá nižší nákladovost LDM oproti standardním terapeutickým režimům. Více v příloze 26. ²⁶



V roce 2013 byla publikována metaanalýza 80 publikací shrnujících výsledky klinických hodnocení fáze II LDM terapie u téměř 3700 dospělých s maligními onemocněními, ve kterých převažovaly studie s pacientkami s karcinomem prsu (Lien et al., 2013). Výsledkem této analýzy byla **bezpečnost a klinická efektivita metronomických režimů**. V současné době probíhají studie fáze III, opět především u karcinomu prsu a u kolorektálního karcinomu, kde režim s nízkodávkovaným kontinuálním kapecitabinem u pacientů s mCRC měl srovnatelné výsledky přežití ovšem s nižší toxicitou v porovnání s cílenou terapií (bevacizumab, erlotinib) (Hagman et al., 2016).

²⁶ Bronišová D., Múdry P., Štěrba J., Bajčiová V., Valík D., Dubská L., Mazánek P., Lokaj P., Zitterbart K. (2009): **Metronomická léčba v onkologii jako nová léčebná metoda**. *Onkologie*. 3(4): 227 – 229.

V oblasti pediatrické onkologie je jedním ze světových průkopníků metronomické terapie prof. Šterba; na Klinice dětské onkologie LF MU a FN Brno mají zkušenosti s metronomickým režimem nazvaným **COMBAT** (*Combined Oral Metronomic Biodifferentiating Antiangiogenic Treatment*) již více než 10 let (Sterba et al., 2006). Souhrnné výsledky metronomických režimů COMBAT u 74 dětských pacientů s pokročilými solidními malignitami byly publikovány v roce 2012²⁷. V publikaci jsou popsány 4 modalitý režimu COMBAT (Příloha 27 – Fig. 1-5), které obsahují léčivé přípravky, u nichž byl popsán anti-angiogenní, imunomodulační a/nebo diferenciací efekt (Tabulka 10). Analýza prokázala, že metronomický režim je dobře tolerovaný stran toxicity a je klinicky efektivní. Na základě dosažených úspěchů byl modifikovaný COMBAT (valproát místo celecoxibu) podán na indickém pracovišti u dětských pacientů s high-risk tumory CNS po ukončení konvenční terapie. Retrospektivní analýza dat z tohoto souboru ukázala klinickou efektivitu, nízkou toxicitu a nízkou nákladovost (Chinnaswamy et al., 2014).

Léčivo	Charakteristika	Protinádorová aktivita v nízkých koncentracích léčiva
Celecoxib	inhibitor COX-2	zvýšená exprese COX-2 u řady epiteliální malignit a vysoká exprese COX-2 u buněk neuroblastomu (Johnsen et al., 2004; Reynolds et al., 2001), COX-2 je spojen s rezistencí maligních buněk k apoptóze, zvýšené invazivitě, zvýšené nádorové angiogenezi (interferuje s upregulací COX-2 na endoteliálních buňkách) a snížení dozorových funkcí imunitního systému (Wang and Dubois, 2010); zvyšuje hladinu endostatínu (inhibitor angiogeneze), snižuje hladinu MDSC (Veltman et al., 2010)
Etoposid	inhibitor topoizomerázy	inhibuje proliferaci endoteliálních buněk
Cyklofosfamid	alkylační činidlo	inhibuje proliferaci endoteliálních buněk, upregulace trombospondinu (Bocci et al., 2003), redukuje T-regulační lymfocyty (Cornelissen et al., 2015; Heylmann et al., 2013), mimo to nízkodávkovaný cyklofosfamid ovlivňuje homeostázu dendritických buněk a podporuje sekreci interferonů typu I, což vede k indukci protinádorové aktivity cytotoxických T-lymfocytů a u CD4+ lymfocytů přispívá k diferenciaci do typu Th1 a/nebo Th17 (Hus and Rolinski, 2011; Sistigu et al., 2011; Taieb et al., 2006), metronomický cyklofosfamid také přispívá k eliminaci buněk cestou navození TRAIL-dependentní apoptózy (Roux et al., 2008).
Temozolomid	methylační činidlo	metronomicky má anti-angiogenní (Kurzen et al., 2003) a imunomodulační efekt (Liikanen et al., 2013) spočívající např. v redukcí T-regulační lymfocytů (Banissi et al., 2009; Heylmann et al., 2013).
Fenofibrát	agonista PPAR α	anti-angiogenní efekt, synergie s inhibicí COX-2 (Panigrahy et al., 2010)
Cholecalciferol	vit. D3	protinádorový efekt (viz Obrázek 12, str. 27).
Isotretinol	13-cis retinová kyselina	diferenciací a antiproliferativní efekt na buňky gliomu a neuroblastomu ²⁸ , indukce trombospondinu-1 (Castle et al., 1992)
Bevacizumab	anti-VEGF mAb	selektivní inhibitor angiogeneze (viz 77 a dále)

Tabulka 10: **Protinádorový efekt komponent metronomických režimů COMBAT.**

Složení jednotlivých režimů tj. COMBAT I, COMBAT II, COMBAT IIS, COMBAT III je uvedeno v (Zapletalova et al., 2012), příloha 27.

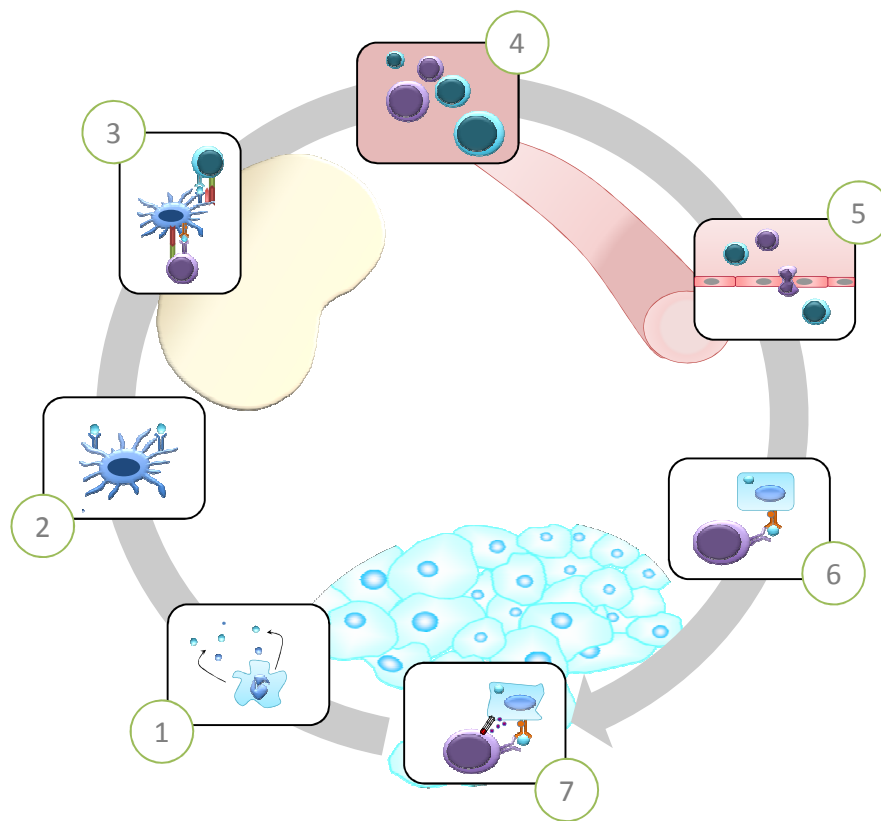
²⁷ Zapletalova D., André N., Deak L., Kyr M., Bajciová V., Mudry P., Dubska L., Demlova R., Pavelka Z., Zitterbart K., Skotakova J., Husek K., Martincekova A., Mazanek P., Kepak T., Doubek M., Kutnikova L., Valik D., Sterba J. (2012): **Metronomic chemotherapy with the COMBAT regimen in advanced pediatric malignancies: a multicenter experience.** *Oncology.* 82(5):249-60. *IF 2,613 citace WOS 11*

²⁸ Frgala T., Dubska L., Reynolds C. P. (2007): **Retinoidy v léčbě neuroblastomu.** *Klin Onkol.* 20: 311-313.

V roce 2014 byly publikovány výsledky klinického hodnocení fáze II metronomické léčby (cyklofosfamid, etoposid, thalidomid, fenofibrát, celecoxib) u dětských pacientů s rekurentními nebo progredujícími malignitami (Robison et al., 2014). Studie prokázala dobrou snášenlivost metronomického režimu a klinický benefit u některých diagnóz, především low-grade gliomu, meduloblastomu a neuroblastomu. Významným zjištěním této studie byl nález vyšších sérových hladin **trombospondinu-1** před léčbou u pacientů, kteří měli klinický benefit z uvedené terapie, oproti pacientům, kteří na LDM progredovali. V současné době probíhá klinické hodnocení fáze III hodnotící metronomickou chemoterapii (thalidomid, celecoxib, etoposid/cyklofosfamid) u pediatrických pacientů s malignitami oproti nejlepší podpůrné léčbě (Bakhshi).

Zajímavým terapeutickým přístupem je kombinace **imunomodulační a/nebo angiomodulační metronomické terapie s cílenou imunoterapií** v podobě protinádorových dendritických vakcín. V této oblasti jsou zkušenosti především s **nízkodávkovaným cyklofosfamidem**, jehož majoritní efekt v nízkých dávkách spočívá v inhibici regulačních T-lymfocytů (Sistigu et al., 2011), což má za následek odstranění významného supresoru efektivní imunitní odpovědi v nádorovém stroma. V preklinice byla popsána regrese xenograftu gliomu po intermitentním cyklofosfamidu, která byla provázena efektivní infiltrací tumoru NK buňkami (Wu and Waxman, 2014). Na myším modelu bylo ukázáno, že po jedné dávce cyklofosfamidu dochází po iniciální redukci hladiny T-regulačních lymfocytů k opětovnému zvýšení jejich hladiny, což bylo překonáno opakovaným podáváním nízkých dávek cyklofosfamidu. V tomto experimentálním modelu bylo dosaženo nejlepšího protinádorového efektu kombinací metronomický cyklofosfamid, ionizující záření a nezralé dendritické buňky (Son et al., 2012) oproti jiným kombinacím uvedených terapeutických zásahů. Kombinace vakcinace protinádorovými dendritickými buňkami, IL-2 a metronomického cyklofosfamidu byla použita v klinickém hodnocení fáze II u pacientů s metastatickým melanomem (Ellebaek et al., 2012), kombinace protinádorových dendritických buněk s nízkodávkovaným cyklofosfamidem prokázala efekt u hormonálně refrakterního metastatického karcinomu prostaty (Rozkova et al., 2009) a v adjuvanci u pacientů s maligním mezoteliomem (Cornelissen et al., 2015).

Z hlediska kombinované terapie protinádorovými dendritickými buňkami je racionální uvažovat také o kombinaci nejen s low-dose cyklofosfamidem, ale také s anti-VEGF terapií či checkpoint inhibitory (Obrázek 59). Předpokládá se, že antiangiogenní terapie vede k modulaci nádorového mikroprostředí (např. snížením intersticiálního tlaku) směrem k usnadnění infiltrace T-lymfocyty. **Antiangiogenní terapie může potencovat efekt imunoterapie** také díky inhibičnímu vlivu na imunitní supresory, jako jsou MDSC a T-reg (Gabilovich et al., 1999). Kombinace terapie dendritickými buňkami pulzovanými oxidizovaným nádorovým lyzátem, metronomickým cyklofosfamidem a bevacizumabem u pacientek s ovariálním karcinomem je v současnosti předmětem klinického hodnocení fáze I (Kandalaft et al., 2013).



Obrázek 59: **Sumarizace jednotlivých kroků protinádorové imunity: cyklus nádorové imunity.**

Cyklus nádorové imunity shrnuje základní faktory imunitní odpovědi, které se uplatňují při protinádorovém imunitním dozoru a na které je možno cílit protinádorové imunoterapeutické strategie adaptovány dle (Chen and Mellman, 2013). Jednotlivé kroky a onkologická terapie, která na ně cílí, jsou tyto (1) Uvolnění antigenů maligní buňkou – radioterapie, chemoterapie, cílená léčba (trastuzumab apod.), neefektivnější terapie, která navozuje imunogenní buněčnou smrt. (2) Prezentace antigenů APC – protinádorové vakcíny, cytokiny zvyšující antigen prezentační vlastnosti dendritických buněk (IFN α , GM-CSF, agonista CD40, agonisté TLR). (3) Stimulace T-lymfocytů antigen prezentující buňkou – blokace CTLA-4, a stimulace CD137, OX40, či CD27; cytokiny stimulující T-lymfocyty: IL-2, IL-12. (4) Migrace protinádorových T-lymfocytů do maligní tkáně – inhibice regulačních T-lymfocytů, např. low-dose cyklofosfamid. (5) Infiltrace protinádorových T-lymfocytů do maligní tkáně – anti-VEGF terapie s ohledem na normalizační okno. (6) Rozeznání maligních buněk protinádorovými T-lymfocyty – CARs. (7) Cytotoxická reakce a likvidace maligních buněk – blokace PD-1/PD-L1, inhibice IDO.

Habilitační práce představuje integrativní pohled biologa s klinickou zkušeností na solidní malignity z hlediska vztahu hostitel/nádor, konkrétně interakcí maligních buněk a „hostitelského organismu“ ve smyslu i/ klinicky využitelných biomarkerů a ii/ patofyziologie maligních onemocnění se zaměřením na aspekty související s imunobiologií nádoru v kontextu vzniku a léčby maligních onemocnění.

BIOMARKERY

Originální výsledky výzkumu, který prezentuji v habilitační práci, přinesly řadu nových poznatků v oblasti biomarkerů, kde mají přímou implikaci pro

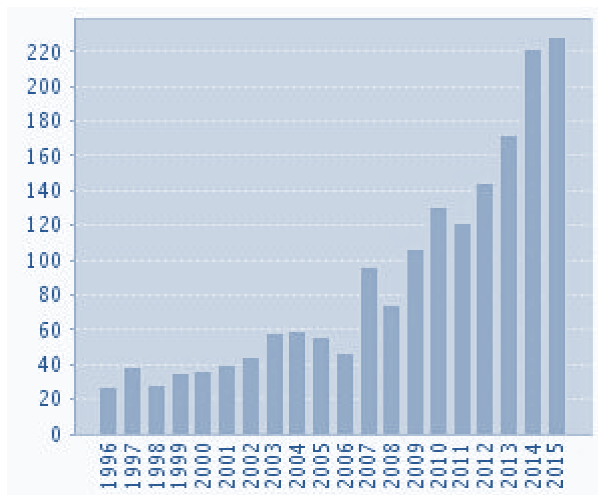
i/ **klinickou praxi**, jako např. analýza stavu vyšetření genu KRAS v České republice a souhrn tehdejších doporučení v této oblasti (Příloha 1); studie vztahu mutace KRAS a efektu bevacizumabu a chemoterapie u léčby 1. linie pacientů s metastatickým kolorektálním karcinomem (Příloha 21); popis vztahu mezi farmakofenotypem a genotypem TMPT a způsob interpretace výsledků (Příloha 3); analýza metod pro sledování infekčních a septických stavů u pacientů se solidní malignitou (Příloha 10); analýza molekulární detekce původců sepse ve srovnání s kulturační metodou (Příloha 9); využití nádorového markeru HE4 pro diagnostiku gynekologických malignit, především ovarialního karcinomu (Příloha 12 a 13); doporučení odborných společností ČLS JEP k využití solubilních nádorových markerů pro klinickou praxi (Příloha 11).

ii/ **klinický výzkum**, jako např. příprava protinádorových vakcín na bázi *ex vivo* aktivovaných, analýza jejich vlastností a návazný imunomonitoring pacientů léčených touto vakcínou (Výstup 14); analýza cirkulujících imunitních efektorů a regulátorů u pacientů se solidní malignitou (Příloha 15, 16, Výstup 11); exploratorní analýza hladin přirozených protilátek proti $\alpha(1,3)$ gal epitopu u onkologických pacientů (Příloha 20); analýza hladin vitamínu D ve vztahu k parametrům přežití u pacientů s metastatickým kolorektálním karcinomem (Příloha 6); exploratorní analýza prevalence alely DPYD*2A; detekce subsetů cirkulujících endoteliálních buněk (Výstup 16).

IMUNOBIOLOGIE SOLIDNÍCH MALIGNIT V KONTEXTU PROTINÁDOROVÉ LÉČBY

Přestože se o solidních malignitách stále častěji hovoří v „systémovém kontextu“, míní se tím zejména skutečnost, že maligní onemocnění je léčeno celkově podávanou léčbou, která se za platnosti známých farmakologických principů (farmakokinetika, farmakodynamika) dostává cirkulací do cílového místa. Významnou změnu pohledu na maligní onemocnění v kontextu jeho hostitele, resp. nositele přinesly nové terapeutické postupy jako je anti-VEGF či imunoterapie checkpoint inhibitory, díky nimž se na organismus hostitele nepohlíží jako na „vessel“ k dodání terapie do místa působení.

Podrobnější identifikace buněk tvořících to, co se dříve nazývalo obecně leukocytárním infiltrátem v nádorové tkáni, se v dnešní době ukazuje být klíčovým prognostickým a v budoucnu snad i prediktivním faktorem protinádorové léčby (Ascierto et al., 2013; Galon et al., 2014). To dokladuje, že porozumění imunobiologickým procesům v nádorovém stroma v celkovém kontextu imunitního stavu hostitelského organismu, není jen akademickým zájmem, ale má přesah do klinické praxe (Obrázek 60).



Obrázek 60: Počet publikací s tématem nádorového stroma ve vztahu ke klinickým parametrům za posledních 20 let.

Údaje byly získány z ISI Web Of Science vyhledáváním termínů „cancer stroma clinical outcome“ OR „cancer stroma predict“ OR „cancer stroma prognostic“.

V současné době se objevují stále nové poznatky o nádorovém stroma a kontextu hostitelského organismu, díky nimž je pohled na maligní onemocnění komplexnější a v mnoha aspektech všeobecně přijímaný

nejen výzkumníky ale i klinickými onkology. Velkou výzvou je nyní posun těchto poznatků do klinické praxe v podobě personalizace léčby nejen s ohledem na skutečné či předpokládané aberace v maligní buňce, ale také s ohledem na konkrétní pronádorové komponenty stroma tumoru a s ohledem na systémové faktory hostitelského organismu (např. komorbidit, imunosupresivní komponenty v cirkulaci, relevantní farmakogenotyp ve vztahu k celé škále efektu tj. od zvýšené toxicity protinádorové léčby po snížený efekt terapie (Výstup 2) či komponenty střevního mikrobiomu (Vetizou et al., 2015)). Aktuální nástroje komplexní imunobiologické predikce jsou mimo **histopatologického** vyšetření buněčných případně humorálních komponent nádorové tkáně také vyšetření **cirkulujících** imunitních efektorů a regulátorů, což je díky posouzení dynamiky v průběhu léčby relevantní z praktického hlediska a vzhledem k reálné existujícímu vzájemnému propojení mezi maligní tkání a lymfatickým a krevním kompartmentem relevantní také z patofyziologického a klinického hlediska (Martens et al., 2016; Meirou et al., 2015). Aktuálně začínáme řešit projekt podpořený grantem Agentury zdravotnického výzkumu ČR s názvem „**Colobiome: Tumour-adjacent microbiome and immune profile of tumour in the context of heterogeneity and aggressiveness of colorectal cancer**“, integrující klinické parametry (histopatologický nále, odpověď na léčbu) u pacientů s kolorektálním karcinomem stádia II a III se střevním a intratumorálním mikrobiomem (stanoveno pomocí 16s rRNAseq), imunitní profil z nádorového mikroprostředí, molekulární markery (BRAF, KRAS, MSI) a genový profil, imunomonitoring periferní krve (detailní subpopulace T-lymfocytů, MDSC, T-reg, NK/NKT-like buňky, anti-Gal protilátky; Výstup 8-10, Výstup 13).

Výsledky léčby checkpoint inhibitory ukazují na potenci imunitního systému kontrolovat pokročilé onemocnění se špatnou prognózou jakým je metastatický maligní melanom. Na druhou stranu limitovaná účinnost checkpoint inhibitorů ukazuje, že k dostatečnému protinádorovému efektu je odbrždění imunitního systému třeba doplnit další terapeutickou komponentou, kterou bychom

mohli hledat v cyklu adaptivní protinádorové imunity (Obrázek 59). Významným krokem v tomto procesu je prezentace nádorových antigenů v kontextu, který je schopen stimulovat imunitní systém, tedy navození buněčné smrti, která je spojena s prezentací DAMPs a je **imunogenní** (Fucikova et al., 2015). Z klinického hlediska se jedná např. o hypofrakcionovanou **radioterapii** (De Wolf et al., 2015), **termické ablace**, jako jsou radiofrekvenční a mikrovlnná ablace či kryoablace (Chu and Dupuy, 2014), terapii **antracykliny či oxaliplatinou** (Obeid et al., 2007), ale také srdeční glykosidy, které překlápí neimunogenní buněčnou smrt navozenou cytostatiky jako mitomycin C, cisplatina na buněčnou smrt imunogenní, což bylo potvrzeno klinickým efektem u pacientek s karcinomem prsu (Kroemer et al., 2013; Menger et al., 2012). V případě imunoterapeutických postupů založených na **prezentaci antigenů** pomocí dendritických buněk je pravděpodobně efektivnější než pulzace jedním předpokládaným nebo verifikovaným nádorovým antigenem imunitnímu systému předkládat antigeny, jež jsou klonálními neoantigeny a jsou přítomné v maximální proporcí nádorových buněk (McGranahan et al., 2016), nebo předkládat skutečné antigeny přítomné v nádorové tkáni daného jedince (Výstup 14).

Významným faktorem úspěšnosti napříč různými postupy protinádorové terapie je modulace **imunopresivního prostředí** nádoru směrem k prostředí umožňujícímu efektivní imunitní odpověď. V tomto ohledu se jeví slibně imunomodulace cílící na T-regulační lymfocyty, M2 makrofágy, myeloidní supresorové buňky MDSC (Výstup 11) případně další komponenty pronádorového chronického zánětu (Výstup 5-6), čehož může být dosaženo léčivými přípravky, které jsou v současné době registrovány pro jiné než protinádorové aplikace (Meirow et al., 2015). V tomto kontextu se hovoří o tzv. „**drug repositioning**“ (a také „**radiotherapy repositioning**“), což je použití známých léčivých přípravků a léčebných postupů v nových indikacích, které vychází z nově popsaných mechanismů účinku dané léčby (Gaya et al., 2015; Sistigu et al., 2011). Příkladem využití nového efektu stávajících léčiv je potenciál prevence kolorektálního karcinomu pomocí nízkých dávek metforminu, aspirinu (Výstup 4, Výstup 17) v kombinaci se suplementací vitamínem D pro prevenci hypovitaminózy D (Výstup 3). V posledních letech došlo také k částečnému přehodnocení a doplnění předpokládaného proti-nádorového efektu antiangiogenní terapie (Výstup 15) a to s ohledem na průběh efektu v nádorové tkáni, kdy zprvu dochází k normalizaci nádorové vaskulatury, což umožní infiltraci imunitních efektorů a jejich cytotoxickou aktivitu směrem k maligním buňkám, a po delším podání následuje regrese vaskulatury (Výstup 16) a navození hypoxie bez adekvátní regrese tumoru, což klinicky vede k progresi onemocnění. Přehodnocení mechanismu účinku antiangiogenní terapie také poukazuje na to, že není možné jednoduše provádět translaci klinického efektu z metastatického onemocnění do adjuvantní polohy (Allegra et al., 2011; Ebos et al., 2009).

Současný koncept personalizované protinádorové léčby (vycházející z hematologického paradigma Bcr-Abl a imatinib) pracuje s odhalením aberací v maligních buňkách konkrétního jedince a tyto aberace se pak stávají cílem protinádorové terapie (Výstup 1). Nicméně plně maligně transformovaná maligní buňka nese několik aberací/mutací (Hanahan and Weinberg, 2011, 2000) a během léčby dochází k selekci buněčných subtypů rezistentních na terapii cílenou na jednu aberaci. Celkový výsledek cílení protinádorové léčby na jednotlivé aberace závisí na kontextu dalších abnormalit v dané buňce či klonální buněčné populaci (Výstup 12). Na druhou stranu epitelální nádorové buňky nejsou příliš autonomní a jejich přežívání a propagace v prostředí hostitelského organismu závisí na funkci a kontextu nádorového mikroprostředí.

Protinádorová terapie by tedy měla pracovat s komponentami nádorového stroma na lokální i systémové úrovni (imunomodulace, regulace angiogeneze) a spíše než na jeden cíl/jednu aberaci by měla být zaměřena na **více aberantních komponent** (maligních buněk a mikro- a makroprospědí tumoru) jak je tomu v případě kombinované metronomické léčby. Tento koncept se může uplatnit nejen při léčbě makroskopického onemocnění, ale také u časných stádií maligních onemocnění, kde se volí mezi toxickým adjuvantním režimem, který má za cíl zlikvidovat mikroskopická rezidua (diseminované případně lokální) onemocnění, nebo strategií sledování „watch and wait“ v případech, kde není prokázán benefit vysokodávkovaných MTD adjuvantních režimů nad nežádoucími účinky. Zde je na místě uvažovat o modulaci podmínek hostitelského organismu ve smyslu vytvoření prostředí, které bude imunokompetentnější (např. eliminací T-reg a MDSC) a nebude umožňovat propagaci/aktivaci dormantních nádorových buněk. Potlačení růstu nádoru nikoli přímým působením na maligní buňky, ale modulací vlastností organismu ve smyslu vytvoření **hostilních podmínek pro maligní buňky** považoval za zásadní již dr. Coley ve své práci s imunoterapií inoperabilních nádorů, kdy cituje dr. Ewinga: „..... *These remarkably delicate nutritional requirements of the cancer-cell suggest that some means may be found to render the human patient's tissue unfavourable for cancer growth.*“ doplňuje úvahou vycházející z vlastních poznatků „*And this is exactly what, in my opinion, the toxins do in sarcoma*“ (Coley, 1910).

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Nádorová tkáň se skládá z nádorových buněk a nádorového stroma.....	13
Obrázek 2 Vogelsteinův model vícestupňové kancerogeneze u sporadické formy kolorektální karcinomu ..	14
Obrázek 3: Deset základních vlastností maligní buňky.....	14
Obrázek 4: Onkogenní mutace genu KRAS.....	15
Obrázek 5: Signalizační kaskáda proteinu k-ras.....	16
Obrázek 6: Souhrnné výsledky analýzy genu KRAS v České republice v roce 2009.....	17
Obrázek 7: Deset základních znaků maligní buňky a deset systémových faktorů ovlivňující patogenezi a léčbu maligních onemocnění.....	19
Obrázek 8 Distribuce aktivity TPMT ve vztahu ke genotypu TPMT.....	22
Obrázek 9: Farmakogenetika deficience DPD v kontextu mendelovské dědičnosti.....	23
Obrázek 10: Hypovitaminóza D má v České republice sezonní variabilitu.....	25
Obrázek 11: Parametry přežití pacientů s metastatickým kolorektálním karcinomem podle charakteru sérových hladin 25-OH-D.....	26
Obrázek 12: Molekulární a buněčné mechanismy protinádorového efektu kalcitriolu.....	27
Obrázek 13: Věková závislost incidence dvou významných maligních onemocnění v České republice.....	28
Obrázek 14: Výskyt somatických mutací u jednotlivých typů malignit.....	29
Obrázek 15: Hlavní faktory spojující obezitu a rozvoj nádorových onemocnění.....	31
Obrázek 16: Expresce FcγRI/CD64 na leukocytech za fyziologických podmínek.....	40
Obrázek 17: ROC analýza markerů septického stavu.....	41
Obrázek 18: Základní procesy v adaptivní imunitní odpovědi.....	42
Obrázek 19: Antigenní stimulace T-lymfocytů: kontext rozpoznání a cross-prezentace.....	43
Obrázek 20: Nádorové antigeny mohou sloužit pro diagnostiku nádorových onemocnění.....	45
Obrázek 21: Nádorová imunoeditace - eliminace.....	48
Obrázek 22: Protilátky a cytotoxická reakce proti nádorovým buňkám.....	49
Obrázek 23: Aktivace death receptoru a iniciačních kaspáz.....	50
Obrázek 24: Model regulace aktivace efektorových kaspáz po ligaci death receptoru.....	51
Obrázek 25: Imunofenotyp NKT-like lymfocytů.....	52
Obrázek 26: Cirkulující CD3+CD56+ NKT-like buňky u pacientů s různými typy maligních onemocnění ve stádiu aktivního metastatického onemocnění a v remisi.....	52
Obrázek 27: Převažující subtyp γδ T-lymfocytů v periferní krvi dospělého člověka.....	54
Obrázek 28 Mechanizmy protinádorové imunitní odpovědi prostřednictvím γδ T-lymfocytů.....	55
Obrázek 29: Nádorová imunoeditace – rovnováha.....	56
Obrázek 30: Nádorová imunoeditace – únik.....	57
Obrázek 31: Imunofenotyp a morfolgie subtypů MDSC.....	58
Obrázek 32 Mechanizmy imunosupresivního a pronádorového působení MDSC.....	59
Obrázek 33: MDSC v periferní krvi pacientek s karcinomem prsu.....	59

Obrázek 34: Schéma vztahu nádorové progresi a MDSC.....	60
Obrázek 35: Schématické znázornění efektu Her-2 overexpresi a trastuzumabu na biologii nádorové buňky.	64
Obrázek 36: Inhibice MAPK a inhibice PI3K kinázové má rozdílný efekt na apoptózu navozenou TRAILem u buněk BT474.	65
Obrázek 37: Schéma přípravy personalizované protinádorové vakcíny z autologních dendritických buněk..	71
Obrázek 38: Základní imunobiologie protinádorové vakcíny z autologních dendritických buněk.	72
Obrázek 39: Maturační subsety T-lymfocytů.....	73
Obrázek 40: Ukázka dynamiky maturačních subsetů T-lymfocytů v kontextu podání protinádorové vakcíny na bázi dendritických buněk.	73
Obrázek 41: Základní kroky v nádorové angiogenezi.....	76
Obrázek 42: Hladina EPC u pacientů s kolorektálním karcinomem a kontrolní skupiny.	76
Obrázek 43: Klinický efekt léčby mCRC v první linii bevacizumabem a chemoterpií dle statutu genu KRAS. .	79
Obrázek 44: Výsledky multivariační Cox analýzy u pacientů s mCRC léčených v první linii bevacizumabem a chemoterpií.....	80
Obrázek 45: Objem nádorové masy a efekt inhibice nádorové vaskulatury.	82
Obrázek 46: Vztah mezi poměrem plazmatických hladin angiopoetinů a CEA.....	83
Obrázek 47: Vztah mezi hladinou zralých cirkulujících endoteliálních buněk a sérovou hladinou CEA.	84
Obrázek 48: Adheze a aktivace trombocytů s implikací pro efekt v mikroprostředí nádoru.	85
Obrázek 49: Hladiny VEGF v biologickém materiálu odvozeném z krve zásadně závisí na preanalytice/typu odběru.	86
Obrázek 50: Vliv obsahu trombocytů na migraci endoteliálních buněk.	87
Obrázek 51: Úloha destiček v nádorovém růstu a angiogenezi.....	88
Obrázek 52: Infiltrace jaterních metastáz kolorektálního karcinomu T-lymfocyty.....	89
Obrázek 53: Komponenty akutního a chronického zánětu v imunobiologii nádoru.	90
Obrázek 54: Progrese tumoru z hlediska lokálních a systémových zánětlivých procesů.....	91
Obrázek 55: Úloha trombocytárních chemokinů PF-4 a CTAP-III/NAP-2 při regulaci angiogeneze a nádorové progrese.....	92
Obrázek 56: Předpokládaná úloha imunoterapie v konverzi funkce imunitního systému směrem k efektivní eliminaci maligních buněk.	93
Obrázek 57: Efekt cílené protinádorové léčby vs imunoterapie.....	94
Obrázek 58: Racio konceptu metronomické protinádorové terapie.	96
Obrázek 59: Sumarizace jednotlivých kroků protinádorové imunity: cyklus nádorové imunity.	99
Obrázek 60: Počet publikací s tématem nádorového stroma ve vztahu ke klinickým parametrům za posledních 20 let.....	102

SEZNAM ZKRATEK

ADCC	<i>antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i>
ALL	akutní lymfoblastická leukémie
AML	akutní myeloidní leukémie
Ang	angiopoetin
APC	antigen prezentující buňka nebo adenomatous polyposis coli (závisí na kontextu)
ASCO	<i>American Society of Clinical Oncology</i>
ATMP	<i>advanced therapy medicinal products</i> , léčivé přípravky pro moderní terapii
ATRA	all-trans retinová kyselina
BCG	Bacillus Calmette–Guérin
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
bFGFR	<i>basic fibroblast growth factor receptor</i>
CAP	<i>College of American Pathologists</i>
CAPOX	kapecitabin/oxaliplatina
CAR, CARs	<i>chimeric antigen receptor</i>
CDC	<i>complement-dependent cytotoxicity</i>
CEA	<i>carcinoembryonic antigen</i> , karcinoembryonální antigen
CEC	cirkulující endoteliální buňka
CHMP	<i>Committee for Medicinal Products for Human Use</i>
CLL	chronický lymfocytární leukémie
CLIA	<i>Clinical Laboratory Improvement Amendments</i>
COMBAT	<i>Combined Oral Metronomic Biodifferentiating Antiangiogenic Treatment</i>
CRP	C-reaktivní protein
CTAP III	<i>connective tissue activating peptide III</i>
CTLs	<i>cytotoxic T-cells</i> , cytotoxické T-lymfocyty
CTLA-4	<i>cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>
ČLS JEP	Česká lékařská společnost Jana Evangelisty Purkyně
ČP	čisté protory
DAMP, DAMPs	<i>danger associated molecular patterns</i>
DB, DC	dendritická buňka
DCA	kyselina deoxycholová
DCC	<i>deleted in colorectal cancer</i>
DPD	dihydropyrimidin dehydrogenáza
DM	diabetes mellitus
EBV	virus Epstein-Barrové
ECM	extracelulární matrix
EGF	epidermální růstový faktor, <i>epidermal growth factor</i>
EGFR	receptor pro epidermální růstový faktor, <i>epidermal growth factor receptor</i>
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
EPC	prekurzory endoteliálních buněk
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FOLFIRI	leukovorin/fluorouracil/irinotekan
FOLFOX	leukovorin/fluorouracil/oxaliplatina

FU	fluorouracil
FUTP	fluoruridin trifosfát
GAP	<i>GTPase activating protein</i>
GEF	<i>guanine nucleotide exchange factor</i>
GM-CSF	granulocyty/makrofágy – kolonie stimulující faktor
G-CSF	granulocyty – kolonie stimulující faktor
GMP	<i>good manufacturing practice</i> , správná výrobní praxe
GDP	guanozin difosfát
GTP	guanozin trifosfát
HBV	virus hepatitidy C
HCC	hepatocelulární karcinom
HCV	virus hepatitidy C
HIF	<i>hypoxia inducible factor</i>
HHV	lidský herpesvirus
HPV	lidský papillomavirus
HS	heparan sulfát
HSP	<i>heat shock protein</i>
HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cells</i>
cht	chemoterapie
IBD	<i>inflammatory bowel disease</i> , zánětlivá střevní onemocnění
ICOS	<i>inducible costimulator</i>
IDO	indolamin 2,3-dioxygenáza
IFL	irinotekan/fluorouracil/leukovorin
IGF	<i>insulin-like growth factor</i>
IFN- γ	interferon gamma
IL	interleukin
IRI	irinotekan
iNOS	inducibilní syntáza oxidu dusnatého
LDM	<i>low-dose metronomic</i>
LMWH	nízkomolekulární hepariny
LP	léčivý přípravek
LPS	lipopolysacharid
mCEC	zralá cirkulující endoteliální buňka
mCRC	metastatický kolorektální karcinom
MALT	<i>mucosa associated lymphoid tissue</i>
MDSC	<i>myeloid-derived suppressor cells</i> , myeloidní supresorové buňky
MHC I	hlavní histokompatibilní komplex třídy I
MHC II	hlavní histokompatibilní komplex třídy II
MIC	<i>MHC-class I related chain</i> , např. MIC-A, MIC-B
MLR	<i>mixed lymphocyte reaction</i>
MMP	matrixová metaloproteináza
MTD	<i>maximum tolerated dose</i> , maximální tolerovaná dávka
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
NAP-2	<i>neutrophil activating peptide 2</i>
NCCN	<i>National Comprehensive Cancer Network</i>

NF	nukleární faktor
NHL	non-Hodgkinův lymfom
NKR	<i>natural killer receptor</i>
NSCLC	nemalobuněčný karcinom plic
OLM	Oddělení laboratorní medicíny
OS	<i>overall survival</i> , celkové přežití
OX	oxaliplatina
PAMP	<i>pathogen associated molecular patterns</i>
PAR	<i>protease activated receptor</i>
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PF-4	destičkový faktor 4
PHD2	<i>prolyl hydroxylase domain 2</i>
PRR	<i>pattern recognition receptors</i> , receptory rozeznávající molekulové vzory
PSA	prostatický specifický antigen
PFS	<i>progression-free survival</i> , přežití bez progresse
ROC	<i>receiver operating characteristic</i>
ROS	reaktivní kyslíkové radikály
S1P	<i>sphingosine-1-phosphate</i>
SCLC	malobuněčný karcinom plic
SDF	<i>stromal-cell derived factor</i>
SÚKL	Státní ústav pro kontrolu léčiv
SVP	<i>good manufacturing practice</i> , správná výrobní praxe
TDO	tryptofan 2,3-dioxygenáza
TF	tkáňový faktor
TIMP	<i>tissue inhibitors of metalloproteinases</i> , tkáňové inhibitory metaloproteináz
TK	tyrozinkinázy
TKI	inhibitory tyrozinkináz
TLR	<i>toll-like receptor</i> , typ PRR
TNF α	<i>tumor-necrosis factor alpha</i> , tumor nekrotizující faktor
TNFR	<i>tumor-necrosis factor receptor</i>
TPO	trombopoetin
TPMT	thiopurin metyltransferáza
TRAIL	<i>tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand</i>
ULBP	UL-16 binding proteins
UV	ultrafialové
VDR	vitamin D receptor
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i> , vaskulární endoteliální růstový faktor
VFU	Veterinární a farmaceutická univerzita
VHL	nádorový supresor von Hippel-Lindau
WT, wt	<i>wild-type</i>
XELOX	kapecitabin/oxaliplatina

REFERENCE

2011. in: Ross, A.C., Taylor, C.L., Yaktine, A.L., Del Valle, H.B. (Eds.), *Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D*, Washington (DC).
2012. Biovest initiates formal regulatory approval process for BiovaxID in Europe. *Human vaccines & immunotherapeutics*. 8, 1017.
- Abdel-Motal, U.M., Wigglesworth, K., Galili, U., 2009. Intratumoral injection of alpha-gal glycolipids induces a protective anti-tumor T cell response which overcomes Treg activity. *Cancer immunology, immunotherapy* : CII. 58, 1545-1556.
- Abdulghani, J., Allen, J.E., Dicker, D.T., Liu, Y.Y., Goldenberg, D., Smith, C.D., Humphreys, R., El-Deiry, W.S., 2013. Sorafenib sensitizes solid tumors to Apo2L/TRAIL and Apo2L/TRAIL receptor agonist antibodies by the Jak2-Stat3-Mcl1 axis. *PLoS one*. 8, e75414.
- Adam, J., Andres, P., Bolcak, K., Cermakova, M., Demlova, R., Dubska, L., Sedlackova, S., Valik, D., 2009. [New radiopharmaceuticals and positron-emission tomography applications at the Masaryk Memorial Cancer Institute in Brno]. *Klinicka onkologie : casopis Ceske a Slovenske onkologicke spolecnosti*. 22, 94-97.
- Adkins, I., Fucikova, J., Garg, A.D., Agostinis, P., Spisek, R., 2014. Physical modalities inducing immunogenic tumor cell death for cancer immunotherapy. *Oncoimmunology*. 3, e968434.
- Ahmad, S., Ansari, A.A., 2011. Therapeutic roles of heparin anticoagulants in cancer and related disorders. *Med Chem*. 7, 504-517.
- Ahmadian, M.R., Stege, P., Scheffzek, K., Wittinghofer, A., 1997. Confirmation of the arginine-finger hypothesis for the GAP-stimulated GTP-hydrolysis reaction of Ras. *Nat Struct Biol*. 4, 686-689.
- Al Omar, S.Y., Marshall, E., Middleton, D., Christmas, S.E., 2012. Increased numbers but functional defects of CD56+CD3+ cells in lung cancer. *Int Immunol*. 24, 409-415.
- Alexandrov, L.B., Nik-Zainal, S., Wedge, D.C., Aparicio, S.A., Behjati, S., Biankin, A.V., Bignell, G.R., Bolli, N., Borg, A., Borresen-Dale, A.L., Boyault, S., Burkhardt, B., Butler, A.P., Caldas, C., Davies, H.R., Desmedt, C., Eils, R., Eyfjord, J.E., Foekens, J.A., Greaves, M., Hosoda, F., Hutter, B., Ilicic, T., Imbeaud, S., Imielinski, M., Jager, N., Jones, D.T., Jones, D., Knappskog, S., Kool, M., Lakhani, S.R., Lopez-Otin, C., Martin, S., Munshi, N.C., Nakamura, H., Northcott, P.A., Pajic, M., Papaemmanuil, E., Paradiso, A., Pearson, J.V., Puente, X.S., Raine, K., Ramakrishna, M., Richardson, A.L., Richter, J., Rosenstiel, P., Schlesner, M., Schumacher, T.N., Span, P.N., Teague, J.W., Totoki, Y., Tutt, A.N., Valdes-Mas, R., van Buuren, M.M., van 't Veer, L., Vincent-Salomon, A., Waddell, N., Yates, L.R., Zucman-Rossi, J., Futreal, P.A., McDermott, U., Lichter, P., Meyerson, M., Grimmond, S.M., Siebert, R., Campo, E., Shibata, T., Pfister, S.M., Campbell, P.J., Stratton, M.R., 2013. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature*. 500, 415-421.
- Aliper, A.M., Frieden-Korovkina, V.P., Buzdin, A., Roumiantsev, S.A., Zhavoronkov, A., 2014. A role for G-CSF and GM-CSF in nonmyeloid cancers. *Cancer medicine*. 3, 737-746.
- Allegra, C.J., Jessup, J.M., Somerfield, M.R., Hamilton, S.R., Hammond, E.H., Hayes, D.F., McAllister, P.K., Morton, R.F., Schilsky, R.L., 2009. American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion: testing for KRAS gene mutations in patients with metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 27, 2091-2096.
- Allegra, C.J., Yothers, G., O'Connell, M.J., Sharif, S., Petrelli, N.J., Colangelo, L.H., Atkins, J.N., Seay, T.E., Fehrenbacher, L., Goldberg, R.M., O'Reilly, S., Chu, L., Azar, C.A., Lopa, S., Wolmark, N., 2011. Phase III trial assessing bevacizumab in stages II and III carcinoma of the colon: results of NSABP protocol C-08. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 29, 11-16.
- Allen, J.R., 1973. Tick resistance: basophils in skin reactions of resistant guinea pigs. *Int. J. Parasitol*. 3, 195-200.
- Ammendola, M., Leporini, C., Luposella, M., Sacco, R., Sammarco, G., Russo, E., Patruno, R., De Sarro, G., Ranieri, G., 2015. Targeting endothelial progenitor cells in cancer as a novel biomarker and anti-angiogenic therapy. *Current stem cell research & therapy*. 10, 181-187.
- Amstutz, U., Froehlich, T.K., Largiader, C.R., 2011. Dihydropyrimidine dehydrogenase gene as a major predictor of severe 5-fluorouracil toxicity. *Pharmacogenomics*. 12, 1321-1336.
- Andreotti, R., Perez de Leon, A.A., Dowd, S.E., Guerrero, F.D., Bendele, K.G., Scoles, G.A., 2011. Assessment of bacterial diversity in the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* through tag-encoded pyrosequencing. *BMC Microbiol*. 11, 6.
- Andrews, R.K., Berndt, M.C., 2004. Platelet physiology and thrombosis. *Thrombosis research*. 114, 447-453.
- Angell, H., Galon, J., 2013. From the immune contexture to the Immunoscore: the role of prognostic and predictive immune markers in cancer. *Curr Opin Immunol*. 25, 261-267.

- Anguille, S., Smits, E.L., Lion, E., van Tendeloo, V.F., Berneman, Z.N., 2014. Clinical use of dendritic cells for cancer therapy. *The Lancet. Oncology.* 15, e257-267.
- Anisimov, V.N., 1983. Carcinogenesis and aging. *Adv Cancer Res.* 40, 365-424.
- Ascierto, P.A., Capone, M., Urba, W.J., Bifulco, C.B., Botti, G., Lugli, A., Marincola, F.M., Ciliberto, G., Galon, J., Fox, B.A., 2013. The additional facet of immunoscore: immunoprofiling as a possible predictive tool for cancer treatment. *Journal of translational medicine.* 11, 54.
- Ascierto, P.A., Simeone, E., Sileni, V.C., Pigozzo, J., Maio, M., Altomonte, M., Del Vecchio, M., Di Guardo, L., Marchetti, P., Ridolfi, R., Cognetti, F., Testori, A., Bernengo, M.G., Guida, M., Marconcini, R., Mandala, M., Cimminiello, C., Rinaldi, G., Aglietta, M., Queirolo, P., 2014. Clinical experience with ipilimumab 3 mg/kg: real-world efficacy and safety data from an expanded access programme cohort. *Journal of translational medicine.* 12, 116.
- Asking, J., Dickman, P.W., Karlen, P., Brostrom, O., Lapidus, A., Lofberg, R., Ekbo, A., 2001a. Colorectal cancer rates among first-degree relatives of patients with inflammatory bowel disease: a population-based cohort study. *Lancet.* 357, 262-266.
- Asking, J., Dickman, P.W., Karlen, P., Brostrom, O., Lapidus, A., Lofberg, R., Ekbo, A., 2001b. Family history as a risk factor for colorectal cancer in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 120, 1356-1362.
- Azijli, K., Weyhenmeyer, B., Peters, G.J., de Jong, S., Kruyt, F.A., 2013. Non-canonical kinase signaling by the death ligand TRAIL in cancer cells: discord in the death receptor family. *Cell Death Differ.* 20, 858-868.
- Bacikova, L., 2010. Laboratorní parametry septických stavů u dospělých a dětských onkologických pacientů. Bakalářská práce. Bc.
- Bacikova, L., 2015. Algoritmy flowcytometrických vyšetření v hematologii a imunologii. Diplomová práce. Mgr.
- Backhed, F., Ley, R.E., Sonnenburg, J.L., Peterson, D.A., Gordon, J.I., 2005. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science.* 307, 1915-1920.
- Bajzer, M., Seeley, R.J., 2006. Physiology: obesity and gut flora. *Nature.* 444, 1009-1010.
- Bakhshi, S., Low Dose Chemotherapy Versus Best Supportive Care in Progressive Pediatric Malignancies - NCT01858571.
- Balducci, L., Ershler, W.B., 2005. Cancer and ageing: a nexus at several levels. *Nature reviews. Cancer.* 5, 655-662.
- Ball, Z.B., Barnes, R.H., Visscher, M.B., 1947. The effects of dietary caloric restriction on maturity and senescence, with particular reference to fertility and longevity. *Am J Physiol.* 150, 511-519.
- Baluk, P., Hashizume, H., McDonald, D.M., 2005. Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 15, 102-111.
- Bandera, E.V., Maskarinec, G., Romieu, I., John, E.M., 2015. Racial and Ethnic Disparities in the Impact of Obesity on Breast Cancer Risk and Survival: A Global Perspective. *Adv Nutr.* 6, 803-819.
- Banissi, C., Ghiringhelli, F., Chen, L., Carpentier, A.F., 2009. Treg depletion with a low-dose metronomic temozolomide regimen in a rat glioma model. *Cancer immunology, immunotherapy : CII.* 58, 1627-1634.
- Banks, A.S., Davis, S.M., Bates, S.H., Myers, M.G., Jr., 2000. Activation of downstream signals by the long form of the leptin receptor. *J. Biol. Chem.* 275, 14563-14572.
- Barman, M., Unold, D., Shifley, K., Amir, E., Hung, K., Bos, N., Salzman, N., 2008. Enteric salmonellosis disrupts the microbial ecology of the murine gastrointestinal tract. *Infect Immun.* 76, 907-915.
- Bashir, A., Miskeen, A.Y., Bhat, A., Fazili, K.M., Ganai, B.A., 2015. *Fusobacterium nucleatum*: an emerging bug in colorectal tumorigenesis. *Eur J Cancer Prev.*
- Batchelor, T.T., Duda, D.G., di Tomaso, E., Ancukiewicz, M., Plotkin, S.R., Gerstner, E., Eichler, A.F., Drappatz, J., Hochberg, F.H., Benner, T., Louis, D.N., Cohen, K.S., Chea, H., Exarhopoulos, A., Loeffler, J.S., Moses, M.A., Ivy, P., Sorensen, A.G., Wen, P.Y., Jain, R.K., 2010. Phase II study of cediranib, an oral pan-vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with recurrent glioblastoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 28, 2817-2823.
- Becker, S., Bohn, P., Bouyeure-Petit, A.C., Modzelewski, R., Gensanne, D., Picquenot, J.M., Dubray, B., Vera, P., 2015. Bevacizumab enhances efficiency of radiotherapy in a lung adenocarcinoma rodent model: Role of alphavbeta3 imaging in determining optimal window. *Nuclear medicine and biology.* 42, 923-930.
- Begley, S., 2012. Exclusive: Questionable data propped up cancer drug Provenge.
- Belcheva, A., Irrazabal, T., Martin, A., 2015. Gut microbial metabolism and colon cancer: Can manipulations of the microbiota be useful in the management of gastrointestinal health? *Bioessays.* 37, 403-412.

- Bell, J.F., Stewart, S.J., Wikel, S.K., 1979. Resistance to tick-borne *Francisella tularensis* by tick-sensitized rabbits: allergic klendusity. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 28, 876-880.
- Bencsikova, B., Bortlicek, Z., Halamkova, J., Ostrizkova, L., Kiss, I., Melichar, B., Pavlik, T., Dusek, L., Valik, D., Vyzula, R., Zdrzilova-Dubska, L., 2015. Efficacy of bevacizumab and chemotherapy in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer: broadening KRAS-focused clinical view. *BMC gastroenterology.* 15, 37.
- Bencsikova, B., Greplova, K., Pilatova, K., Volejnikova, Z., Valik, D., Klement, G.L., Zdrzilova-Dubska, L., 2014. [Platelets in the pathogenesis of solid tumors]. *Casopis lekaru ceskych.* 153, 78-85.
- Bergers, G., Hanahan, D., 2008. Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nature reviews. Cancer.* 8, 592-603.
- Bergers, G., Song, S., Meyer-Morse, N., Bergsland, E., Hanahan, D., 2003. Benefits of targeting both pericytes and endothelial cells in the tumor vasculature with kinase inhibitors. *The Journal of clinical investigation.* 111, 1287-1295.
- Bernards, A., Settleman, J., 2007. GEFs in growth factor signaling. *Growth Factors.* 25, 355-361.
- Blaha, H., Dierkesmann, R., Feuerer, W., Gatzemaier, U., Geser, C., Lemme, J., Mall, W., Ritscher, R., Schneider, B., Vallee, D., 1989. [Adjuvant therapy of non-small cell bronchial cancer with mopidamol]. *Pneumologie.* 43, 299-304.
- Bocci, G., Francia, G., Man, S., Lawler, J., Kerbel, R.S., 2003. Thrombospondin 1, a mediator of the antiangiogenic effects of low-dose metronomic chemotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100, 12917-12922.
- Bode, A.M., Dong, Z., 2000. Signal transduction pathways: targets for chemoprevention of skin cancer. *The Lancet. Oncology.* 1, 181-188.
- Bogdan, C., 2015. Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: an update. *Trends Immunol.* 36, 161-178.
- Bokemeyer, C., Bondarenko, I., Hartmann, J.T., de Braud, F., Schuch, G., Zubel, A., Celik, I., Schlichting, M., Koralewski, P., 2011. Efficacy according to biomarker status of cetuximab plus FOLFOX-4 as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the OPUS study. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO.* 22, 1535-1546.
- Boursi, B., Haynes, K., Mamtani, R., Yang, Y.X., 2015. Impact of antibiotic exposure on the risk of colorectal cancer. *Pharmacoepidemiol Drug Saf.*
- Bowen, D.G., Walker, C.M., 2005. Adaptive immune responses in acute and chronic hepatitis C virus infection. *Nature.* 436, 946-952.
- Brandau, S., Moses, K., Lang, S., 2013. The kinship of neutrophils and granulocytic myeloid-derived suppressor cells in cancer: cousins, siblings or twins? *Semin Cancer Biol.* 23, 171-182.
- Bromberg, J.F., Wrzeszczynska, M.H., Devgan, G., Zhao, Y., Pestell, R.G., Albanese, C., Darnell, J.E., Jr., 1999. Stat3 as an oncogene. *Cell.* 98, 295-303.
- Bronisova, D., Mudry, P., Sterba, J., Bajciová, V., Valik, D., Dubska, L., Mazanek, P., Lokaj, P., Zitterbart, K., 2009. Metronomická léčba v onkologii jako nová léčebná metoda. *Onkologie.* 3, 3.
- Browder, T., Butterfield, C.E., Kraling, B.M., Shi, B., Marshall, B., O'Reilly, M.S., Folkman, J., 2000a. Antiangiogenic scheduling of chemotherapy improves efficacy against experimental drug-resistant cancer. *Cancer Res.* 60, 1878-1886.
- Browder, T., Folkman, J., Pirie-Shepherd, S., 2000b. The hemostatic system as a regulator of angiogenesis. *J. Biol. Chem.* 275, 1521-1524.
- Brown, S.J., 1988. Characterization of tick antigens inducing host immune resistance. II. Description of rabbit-acquired immunity to *Amblyomma americanum* ticks and identification of potential tick antigens by Western blot analysis. *Vet. Parasitol.* 28, 245-259.
- Brudvik, K.W., Henjum, K., Aandahl, E.M., Bjornbeth, B.A., Tasken, K., 2012. Regulatory T-cell-mediated inhibition of antitumor immune responses is associated with clinical outcome in patients with liver metastasis from colorectal cancer. *Cancer immunology, immunotherapy : CII.* 61, 1045-1053.
- Brugger, W., 2010. Successful treatment with the fully human antibody panitumumab after a severe infusion reaction with cetuximab. *Tumori.* 96, 473-477.
- Bub, J.D., Miyazaki, T., Iwamoto, Y., 2006. Adiponectin as a growth inhibitor in prostate cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 340, 1158-1166.
- Burgdorf, S., Kurts, C., 2008. Endocytosis mechanisms and the cell biology of antigen presentation. *Curr Opin Immunol.* 20, 89-95.
- Burnet, F.M., 1970. The concept of immunological surveillance. *Progress in experimental tumor research.* 13, 1-27.
- Burnet, M., 1957. Cancer: a biological approach. III. Viruses associated with neoplastic conditions. IV. Practical applications. *Br. Med. J.* 1, 841-847.

- Bush, W., 1866. Über den Einfluss welche heftigere Erysipeln zuweilig auf organisierte Neubildungen ausüben. *Verhandlungen des Naturhistorischen Vereines der Preussischen Rheinlande und Westphalens.* 23, 3.
- Calle, E.E., Kaaks, R., 2004. Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nature reviews. Cancer.* 4, 579-591.
- Calle, E.E., Rodriguez, C., Walker-Thurmond, K., Thun, M.J., 2003. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *The New England journal of medicine.* 348, 1625-1638.
- Campisi, J., 2000. Cancer, aging and cellular senescence. *In Vivo.* 14, 183-188.
- Campisi, J., 2005. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell.* 120, 513-522.
- Cantorna, M.T., 2011. Why do T cells express the vitamin D receptor? *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1217, 77-82.
- Cantorna, M.T., Mahon, B.D., 2004. Mounting evidence for vitamin D as an environmental factor affecting autoimmune disease prevalence. *Exp Biol Med (Maywood).* 229, 1136-1142.
- Carbone, A., Ghoghini, A., Dotti, G., 2008. EBV-associated lymphoproliferative disorders: classification and treatment. *Oncologist.* 13, 577-585.
- Cardoso, F., Piccart, M.J., Durbecq, V., Di Leo, A., 2002. Resistance to trastuzumab: a necessary evil or a temporary challenge? *Clinical breast cancer.* 3, 247-257; discussion 258-249.
- Carmeliet, P., Jain, R.K., 2011. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature.* 473, 298-307.
- Carrasco, Y.R., Fleire, S.J., Cameron, T., Dustin, M.L., Batista, F.D., 2004. LFA-1/ICAM-1 interaction lowers the threshold of B cell activation by facilitating B cell adhesion and synapse formation. *Immunity.* 20, 589-599.
- Carson, W.E., Parihar, R., Lindemann, M.J., Personeni, N., Dierksheide, J., Meropol, N.J., Baselga, J., Caligiuri, M.A., 2001. Interleukin-2 enhances the natural killer cell response to Herceptin-coated Her2/neu-positive breast cancer cells. *Eur J Immunol.* 31, 3016-3025.
- Carta, C., Pantaleoni, F., Bocchinfuso, G., Stella, L., Vasta, I., Sarkozy, A., Digilio, C., Palleschi, A., Pizzuti, A., Grammatico, P., Zampino, G., Dallapiccola, B., Gelb, B.D., Tartaglia, M., 2006. Germline missense mutations affecting KRAS Isoform B are associated with a severe Noonan syndrome phenotype. *Am J Hum Genet.* 79, 129-135.
- Carter, W.B., Uy, K., Ward, M.D., Hoying, J.B., 2000. Parathyroid-induced angiogenesis is VEGF-dependent. *Surgery.* 128, 458-464.
- Caserta, D., Maranghi, L., Mantovani, A., Marci, R., Maranghi, F., Moscarini, M., 2008. Impact of endocrine disruptor chemicals in gynaecology. *Hum Reprod Update.* 14, 59-72.
- Casetti, R., Agrati, C., Wallace, M., Sacchi, A., Martini, F., Martino, A., Rinaldi, A., Malkovsky, M., 2009. Cutting edge: TGF-beta1 and IL-15 Induce FOXP3+ gammadelta regulatory T cells in the presence of antigen stimulation. *J Immunol.* 183, 3574-3577.
- Castellarin, M., Warren, R.L., Freeman, J.D., Dreolini, L., Krzywinski, M., Strauss, J., Barnes, R., Watson, P., Allen-Vercoe, E., Moore, R.A., Holt, R.A., 2012. *Fusobacterium nucleatum* infection is prevalent in human colorectal carcinoma. *Genome Res.* 22, 299-306.
- Castle, V.P., Ou, X., O'Shea, S., Dixit, V.M., 1992. Induction of thrombospondin 1 by retinoic acid is important during differentiation of neuroblastoma cells. *The Journal of clinical investigation.* 90, 1857-1863.
- Caudle, K.E., Thorn, C.F., Klein, T.E., Swen, J.J., McLeod, H.L., Diasio, R.B., Schwab, M., 2013. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium guidelines for dihydropyrimidine dehydrogenase genotype and fluoropyrimidine dosing. *Clinical pharmacology and therapeutics.* 94, 640-645.
- Cibulka, M., Selingerova, I., Fedorova, L., Dubska, L.Z., 2015. [Immunological Aspects in Oncology--Circulating gammadelta T Cells]. *Klinicka onkologie : casopis Ceske a Slovenske onkologicke spolecnosti.* 28 Suppl 2, 2560-68.
- Cohen, S.A., Trikha, M., Mascelli, M.A., 2000. Potential future clinical applications for the GPIIb/IIIa antagonist, abciximab in thrombosis, vascular and oncological indications. *Pathology oncology research : POR.* 6, 163-174.
- Coley, W.B., 1891. II. Contribution to the Knowledge of Sarcoma. *Annals of surgery.* 14, 199-220.
- Coley, W.B., 1910. The Treatment of Inoperable Sarcoma by Bacterial Toxins (the Mixed Toxins of the *Streptococcus erysipelas* and the *Bacillus prodigiosus*). *Proceedings of the Royal Society of Medicine.* 3, 1-48.
- Coley, W.B., 1928. End Results in Hodgkin's Disease and Lymphosarcoma Treated by the Mixed Toxins of *Erysipelas* and *Bacillus Prodigiosus*, Alone or Combined with Radiation. *Annals of surgery.* 88, 641-667.
- Coley, W.B., 1991. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of *erysipelas*. With a report of ten original cases. 1893. *Clin Orthop Relat Res.* 3-11.

- Collins, S.M., 2014. A role for the gut microbiota in IBS. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*. 11, 497-505.
- Commins, S.P., James, H.R., Kelly, L.A., Pochan, S.L., Workman, L.J., Perzanowski, M.S., Kocan, K.M., Fahy, J.V., Nganga, L.W., Ronmark, E., Cooper, P.J., Platts-Mills, T.A., 2011. The relevance of tick bites to the production of IgE antibodies to the mammalian oligosaccharide galactose- α -1,3-galactose. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 127, 1286-1293 e1286.
- Conrad, D.H., Gibb, D.R., Sturgill, J., 2010. Regulation of the IgE response. *F1000 biology reports*. 2.
- Coquet, J.M., Skak, K., Davis, I.D., Smyth, M.J., Godfrey, D.I., 2013. IL-21 Modulates Activation of NKT Cells in Patients with Stage IV Malignant Melanoma. *Clinical & translational immunology*. 2, e6.
- Cornelissen, R., Hegmans, J.P., Maat, A.P., Kaijen-Lambers, M.E., Bezemer, K., Hendriks, R.W., Hoogsteden, H.C., Aerts, J.G., 2015. Extended Tumor Control After Dendritic Cell Vaccination With Low Dose Cyclophosphamide as Adjuvant Treatment in Patients With Malignant Pleural Mesothelioma. *Am J Respir Crit Care Med*.
- Corthay, A., 2009. How do regulatory T cells work? *Scand. J. Immunol*. 70, 326-336.
- Coutelle, O., Schiffmann, L.M., Liwischitz, M., Brunold, M., Goede, V., Hallek, M., Kashkar, H., Hacker, U.T., 2015. Dual targeting of Angiopoietin-2 and VEGF potentiates effective vascular normalisation without inducing empty basement membrane sleeves in xenograft tumours. *Br J Cancer*. 112, 495-503.
- Creagan, E.T., Twito, D.I., Johansson, S.L., Schaid, D.J., Johnson, P.S., Flaum, M.A., Buroker, T.R., Geeraerts, L.H., Veeder, M.H., Gesme, D.H., Jr., et al., 1991. A randomized prospective assessment of recombinant leukocyte A human interferon with or without aspirin in advanced renal adenocarcinoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 9, 2104-2109.
- Cuenca, A., Cheng, F., Wang, H., Brayer, J., Horna, P., Gu, L., Bien, H., Borrello, I.M., Levitsky, H.I., Sotomayor, E.M., 2003. Extra-lymphatic solid tumor growth is not immunologically ignored and results in early induction of antigen-specific T-cell anergy: dominant role of cross-tolerance to tumor antigens. *Cancer Res*. 63, 9007-9015.
- Cullen, S.P., Martin, S.J., 2015. Fas and TRAIL 'death receptors' as initiators of inflammation: Implications for cancer. *Semin. Cell Dev. Biol*. 39, 26-34.
- Curiel, T.J., Coukos, G., Zou, L., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P., Evdemon-Hogan, M., Conejo-Garcia, J.R., Zhang, L., Burow, M., Zhu, Y., Wei, S., Kryczek, I., Daniel, B., Gordon, A., Myers, L., Lackner, A., Disis, M.L., Knutson, K.L., Chen, L., Zou, W., 2004. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med*. 10, 942-949.
- Curley, S.A., Cusack, J.C., Jr., Tanabe, K.K., Stoelzing, O., Ellis, L.M., 2002. Advances in the treatment of liver tumors. *Current problems in surgery*. 39, 449-571.
- Dalessandri, T., Strid, J., 2014. Beneficial autoimmunity at body surfaces - immune surveillance and rapid type 2 immunity regulate tissue homeostasis and cancer. *Frontiers in immunology*. 5, 347.
- Das, H., Groh, V., Kuijl, C., Sugita, M., Morita, C.T., Spies, T., Bukowski, J.F., 2001. MICA engagement by human V γ 2V δ 2 T cells enhances their antigen-dependent effector function. *Immunity*. 15, 83-93.
- Daud, A., 2015. Current and Emerging Perspectives on Immunotherapy for Melanoma. *Semin Oncol*. 42 Suppl 3, S3-S11.
- Davis, B.H., Bigelow, N.C., 2005. Comparison of neutrophil CD64 expression, manual myeloid immaturity counts, and automated hematology analyzer flags as indicators of infection or sepsis. *Laboratory hematology : official publication of the International Society for Laboratory Hematology*. 11, 137-147.
- Davis, B.H., Olsen, S.H., Ahmad, E., Bigelow, N.C., 2006. Neutrophil CD64 is an improved indicator of infection or sepsis in emergency department patients. *Arch Pathol Lab Med*. 130, 654-661.
- de la Puente, P., Muz, B., Azab, F., Azab, A.K., 2013. Cell trafficking of endothelial progenitor cells in tumor progression. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 19, 3360-3368.
- De Roock, W., Piessevaux, H., De Schutter, J., Janssens, M., De Hertogh, G., Personeni, N., Biesmans, B., Van Laethem, J.L., Peeters, M., Humblet, Y., Van Cutsem, E., Tejpar, S., 2008. KRAS wild-type state predicts survival and is associated to early radiological response in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 19, 508-515.
- De Wolf, K., Vermaelen, K., De Meerleer, G., Lambrecht, B.N., Ost, P., 2015. The potential of radiotherapy to enhance the efficacy of renal cell carcinoma therapy. *Oncoimmunology*. 4, e1042198.
- Deenen, M.J., Meulendijks, D., Cats, A., Sechterberger, M.K., Severens, J.L., Boot, H., Smits, P.H., Rosing, H., Mandigers, C.M., Soesan, M., Beijnen, J.H., Schellens, J.H., 2016. Upfront Genotyping of DPYD*2A to Individualize Fluoropyrimidine Therapy: A Safety and Cost Analysis. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 34, 227-234.
- Del Monte, U., 2009. Does the cell number 10(9) still really fit one gram of tumor tissue? *Cell Cycle*. 8, 505-506.

- Demark-Wahnefried, W., Platz, E.A., Ligibel, J.A., Blair, C.K., Courneya, K.S., Meyerhardt, J.A., Ganz, P.A., Rock, C.L., Schmitz, K.H., Wadden, T., Philip, E.J., Wolfe, B., Gapstur, S.M., Ballard-Barbash, R., McTiernan, A., Minasian, L., Nebeling, L., Goodwin, P.J., 2012. The role of obesity in cancer survival and recurrence. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology.* 21, 1244-1259.
- Demlova, R., Mrkvicova, M., Sterba, J., Bernatikova, H., Stary, J., Sukova, M., Mikuskova, A., Chocholova, A., Mladosevicova, B., Soltysova, A., Behulova, D., Pilatova, K., Zdrzilova-Dubská, L., Valik, D., 2014. Augmenting clinical interpretability of thiopurine methyltransferase laboratory evaluation. *Oncology.* 86, 152-158.
- Deng, L., Zhang, H., Luan, Y., Zhang, J., Xing, Q., Dong, S., Wu, X., Liu, M., Wang, S., 2010. Accumulation of foxp3+ T regulatory cells in draining lymph nodes correlates with disease progression and immune suppression in colorectal cancer patients. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 16, 4105-4112.
- DePinho, R.A., 2000. The age of cancer. *Nature.* 408, 248-254.
- Dewitte, A., Tanga, A., Villeneuve, J., Lepreux, S., Ouattara, A., Desmouliere, A., Combe, C., Ripoche, J., 2015. New frontiers for platelet CD154. *Experimental hematology & oncology.* 4, 6.
- Di Fiore, F., Blanchard, F., Charbonnier, F., Le Pessot, F., Lamy, A., Galais, M.P., Bastit, L., Killian, A., Sesboue, R., Tuech, J.J., Queuniet, A.M., Paillot, B., Sabourin, J.C., Michot, F., Michel, P., Frebourg, T., 2007. Clinical relevance of KRAS mutation detection in metastatic colorectal cancer treated by Cetuximab plus chemotherapy. *Br J Cancer.* 96, 1166-1169.
- Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J.P., Giudice, L.C., Hauser, R., Prins, G.S., Soto, A.M., Zoeller, R.T., Gore, A.C., 2009. Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocr Rev.* 30, 293-342.
- Diaz-Rubio, E., Gomez-Espana, A., Massuti, B., Sastre, J., Reboredo, M., Manzano, J.L., Rivera, F., Safont, M.J., Montagut, C., Gonzalez, E., Benavides, M., Marcuello, E., Cervantes, A., Martinez de Prado, P., Fernandez-Martos, C., Arrivi, A., Bando, I., Aranda, E., 2012. Role of Kras status in patients with metastatic colorectal cancer receiving first-line chemotherapy plus bevacizumab: a TTD group cooperative study. *PLoS one.* 7, e47345.
- Doherty, D.G., O'Farrelly, C., 2000. Innate and adaptive lymphoid cells in the human liver. *Immunol Rev.* 174, 5-20.
- Dolejska, M., Brhelova, E., Dobiasova, H., Krivdova, J., Jurankova, J., Sevcikova, A., Dubská, L., Literak, I., Cizek, A., Vavrina, M., Kutnikova, L., Sterba, J., 2012. Dissemination of IncFII(K)-type plasmids in multiresistant CTX-M-15-producing Enterobacteriaceae isolates from children in hospital paediatric oncology wards. *Int J Antimicrob Agents.* 40, 510-515.
- Doll, R., Peto, R., 1981. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J. Natl. Cancer Inst.* 66, 1191-1308.
- Doloff, J.C., Waxman, D.J., 2012. VEGF receptor inhibitors block the ability of metronomically dosed cyclophosphamide to activate innate immunity-induced tumor regression. *Cancer Res.* 72, 1103-1115.
- Donato, F., Boffetta, P., Puoti, M., 1998. A meta-analysis of epidemiological studies on the combined effect of hepatitis B and C virus infections in causing hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer.* 75, 347-354.
- Drabova, K., Bienertova-Vasku, J., Lokaj, P., Dubská, L., Obermannova, R., Greplova, K., Demlova, R., Valik, D., Sterba, J., 2013. [Vitamin D: Its physiology, pathophysiology and significance in etiopathogenesis of malignant diseases]. *Casopis lekaru ceskych.* 152, 20-30.
- Draube, A., Klein-Gonzalez, N., Mattheus, S., Brilliant, C., Hellmich, M., Engert, A., von Bergwelt-Baildon, M., 2011. Dendritic cell based tumor vaccination in prostate and renal cell cancer: a systematic review and meta-analysis. *PLoS one.* 6, e18801.
- Drosopoulos, K.G., Roberts, M.L., Cermak, L., Sasazuki, T., Shirasawa, S., Andera, L., Pintzas, A., 2005. Transformation by oncogenic RAS sensitizes human colon cells to TRAIL-induced apoptosis by up-regulating death receptor 4 and death receptor 5 through a MEK-dependent pathway. *J Biol Chem.* 280, 22856-22867.
- Dubská, L., Andera, L., Sheard, M.A., 2005. HER2 signaling downregulation by trastuzumab and suppression of the PI3K/Akt pathway: an unexpected effect on TRAIL-induced apoptosis. *FEBS Lett.* 579, 4149-4158.
- Dubská, L., Bacikova, L., Vyskocilova, M., Jelinek, P., Valik, D., 2009a. Monitorování infekčních a septických stavů u nemocných se solidní malignitou. *Alergie.* 4, 5.
- Dubská, L., Literak, I., Kocianova, E., Taragelova, V., Sverakova, V., Sychra, O., Hromadko, M., 2011a. Synanthropic birds influence the distribution of Borrelia species: analysis of Ixodes ricinus ticks feeding on passerine birds. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 1115-1117.

Dubska, L., Literak, I., Kocianova, E., Taragelova, V., Sychra, O., 2009b. Differential role of passerine birds in distribution of *Borrelia spirochetes*, based on data from ticks collected from birds during the postbreeding migration period in Central Europe. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 596-602.

Dubska, L., Literak, I., Kverek, P., Roubalova, E., Kocianova, E., Taragelova, V., 2012a. Tick-borne zoonotic pathogens in ticks feeding on the common nightingale including a novel strain of *Rickettsia* sp. *Ticks Tick Borne Dis.* 3, 265-268.

Dubska, L., Matalova, E., Misek, I., 2002. Detection of apoptosis in paraffin embedded tissues: the influence of tissue type and fixation. *Acta Vet Brno.* 71, 529-533.

Dubska, L., Pilatova, K., Dolejska, M., Bortlicek, Z., Frostova, T., Literak, I., Valik, D., 2011b. Surface-enhanced laser desorption ionization/time-of-flight (SELDI-TOF) mass spectrometry (MS) as a phenotypic method for rapid identification of antibiotic resistance. *Anaerobe.* 17, 444-447.

Dubska, L., Vyskocilova, M., Minarikova, D., Jelinek, P., Tejkalova, R., Valik, D., 2012b. LightCycler SeptiFast technology in patients with solid malignancies: clinical utility for rapid etiologic diagnosis of sepsis. *Crit Care.* 16, 404.

Dubska, L., Vyskocilova, M., Nenutil, R., Valik, D., Knoflickova, D., Fabian, P., Kocakova, I., Demlova, R., Beranek, M., Drastikova, M., Vosmikova, H., Boday, A., Horka, K., Simova, J., Drabek, J., Ehrmann, J., Hajduch, M., Matejckova, M., Sima, R., Tvrdik, D., Povysil, C., Ryska, A., 2011c. [KRAS mutation testing in therapeutic algorithm for treatment of metastatic colorectal carcinoma]. *Casopis lekaru ceskych.* 150, 321-326.

Dulal, S., Keku, T.O., 2014. Gut microbiome and colorectal adenomas. *Cancer J.* 20, 225-231.

Dunne, J., Lynch, S., O'Farrelly, C., Todryk, S., Hegarty, J.E., Feighery, C., Doherty, D.G., 2001. Selective expansion and partial activation of human NK cells and NK receptor-positive T cells by IL-2 and IL-15. *J Immunol.* 167, 3129-3138.

Dunne, M.R., Mangan, B.A., Madrigal-Estebas, L., Doherty, D.G., 2010. Preferential Th1 cytokine profile of phosphoantigen-stimulated human Vgamma9Vdelta2 T cells. *Mediators of inflammation.* 2010, 704941.

Dusek, L., Muzik, J., Kubasek, M., Koptikova, J., Zaloudik, J., Vyzula, R., 2005. Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice [online].

Dustin, M.L., Rothlein, R., Bhan, A.K., Dinarello, C.A., Springer, T.A., 1986. Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J Immunol.* 137, 245-254.

DUŠEK, L., MUŽÍK Jan, KUBÁSEK Miroslav, KOPTÍKOVÁ Jana, ŽALOUĐÍK Jan, Rostislav, V., Verze 7.0 [2007]. Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice [online]. 2015.

Dvorak, H.F., 1986. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *The New England journal of medicine.* 315, 1650-1659.

Dzutsev, A., Goldszmid, R.S., Viaud, S., Zitvogel, L., Trinchieri, G., 2015. The role of the microbiota in inflammation, carcinogenesis, and cancer therapy. *Eur. J. Immunol.* 45, 17-31.

Ebos, J.M., Lee, C.R., Cruz-Munoz, W., Bjarnason, G.A., Christensen, J.G., Kerbel, R.S., 2009. Accelerated metastasis after short-term treatment with a potent inhibitor of tumor angiogenesis. *Cancer Cell.* 15, 232-239.

Edfeldt, K., Liu, P.T., Chun, R., Fabri, M., Schenk, M., Wheelwright, M., Keegan, C., Krutzik, S.R., Adams, J.S., Hewison, M., Modlin, R.L., 2010. T-cell cytokines differentially control human monocyte antimicrobial responses by regulating vitamin D metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107, 22593-22598.

Ehlert, J.E., Ludwig, A., Grimm, T.A., Lindner, B., Flad, H.D., Brandt, E., 2000. Down-regulation of neutrophil functions by the ELR(+) CXC chemokine platelet basic protein. *Blood.* 96, 2965-2972.

El-Serag, H.B., 2002. Hepatocellular carcinoma and hepatitis C in the United States. *Hepatology.* 36, S74-83.

Eliassen, A.H., Hankinson, S.E., Rosner, B., Holmes, M.D., Willett, W.C., 2010. Physical activity and risk of breast cancer among postmenopausal women. *Archives of internal medicine.* 170, 1758-1764.

Ellebaek, E., Engell-Noerregaard, L., Iversen, T.Z., Froesig, T.M., Munir, S., Hadrup, S.R., Andersen, M.H., Svane, I.M., 2012. Metastatic melanoma patients treated with dendritic cell vaccination, Interleukin-2 and metronomic cyclophosphamide: results from a phase II trial. *Cancer immunology, immunotherapy : CII.* 61, 1791-1804.

EMA, 2015a. Human medicines - Avastin (bevacizumab).

EMA, 2015b. Human medicines - Herceptin (trastuzumab).

EMA, 2015c. Human medicines - Sutent (sunitinib).

Engell-Noerregaard, L., Hansen, T.H., Andersen, M.H., Thor Straten, P., Svane, I.M., 2009. Review of clinical studies on dendritic cell-based vaccination of patients with malignant melanoma: assessment of correlation between clinical response and vaccine parameters. *Cancer immunology, immunotherapy* : CII. 58, 1-14.

Engelman, J.A., 2009. Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nature reviews. Cancer*. 9, 550-562.

Escudier, B., Bellmunt, J., Negrier, S., Bajetta, E., Melichar, B., Bracarda, S., Ravaud, A., Golding, S., Jethwa, S., Sneller, V., 2010. Phase III trial of bevacizumab plus interferon alfa-2a in patients with metastatic renal cell carcinoma (AVOREN): final analysis of overall survival. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 28, 2144-2150.

Evans, J.M., Morris, L.S., Marchesi, J.R., 2013. The gut microbiome: the role of a virtual organ in the endocrinology of the host. *J. Endocrinol*. 218, R37-47.

Everest, P., 2007. Stress and bacteria: microbial endocrinology. *Gut*. 56, 1037-1038.

Fabrick, B.O., Dijkstra, C.D., van den Berg, T.K., 2005. The macrophage scavenger receptor CD163. *Immunobiology*. 210, 153-160.

Fahmueller, Y.N., Nagel, D., Hoffmann, R.T., Tatsch, K., Jakobs, T., Stieber, P., Holdenrieder, S., 2013. Immunogenic cell death biomarkers HMGB1, RAGE, and DNase indicate response to radioembolization therapy and prognosis in colorectal cancer patients. *Int. J. Cancer*. 132, 2349-2358.

Falony, G., Vlachou, A., Verbrugghe, K., De Vuyst, L., 2006. Cross-feeding between *Bifidobacterium longum* BB536 and acetate-converting, butyrate-producing colon bacteria during growth on oligofructose. *Appl. Environ. Microbiol*. 72, 7835-7841.

Fang, X., Wei, J., He, X., An, P., Wang, H., Jiang, L., Shao, D., Liang, H., Li, Y., Wang, F., Min, J., 2015. Landscape of dietary factors associated with risk of gastric cancer: A systematic review and dose-response meta-analysis of prospective cohort studies. *Eur J Cancer*.

Fasani, P., Sangiovanni, A., De Fazio, C., Borzio, M., Bruno, S., Ronchi, G., Del Ninno, E., Colombo, M., 1999. High prevalence of multinodular hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis attributable to multiple risk factors. *Hepatology*. 29, 1704-1707.

Fearon, E.R., Vogelstein, B., 1990. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 61, 759-767.

Fehleisen, F., 1883. Die etiologie des erysipels. 48.

Feng, D., Nagy, J.A., Brekken, R.A., Pettersson, A., Manseau, E.J., Pyne, K., Mulligan, R., Thorpe, P.E., Dvorak, H.F., Dvorak, A.M., 2000. Ultrastructural localization of the vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) receptor-2 (FLK-1, KDR) in normal mouse kidney and in the hyperpermeable vessels induced by VPF/VEGF-expressing tumors and adenoviral vectors. *J Histochem Cytochem*. 48, 545-556.

Feng, Q., Liang, S., Jia, H., Stadlmayr, A., Tang, L., Lan, Z., Zhang, D., Xia, H., Xu, X., Jie, Z., Su, L., Li, X., Li, J., Xiao, L., Huber-Schonauer, U., Niederseer, D., Al-Aama, J.Y., Yang, H., Wang, J., Kristiansen, K., Arumugam, M., Tilg, H., Datz, C., 2015. Gut microbiome development along the colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Nature communications*. 6, 6528.

Ferrara, N., 2009. VEGF-A: a critical regulator of blood vessel growth. *European cytokine network*. 20, 158-163.

Ferreira, B.R., Szabo, M.J., Cavassani, K.A., Bechara, G.H., Silva, J.S., 2003. Antigens from *Rhipicephalus sanguineus* ticks elicit potent cell-mediated immune responses in resistant but not in susceptible animals. *Vet. Parasitol*. 115, 35-48.

Fiedler, U., Scharpfenecker, M., Koidl, S., Hegen, A., Grunow, V., Schmidt, J.M., Kriz, W., Thurston, G., Augustin, H.G., 2004. The Tie-2 ligand angiopoietin-2 is stored in and rapidly released upon stimulation from endothelial cell Weibel-Palade bodies. *Blood*. 103, 4150-4156.

Folkman, J., 1971. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *The New England journal of medicine*. 285, 1182-1186.

Folkman, J., 1972. Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors. *Annals of surgery*. 175, 409-416.

Fontaine, E., McShane, J., Page, R., Shackcloth, M., Mediratta, N., Carr, M., Soorae, A., Poullis, M., 2010. Aspirin and non-small cell lung cancer resections: effect on long-term survival. *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery*. 38, 21-26.

Fontana, L., Partridge, L., 2015. Promoting health and longevity through diet: from model organisms to humans. *Cell*. 161, 106-118.

- Foralova, R., Mudry, P., Dubska, L., Kyr, M., Valik, D., Sterba, J., Weiler, S., Bellmann, R., 2009. Infusion - related acute reactions in patients receiving different forms of Amphotericin B. *Onkologie*. 3, 219-222.
- Freund, A., Orjalo, A.V., Desprez, P.Y., Campisi, J., 2010. Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences. *Trends Mol Med*. 16, 238-246.
- Frey, D.M., Droeser, R.A., Viehl, C.T., Zlobec, I., Lugli, A., Zingg, U., Oertli, D., Kettelhack, C., Terracciano, L., Tornillo, L., 2010. High frequency of tumor-infiltrating FOXP3(+) regulatory T cells predicts improved survival in mismatch repair-proficient colorectal cancer patients. *Int J Cancer*. 126, 2635-2643.
- Fridlender, M., Kapulnik, Y., Koltai, H., 2015. Plant derived substances with anti-cancer activity: from folklore to practice. *Front Plant Sci*. 6, 799.
- Fridman, W.H., Pages, F., Sautes-Fridman, C., Galon, J., 2012. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nature reviews. Cancer*. 12, 298-306.
- Frohlich, D., Heidemuller, B., Magerl, R., 1980. [Results of combined radiosurgical therapy of malignant salivary gland tumors]. *Zeitschrift fur arztliche Fortbildung*. 74, 901-904.
- Frostova, T., 2013. SELDI-TOF MS profilování patogenních bakterií se zaměřením na Enterobacteriaceae. Diplomová práce. Mgr.
- Fucikova, J., Moserova, I., Urbanova, L., Bezu, L., Kepp, O., Cremer, I., Salek, C., Strnad, P., Kroemer, G., Galluzzi, L., Spisek, R., 2015. Prognostic and Predictive Value of DAMPs and DAMP-Associated Processes in Cancer. *Frontiers in immunology*. 6, 402.
- Fuchs, C.S., Fakih, M., Schwartzberg, L., Cohn, A.L., Yee, L., Dreisbach, L., Kozloff, M.F., Hei, Y.J., Galimi, F., Pan, Y., Haddad, V., Hsu, C.P., Sabin, A., Saltz, L., 2013. TRAIL receptor agonist conatumumab with modified FOLFOX6 plus bevacizumab for first-line treatment of metastatic colorectal cancer: A randomized phase 1b/2 trial. *Cancer*. 119, 4290-4298.
- Fulda, S., 2013. The dark side of TRAIL signaling. *Cell Death Differ*. 20, 845-846.
- Fulop, T., Larbi, A., Kotb, R., de Angelis, F., Pawelec, G., 2011. Aging, immunity, and cancer. *Discovery medicine*. 11, 537-550.
- Fulop, T., Larbi, A., Kotb, R., Pawelec, G., 2013. Immunology of aging and cancer development. *Interdisciplinary topics in gerontology*. 38, 38-48.
- GaBi, 2015. Biosimilars of trastuzumab
- Gabrilovich, D.I., Ishida, T., Nadaf, S., Ohm, J.E., Carbone, D.P., 1999. Antibodies to vascular endothelial growth factor enhance the efficacy of cancer immunotherapy by improving endogenous dendritic cell function. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 5, 2963-2970.
- Galili, U., 2013. Anti-Gal: an abundant human natural antibody of multiple pathogeneses and clinical benefits. *Immunology*. 140, 1-11.
- Galon, J., Mlecnik, B., Bindea, G., Angell, H.K., Berger, A., Lagorce, C., Lugli, A., Zlobec, I., Hartmann, A., Bifulco, C., Nagtegaal, I.D., Palmqvist, R., Masucci, G.V., Botti, G., Tatangelo, F., Delrio, P., Maio, M., Laghi, L., Grizzi, F., Asslaber, M., D'Arrigo, C., Vidal-Vanaclocha, F., Zavadova, E., Chouchane, L., Ohashi, P.S., Hafezi-Bakhtiari, S., Wouters, B.G., Roehrl, M., Nguyen, L., Kawakami, Y., Hazama, S., Okuno, K., Ogino, S., Gibbs, P., Waring, P., Sato, N., Torigoe, T., Itoh, K., Patel, P.S., Shukla, S.N., Wang, Y., Kopetz, S., Sinicrope, F.A., Scripcariu, V., Ascierto, P.A., Marincola, F.M., Fox, B.A., Pages, F., 2014. Towards the introduction of the 'Immunoscore' in the classification of malignant tumours. *J. Pathol*. 232, 199-209.
- Galon, J., Pages, F., Marincola, F.M., Angell, H.K., Thurin, M., Lugli, A., Zlobec, I., Berger, A., Bifulco, C., Botti, G., Tatangelo, F., Britten, C.M., Kreiter, S., Chouchane, L., Delrio, P., Arndt, H., Asslaber, M., Maio, M., Masucci, G.V., Mihm, M., Vidal-Vanaclocha, F., Allison, J.P., Gnjatic, S., Hakansson, L., Huber, C., Singh-Jasuja, H., Ottensmeier, C., Zwierzina, H., Laghi, L., Grizzi, F., Ohashi, P.S., Shaw, P.A., Clarke, B.A., Wouters, B.G., Kawakami, Y., Hazama, S., Okuno, K., Wang, E., O'Donnell-Tormey, J., Lagorce, C., Pawelec, G., Nishimura, M.I., Hawkins, R., Lapointe, R., Lundqvist, A., Khleif, S.N., Ogino, S., Gibbs, P., Waring, P., Sato, N., Torigoe, T., Itoh, K., Patel, P.S., Shukla, S.N., Palmqvist, R., Nagtegaal, I.D., Wang, Y., D'Arrigo, C., Kopetz, S., Sinicrope, F.A., Trinchieri, G., Gajewski, T.F., Ascierto, P.A., Fox, B.A., 2012. Cancer classification using the Immunoscore: a worldwide task force. *Journal of translational medicine*. 10, 205.
- Gao, Z., Guo, B., Gao, R., Zhu, Q., Qin, H., 2015. Microbiota disbiosis is associated with colorectal cancer. *Frontiers in microbiology*. 6, 20.
- Garg, A.D., Dudek, A.M., Ferreira, G.B., Verfaillie, T., Vandenabeele, P., Krysko, D.V., Mathieu, C., Agostinis, P., 2013. ROS-induced autophagy in cancer cells assists in evasion from determinants of immunogenic cell death. *Autophagy*. 9, 1292-1307.

- Garg, A.D., Elsen, S., Krysko, D.V., Vandenabeele, P., de Witte, P., Agostinis, P., 2015a. Resistance to anticancer vaccination effect is controlled by a cancer cell-autonomous phenotype that disrupts immunogenic phagocytic removal. *Oncotarget*. 6, 26841-26860.
- Garg, A.D., Galluzzi, L., Apetoh, L., Baert, T., Birge, R.B., Bravo-San Pedro, J.M., Breckpot, K., Brough, D., Chaurio, R., Cirone, M., Coosemans, A., Coulie, P.G., De Ruyscher, D., Dini, L., de Witte, P., Dudek-Peric, A.M., Faggioni, A., Fucikova, J., Gaip, U.S., Golab, J., Gougeon, M.L., Hamblin, M.R., Hemminki, A., Herrmann, M., Hodge, J.W., Kepp, O., Kroemer, G., Krysko, D.V., Land, W.G., Madeo, F., Manfredi, A.A., Mattarollo, S.R., Maueroder, C., Merendino, N., Multhoff, G., Pabst, T., Ricci, J.E., Riganti, C., Romano, E., Rufo, N., Smyth, M.J., Sonnemann, J., Spisek, R., Stagg, J., Vacchelli, E., Vandenabeele, P., Vandenberk, L., Van den Eynde, B.J., Van Gool, S., Velotti, F., Zitvogel, L., Agostinis, P., 2015b. Molecular and Translational Classifications of DAMPs in Immunogenic Cell Death. *Frontiers in immunology*. 6, 588.
- Garland, C.F., Garland, F.C., 2006. Do sunlight and vitamin D reduce the likelihood of colon cancer? *Int J Epidemiol*. 35, 217-220.
- Gasic, G.J., Gasic, T.B., Stewart, C.C., 1968. Antimetastatic effects associated with platelet reduction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 61, 46-52.
- Gatti, R.A., Good, R.A., 1971. Occurrence of malignancy in immunodeficiency diseases. A literature review. *Cancer*. 28, 89-98.
- Gaya, A., Akle, C.A., Mudan, S., Grange, J., 2015. The Concept of Hormesis in Cancer Therapy - Is Less More? *Cureus*. 7, e261.
- Germain, C., Gnjatic, S., Dieu-Nosjean, M.C., 2015. Tertiary Lymphoid Structure-Associated B Cells are Key Players in Anti-Tumor Immunity. *Frontiers in immunology*. 6, 67.
- Giantonio, B.J., Catalano, P.J., Meropol, N.J., O'Dwyer, P.J., Mitchell, E.P., Alberts, S.R., Schwartz, M.A., Benson, A.B., 3rd, 2007. Bevacizumab in combination with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin (FOLFOX4) for previously treated metastatic colorectal cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 25, 1539-1544.
- Gibbons, D.L., Haque, S.F., Silberzahn, T., Hamilton, K., Langford, C., Ellis, P., Carr, R., Hayday, A.C., 2009. Neonates harbour highly active gammadelta T cells with selective impairments in preterm infants. *Eur J Immunol*. 39, 1794-1806.
- Giovannucci, E., Liu, Y., Rimm, E.B., Hollis, B.W., Fuchs, C.S., Stampfer, M.J., Willett, W.C., 2006. Prospective study of predictors of vitamin D status and cancer incidence and mortality in men. *J. Natl. Cancer Inst*. 98, 451-459.
- Giroux, M., Denis, F., 2005. CD1d-unrestricted human NKT cells release chemokines upon Fas engagement. *Blood*. 105, 703-710.
- Gober, H.J., Kistowska, M., Angman, L., Jenö, P., Mori, L., De Libero, G., 2003. Human T cell receptor gammadelta cells recognize endogenous mevalonate metabolites in tumor cells. *J Exp Med*. 197, 163-168.
- Godfrey, D.I., MacDonald, H.R., Kronenberg, M., Smyth, M.J., Van Kaer, L., 2004. NKT cells: what's in a name? *Nature reviews. Immunology*. 4, 231-237.
- Goede, V., Coutelle, O., Neuneier, J., Reinacher-Schick, A., Schnell, R., Koslowsky, T.C., Weihrauch, M.R., Cremer, B., Kashkar, H., Odenthal, M., Augustin, H.G., Schmiegel, W., Hallek, M., Hacker, U.T., 2010. Identification of serum angiopoietin-2 as a biomarker for clinical outcome of colorectal cancer patients treated with bevacizumab-containing therapy. *Br J Cancer*. 103, 1407-1414.
- Gonzalez-Quintela, A., Dam Laursen, A.S., Vidal, C., Skaaby, T., Gude, F., Linneberg, A., 2014. IgE antibodies to alpha-gal in the general adult population: relationship with tick bites, atopy, and cat ownership. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 44, 1061-1068.
- Gorbach, S.L., 1990. Lactic acid bacteria and human health. *Ann Med*. 22, 37-41.
- Gorham, E.D., Garland, C.F., Garland, F.C., Grant, W.B., Mohr, S.B., Lipkin, M., Newmark, H.L., Giovannucci, E., Wei, M., Holick, M.F., 2007. Optimal vitamin D status for colorectal cancer prevention: a quantitative meta analysis. *Am J Prev Med*. 32, 210-216.
- Gravestain, L.A., Borst, J., 1998. Tumor necrosis factor receptor family members in the immune system. *Semin Immunol*. 10, 423-434.
- Griffin, M.D., Dong, X., Kumar, R., 2007. Vitamin D receptor-mediated suppression of RelB in antigen presenting cells: a paradigm for ligand-augmented negative transcriptional regulation. *Arch Biochem Biophys*. 460, 218-226.
- Groh, V., Porcelli, S., Fabbri, M., Lanier, L.L., Picker, L.J., Anderson, T., Warnke, R.A., Bhan, A.K., Strominger, J.L., Brenner, M.B., 1989. Human lymphocytes bearing T cell receptor gamma/delta are phenotypically diverse and evenly distributed throughout the lymphoid system. *J Exp Med*. 169, 1277-1294.

- Groh, V., Steinle, A., Bauer, S., Spies, T., 1998. Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial gammadelta T cells. *Science*. 279, 1737-1740.
- Guzman, E., Hope, J., Taylor, G., Smith, A.L., Cubillos-Zapata, C., Charleston, B., 2014. Bovine gammadelta T cells are a major regulatory T cell subset. *J Immunol*. 193, 208-222.
- Hagman, H., Frodin, J.E., Berglund, A., Sundberg, J., Vestermark, L.W., Albertsson, M., Fernebro, E., Johnsson, A., 2016. A randomized study of KRAS-guided maintenance therapy with bevacizumab, erlotinib or metronomic capecitabine after first-line induction treatment of metastatic colorectal cancer: the Nordic ACT2 trial. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 27, 140-147.
- Hajduskova, E., Literak, I., Papousek, I., Costa, F.B., Novakova, M., Labruna, M.B., Zdrzilova-Dubska, L., 2016. 'Candidatus Rickettsia mendelii', a novel basal group rickettsia detected in Ixodes ricinus ticks in the Czech Republic. *Ticks Tick Borne Dis*. 7, 482-486.
- Hamanishi, J., Mandai, M., Iwasaki, M., Okazaki, T., Tanaka, Y., Yamaguchi, K., Higuchi, T., Yagi, H., Takakura, K., Minato, N., Honjo, T., Fujii, S., 2007. Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104, 3360-3365.
- Hamanova, M., Zdrzilova Dubska, L., Valik, D., Lokaj, J., 2014. [Natural antibodies against alpha(1,3) galactosyl epitope in the serum of cancer patients]. *Epidemiologie, mikrobiologie, imunologie : casopis Spolecnosti pro epidemiologii a mikrobiologii Ceske lekarske spolecnosti J.E. Purkyne*. 63, 130-133.
- Hamsten, C., Starkhammar, M., Tran, T.A., Johansson, M., Bengtsson, U., Ahlen, G., Sallberg, M., Gronlund, H., van Hage, M., 2013. Identification of galactose-alpha-1,3-galactose in the gastrointestinal tract of the tick Ixodes ricinus; possible relationship with red meat allergy. *Allergy*. 68, 549-552.
- Hanahan, D., Bergers, G., Bergsland, E., 2000. Less is more, regularly: metronomic dosing of cytotoxic drugs can target tumor angiogenesis in mice. *The Journal of clinical investigation*. 105, 1045-1047.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*. 100, 57-70.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 144, 646-674.
- Harriss, D.J., Atkinson, G., Batterham, A., George, K., Cable, N.T., Reilly, T., Haboubi, N., Renehan, A.G., 2009. Lifestyle factors and colorectal cancer risk (2): a systematic review and meta-analysis of associations with leisure-time physical activity. *Colorectal disease : the official journal of the Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland*. 11, 689-701.
- Hashizume, H., Falcon, B.L., Kuroda, T., Baluk, P., Coxon, A., Yu, D., Bready, J.V., Oliner, J.D., McDonald, D.M., 2010. Complementary actions of inhibitors of angiotensin-2 and VEGF on tumor angiogenesis and growth. *Cancer Res*. 70, 2213-2223.
- Hasnis, E., Alishkevitz, D., Gingis-Veltski, S., Bril, R., Fremder, E., Voloshin, T., Raviv, Z., Karban, A., Shaked, Y., 2014. Anti-Bv8 antibody and metronomic gemcitabine improve pancreatic adenocarcinoma treatment outcome following weekly gemcitabine therapy. *Neoplasia*. 16, 501-510.
- Hayakawa, Y., Smyth, M.J., 2006. Innate immune recognition and suppression of tumors. *Adv Cancer Res*. 95, 293-322.
- Hayward, A.R., Levy, J., Facchetti, F., Notarangelo, L., Ochs, H.D., Etzioni, A., Bonnefoy, J.Y., Cosyns, M., Weinberg, A., 1997. Cholangiopathy and tumors of the pancreas, liver, and biliary tree in boys with X-linked immunodeficiency with hyper-IgM. *J Immunol*. 158, 977-983.
- He, J., Wang, K., Zheng, N., Qiu, Y., Xie, G., Su, M., Jia, W., Li, H., 2015. Metformin suppressed the proliferation of LoVo cells and induced a time-dependent metabolic and transcriptional alteration. *Scientific reports*. 5, 17423.
- Hegde, V.L., Singh, N.P., Nagarkatti, P.S., Nagarkatti, M., 2008. CD44 mobilization in allogeneic dendritic cell-T cell immunological synapse plays a key role in T cell activation. *J Leukoc Biol*. 84, 134-142.
- Hecht, J.R., Mitchell, E., Chidiac, T., Scroggin, C., Hagenstad, C., Spigel, D., Marshall, J., Cohn, A., McCollum, D., Stella, P., Deeter, R., Shahin, S., Amado, R.G., 2009. A randomized phase IIIB trial of chemotherapy, bevacizumab, and panitumumab compared with chemotherapy and bevacizumab alone for metastatic colorectal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 27, 672-680.
- Heine-Broring, R.C., Winkels, R.M., Renkema, J.M., Kragt, L., van Orten-Luiten, A.C., Tigchelaar, E.F., Chan, D.S., Norat, T., Kampman, E., 2015. Dietary supplement use and colorectal cancer risk: a systematic review and meta-analyses of prospective cohort studies. *Int. J. Cancer*. 136, 2388-2401.
- Hellmann, M.D., Creelan, B.C., Woo, K., Sima, C.S., Iams, W.T., Antonia, S.J., Horn, L., Brahmer, J.R., Gettinger, S., Harbison, C., Rizvi, N., 2014. SMOKING HISTORY AND RESPONSE TO NIVOLUMAB IN PATIENTS WITH ADVANCED NSCLCS. *Ann. Oncol*. 25.

- Hernandez-Agudo, E., Mondejar, T., Soto-Montenegro, M.L., Megias, D., Mouron, S., Sanchez, J., Hidalgo, M., Lopez-Casas, P.P., Mulero, F., Desco, M., Quintela-Fandino, M., 2015. Monitoring vascular normalization induced by antiangiogenic treatment with F-fluoromisonidazole-PET. *Molecular oncology*.
- Hester, C.M., Jala, V.R., Langille, M.G., Umar, S., Greiner, K.A., Haribabu, B., 2015. Fecal microbes, short chain fatty acids, and colorectal cancer across racial/ethnic groups. *World journal of gastroenterology : WJG*. 21, 2759-2769.
- Heylmann, D., Bauer, M., Becker, H., van Gool, S., Bacher, N., Steinbrink, K., Kaina, B., 2013. Human CD4+CD25+ regulatory T cells are sensitive to low dose cyclophosphamide: implications for the immune response. *PLoS one*. 8, e83384.
- Higurashi, T., Hosono, K., Takahashi, H., Komiya, Y., Umezawa, S., Sakai, E., Uchiyama, T., Taniguchi, L., Hata, Y., Uchiyama, S., Hattori, A., Nagase, H., Kessoku, T., Arimoto, J., Matsuhashi, N., Inayama, Y., Yamanaka, S., Taguri, M., Nakajima, A., 2016. Metformin for chemoprevention of metachronous colorectal adenoma or polyps in post-polypectomy patients without diabetes: a multicentre double-blind, placebo-controlled, randomised phase 3 trial. *The Lancet. Oncology*.
- Hinz, T., Wesch, D., Halary, F., Marx, S., Choudhary, A., Arden, B., Janssen, O., Bonneville, M., Kabelitz, D., 1997. Identification of the complete expressed human TCR V gamma repertoire by flow cytometry. *Int Immunol*. 9, 1065-1072.
- Hodi, F.S., Lawrence, D., Lezcano, C., Wu, X., Zhou, J., Sasada, T., Zeng, W., Giobbie-Hurder, A., Atkins, M.B., Ibrahim, N., Friedlander, P., Flaherty, K.T., Murphy, G.F., Rodig, S., Velazquez, E.F., Mihm, M.C., Jr., Russell, S., DiPiro, P.J., Yap, J.T., Ramaiya, N., Van den Abbeele, A.D., Gargano, M., McDermott, D., 2014. Bevacizumab plus ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *Cancer immunology research*. 2, 632-642.
- Hogarth, P.M., Pietersz, G.A., 2012. Fc receptor-targeted therapies for the treatment of inflammation, cancer and beyond. *Nature reviews. Drug discovery*. 11, 311-331.
- Holcakova, J., Ceskova, P., Hrstka, R., Muller, P., Dubska, L., Coates, P.J., Palecek, E., Vojtesek, B., 2008. The cell type-specific effect of TAp73 isoforms on the cell cycle and apoptosis. *Cell Mol Biol Lett*. 13, 404-420.
- Holick, M.F., Binkley, N.C., Bischoff-Ferrari, H.A., Gordon, C.M., Hanley, D.A., Heaney, R.P., Murad, M.H., Weaver, C.M., 2011. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 96, 1911-1930.
- Holmes, C.E., Huang, J.C., Pace, T.R., Howard, A.B., Muss, H.B., 2008. Tamoxifen and aromatase inhibitors differentially affect vascular endothelial growth factor and endostatin levels in women with breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 14, 3070-3076.
- Holtmeier, W., Pfander, M., Hennemann, A., Zollner, T.M., Kaufmann, R., Caspary, W.F., 2001. The TCR-delta repertoire in normal human skin is restricted and distinct from the TCR-delta repertoire in the peripheral blood. *The Journal of investigative dermatology*. 116, 275-280.
- Honnen, A.C., Hailer, F., Kenntner, N., Literak, I., Dubska, L., Zachos, F.E., 2010. Mitochondrial DNA and nuclear microsatellites reveal high diversity and genetic structure in an avian top predator, the white-tailed sea eagle, in central Europe. *Biol. J. Linn. Soc.* 99, 727-737.
- Huang, H., Langenkamp, E., Georganaki, M., Loskog, A., Fuchs, P.F., Dieterich, L.C., Kreuger, J., Dimberg, A., 2015. VEGF suppresses T-lymphocyte infiltration in the tumor microenvironment through inhibition of NF-kappaB-induced endothelial activation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 29, 227-238.
- Hung, S.I., Chung, W.H., Jee, S.H., Chen, W.C., Chang, Y.T., Lee, W.R., Hu, S.L., Wu, M.T., Chen, G.S., Wong, T.W., Hsiao, P.F., Chen, W.H., Shih, H.Y., Fang, W.H., Wei, C.Y., Lou, Y.H., Huang, Y.L., Lin, J.J., Chen, Y.T., 2006. Genetic susceptibility to carbamazepine-induced cutaneous adverse drug reactions. *Pharmacogenetics and genomics*. 16, 297-306.
- Hurwitz, H., Fehrenbacher, L., Novotny, W., Cartwright, T., Hainsworth, J., Heim, W., Berlin, J., Baron, A., Griffing, S., Holmgren, E., Ferrara, N., Fyfe, G., Rogers, B., Ross, R., Kabbinavar, F., 2004. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *The New England journal of medicine*. 350, 2335-2342.
- Hurwitz, H.I., Yi, J., Ince, W., Novotny, W.F., Rosen, O., 2009. The clinical benefit of bevacizumab in metastatic colorectal cancer is independent of K-ras mutation status: analysis of a phase III study of bevacizumab with chemotherapy in previously untreated metastatic colorectal cancer. *Oncologist*. 14, 22-28.
- Hus, I., Rolinski, J., 2011. Immunomodulatory effects of cyclophosphamide on the differentiation of Th17 cells. *Immunotherapy*. 3, 709-712.
- Hylemon, P.B., Zhou, H., Pandak, W.M., Ren, S., Gil, G., Dent, P., 2009. Bile acids as regulatory molecules. *J. Lipid Res*. 50, 1509-1520.
- Chan, A.T., 2016. Metformin for cancer prevention: a reason for optimism. *The Lancet. Oncology*.

- Chan, A.T., Baba, Y., Shima, K., Nosho, K., Chung, D.C., Hung, K.E., Mahmood, U., Madden, K., Poss, K., Ranieri, A., Shue, D., Kucherlapati, R., Fuchs, C.S., Ogino, S., 2010. Cathepsin B expression and survival in colon cancer: implications for molecular detection of neoplasia. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology.* 19, 2777-2785.
- Chen, D.R., Lin, C., Wang, Y.F., 2015. Window of opportunity: A new insight into sequential bevacizumab and paclitaxel in two cases of metastatic triple-negative breast cancer. *Experimental and therapeutic medicine.* 10, 885-888.
- Chen, D.S., Mellman, I., 2013. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity.* 39, 1-10.
- Chen, J., Bierhaus, A., Schiekofer, S., Andrassy, M., Chen, B., Stern, D.M., Nawroth, P.P., 2001. Tissue factor--a receptor involved in the control of cellular properties, including angiogenesis. *Thrombosis and haemostasis.* 86, 334-345.
- Chen, J.J., Bozza, W.P., Di, X., Zhang, Y., Hallett, W., Zhang, B., 2014. H-Ras regulation of TRAIL death receptor mediated apoptosis. *Oncotarget.* 5, 5125-5137.
- Chen, M., Geng, J.G., 2006. P-selectin mediates adhesion of leukocytes, platelets, and cancer cells in inflammation, thrombosis, and cancer growth and metastasis. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis.* 54, 75-84.
- Cheng, K., Raufman, J.P., 2005. Bile acid-induced proliferation of a human colon cancer cell line is mediated by transactivation of epidermal growth factor receptors. *Biochem. Pharmacol.* 70, 1035-1047.
- Chinnaswamy, G., Prasad, M., Vora, T., Arora, B., Sridhar, E., Gupta, T., Moiyadi, A., Jalali, R., Kukure, P., Banavali, S., 2014. Modified COMBAT (Combined Oral Metronomic Biodifferentiating Antiangiogenic Treatment) therapy in poor prognosis pediatric malignant brain tumors.
- Chlastakova, I., Liskova, M., Kudelova, J., Dubska, L., Kleparnik, K., Matalova, E., 2012. Dynamics of caspase-3 activation and inhibition in embryonic micromasses evaluated by a photon-counting chemiluminescence approach. *In vitro cellular & developmental biology. Animal.* 48, 545-549.
- Choe, K.S., Correa, D., Jani, A.B., Liauw, S.L., 2010. The use of anticoagulants improves biochemical control of localized prostate cancer treated with radiotherapy. *Cancer.* 116, 1820-1826.
- Choe, K.S., Cowan, J.E., Chan, J.M., Carroll, P.R., D'Amico, A.V., Liauw, S.L., 2012. Aspirin use and the risk of prostate cancer mortality in men treated with prostatectomy or radiotherapy. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 30, 3540-3544.
- Choi, J., Shendrik, I., Peacocke, M., Peehl, D., Buttyan, R., Ikeguchi, E.F., Katz, A.E., Benson, M.C., 2000. Expression of senescence-associated beta-galactosidase in enlarged prostates from men with benign prostatic hyperplasia. *Urology.* 56, 160-166.
- Chu, K.F., Dupuy, D.E., 2014. Thermal ablation of tumours: biological mechanisms and advances in therapy. *Nature reviews. Cancer.* 14, 199-208.
- Chung, C.H., Mirakhur, B., Chan, E., Le, Q.T., Berlin, J., Morse, M., Murphy, B.A., Satinover, S.M., Hosen, J., Mauro, D., Slebos, R.J., Zhou, Q., Gold, D., Hatley, T., Hicklin, D.J., Platts-Mills, T.A., 2008. Cetuximab-induced anaphylaxis and IgE specific for galactose-alpha-1,3-galactose. *The New England journal of medicine.* 358, 1109-1117.
- Igney, F.H., Krammer, P.H., 2005. Tumor counterattack: fact or fiction? *Cancer immunology, immunotherapy : CII.* 54, 1127-1136.
- Italiano, J.E., Jr., Richardson, J.L., Patel-Hett, S., Battinelli, E., Zaslavsky, A., Short, S., Ryeom, S., Folkman, J., Klement, G.L., 2008. Angiogenesis is regulated by a novel mechanism: pro- and antiangiogenic proteins are organized into separate platelet alpha granules and differentially released. *Blood.* 111, 1227-1233.
- Ito, M., Kanno, S., Nosho, K., Sukawa, Y., Mitsuhashi, K., Kurihara, H., Igarashi, H., Takahashi, T., Tachibana, M., Takahashi, H., Yoshii, S., Takenouchi, T., Hasegawa, T., Okita, K., Hirata, K., Maruyama, R., Suzuki, H., Imai, K., Yamamoto, H., Shinomura, Y., 2015. Association of *Fusobacterium nucleatum* with clinical and molecular features in colorectal serrated pathway. *Int J Cancer.*
- Ivashko, I.N., Kolesar, J.M., 2016. Pembrolizumab and nivolumab: PD-1 inhibitors for advanced melanoma. *American journal of health-system pharmacy : AJHP : official journal of the American Society of Health-System Pharmacists.* 73, 193-201.
- Jain, R.K., 2005. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science.* 307, 58-62.
- Jain, R.K., 2013. Normalizing tumor microenvironment to treat cancer: bench to bedside to biomarkers. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 31, 2205-2218.
- Jara, J.A., Lopez-Munoz, R., 2015. Metformin and cancer: Between the bioenergetic disturbances and the antifolate activity. *Pharmacol Res.* 101, 102-108.
- Jemal, A., Siegel, R., Xu, J., Ward, E., 2010. Cancer statistics, 2010. *CA: a cancer journal for clinicians.* 60, 277-300.

- Johnsen, J.I., Lindskog, M., Ponthan, F., Pettersen, I., Elfman, L., Orrego, A., Sveinbjornsson, B., Kogner, P., 2004. Cyclooxygenase-2 is expressed in neuroblastoma, and nonsteroidal anti-inflammatory drugs induce apoptosis and inhibit tumor growth in vivo. *Cancer Res.* 64, 7210-7215.
- Jones, S.A., Dewald, B., Clark-Lewis, I., Baggiolini, M., 1997. Chemokine antagonists that discriminate between interleukin-8 receptors. Selective blockers of CXCR2. *J. Biol. Chem.* 272, 16166-16169.
- Josephs, D.H., Bax, H.J., Lentfer, H., Selkirk, C., Spicer, J.F., Karagiannis, S.N., 2015. Potential for monocyte recruitment by IgE immunotherapy for cancer in a rat model of tumour metastasis. *Lancet.* 385 Suppl 1, S53.
- Josephs, D.H., Spicer, J.F., Corrigan, C.J., Gould, H.J., Karagiannis, S.N., 2013. Epidemiological associations of allergy, IgE and cancer. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology.* 43, 1110-1123.
- Jurankova, L., 2010. Kvantitativní stanovení hemoglobinu ve stolici: nová metoda detekce okultního krvácení. *Bakalářská práce.* Bc.
- Jurasz, P., Alonso-Escolano, D., Radomski, M.W., 2004. Platelet--cancer interactions: mechanisms and pharmacology of tumour cell-induced platelet aggregation. *Br. J. Pharmacol.* 143, 819-826.
- Kajitani, K., Tanaka, Y., Arihiro, K., Kataoka, T., Ohdan, H., 2012. Mechanistic analysis of the antitumor efficacy of human natural killer cells against breast cancer cells. *Breast cancer research and treatment.* 134, 139-155.
- Kakimi, K., Matsushita, H., Murakawa, T., Nakajima, J., 2014. gammadelta T cell therapy for the treatment of non-small cell lung cancer. *Translational lung cancer research.* 3, 23-33.
- Kakkar, A.K., Levine, M.N., Kadziola, Z., Lemoine, N.R., Low, V., Patel, H.K., Rustin, G., Thomas, M., Quigley, M., Williamson, R.C., 2004. Low molecular weight heparin, therapy with dalteparin, and survival in advanced cancer: the fragmin advanced malignancy outcome study (FAMOUS). *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 22, 1944-1948.
- Kammertoens, T., Schuler, T., Blankenstein, T., 2005. Immunotherapy: target the stroma to hit the tumor. *Trends Mol Med.* 11, 225-231.
- Kandalaf, L.E., Chiang, C.L., Tanyi, J., Motz, G., Balint, K., Mick, R., Coukos, G., 2013. A Phase I vaccine trial using dendritic cells pulsed with autologous oxidized lysate for recurrent ovarian cancer. *Journal of translational medicine.* 11, 149.
- Kano, M.R., Morishita, Y., Iwata, C., Iwasaka, S., Watabe, T., Ouchi, Y., Miyazono, K., Miyazawa, K., 2005. VEGF-A and FGF-2 synergistically promote neoangiogenesis through enhancement of endogenous PDGF-B-PDGFRbeta signaling. *J. Cell Sci.* 118, 3759-3768.
- Kanzaki, H., Ohtaki, A., Merchant, F.K., Greene, M.I., Murali, R., 2013. Mutations in K-Ras linked to levels of osteoprotegerin and sensitivity to TRAIL-induced cell death in pancreatic ductal adenocarcinoma cells. *Exp Mol Pathol.* 94, 372-379.
- Karlsen, M.A., Hogdall, E.V., Christensen, I.J., Borgfeldt, C., Kalapotharakos, G., Zdrzilova-Dubska, L., Chovanec, J., Lok, C.A., Stiekema, A., Mutz-Dehbalaie, I., Rosenthal, A.N., Moore, E.K., Schodin, B.A., Sumpaico, W.W., Sundfeldt, K., Kristjansdottir, B., Zapardiel, I., Hogdall, C.K., 2015. A novel diagnostic index combining HE4, CA125 and age may improve triage of women with suspected ovarian cancer - An international multicenter study in women with an ovarian mass. *Gynecologic oncology.* 138, 640-646.
- Karnoub, A.E., Weinberg, R.A., 2008. Ras oncogenes: split personalities. *Nature reviews. Molecular cell biology.* 9, 517-531.
- Karpatkin, S., Ambrogio, C., Pearlstein, E., 1988a. The role of tumor-induced platelet aggregation, platelet adhesion and adhesive proteins in tumor metastasis. *Prog Clin Biol Res.* 283, 585-606.
- Karpatkin, S., Pearlstein, E., Ambrogio, C., Coller, B.S., 1988b. Role of adhesive proteins in platelet tumor interaction in vitro and metastasis formation in vivo. *The Journal of clinical investigation.* 81, 1012-1019.
- Karwacz, K., Bricogne, C., MacDonald, D., Arce, F., Bennett, C.L., Collins, M., Escors, D., 2011. PD-L1 co-stimulation contributes to ligand-induced T cell receptor down-modulation on CD8+ T cells. *EMBO molecular medicine.* 3, 581-592.
- Kawano, M., Mabuchi, S., Matsumoto, Y., Sasano, T., Takahashi, R., Kuroda, H., Kozasa, K., Hashimoto, K., Isobe, A., Sawada, K., Hamasaki, T., Morii, E., Kimura, T., 2015. The significance of G-CSF expression and myeloid-derived suppressor cells in the chemoresistance of uterine cervical cancer. *Scientific reports.* 5, 18217.
- KDO_DC1311, 2015. EudraCT number: 2014-003388-39.

- Kelly-Rogers, J., Madrigal-Estebas, L., O'Connor, T., Doherty, D.G., 2006. Activation-induced expression of CD56 by T cells is associated with a reprogramming of cytolytic activity and cytokine secretion profile in vitro. *Hum Immunol.* 67, 863-873.
- Kerbel, R.S., Kamen, B.A., 2004. The anti-angiogenic basis of metronomic chemotherapy. *Nature reviews. Cancer.* 4, 423-436.
- Kern, P.A., Ranganathan, S., Li, C., Wood, L., Ranganathan, G., 2001. Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 280, E745-751.
- Kerr, B.A., Miocinovic, R., Smith, A.K., Klein, E.A., Byzova, T.V., 2010. Comparison of tumor and microenvironment secretomes in plasma and in platelets during prostate cancer growth in a xenograft model. *Neoplasia.* 12, 388-396.
- Kersey, J.H., Shapiro, R.S., Filipovich, A.H., 1988. Relationship of immunodeficiency to lymphoid malignancy. *The Pediatric infectious disease journal.* 7, S10-12.
- Khambata-Ford, S., Garrett, C.R., Meropol, N.J., Basik, M., Harbison, C.T., Wu, S., Wong, T.W., Huang, X., Takimoto, C.H., Godwin, A.K., Tan, B.R., Krishnamurthi, S.S., Burris, H.A., 3rd, Poplin, E.A., Hidalgo, M., Baselga, J., Clark, E.A., Mauro, D.J., 2007. Expression of epiregulin and amphiregulin and K-ras mutation status predict disease control in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 25, 3230-3237.
- Kienast, Y., Klein, C., Scheuer, W., Raemsch, R., Lorenzon, E., Bernicke, D., Herting, F., Yu, S., The, H.H., Martarello, L., Gassner, C., Stubenrauch, K.G., Munro, K., Augustin, H.G., Thomas, M., 2013. Ang-2-VEGF-A CrossMab, a novel bispecific human IgG1 antibody blocking VEGF-A and Ang-2 functions simultaneously, mediates potent antitumor, antiangiogenic, and antimetastatic efficacy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 19, 6730-6740.
- Kim, A.Y., Lee, Y.S., Kim, K.H., Lee, J.H., Lee, H.K., Jang, S.H., Kim, S.E., Lee, G.Y., Lee, J.W., Jung, S.A., Chung, H.Y., Jeong, S., Kim, J.B., 2010. Adiponectin represses colon cancer cell proliferation via AdipoR1- and -R2-mediated AMPK activation. *Mol Endocrinol.* 24, 1441-1452.
- Kim Sh, S.H., Kaminker, P., Campisi, J., 2002. Telomeres, aging and cancer: in search of a happy ending. *Oncogene.* 21, 503-511.
- Kinlen, L.J., Webster, A.D., Bird, A.G., Haile, R., Peto, J., Soothill, J.F., Thompson, R.A., 1985. Prospective study of cancer in patients with hypogammaglobulinaemia. *Lancet.* 1, 263-266.
- Klement, G., Baruchel, S., Rak, J., Man, S., Clark, K., Hicklin, D.J., Bohlen, P., Kerbel, R.S., 2000. Continuous low-dose therapy with vinblastine and VEGF receptor-2 antibody induces sustained tumor regression without overt toxicity. *The Journal of clinical investigation.* 105, R15-24.
- Knudson, A.G., Jr., 1971. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 68, 820-823.
- Kong, Y., Cao, W., Xi, X., Ma, C., Cui, L., He, W., 2009. The NKG2D ligand ULBP4 binds to TCRgamma9/delta2 and induces cytotoxicity to tumor cells through both TCRgammadelta and NKG2D. *Blood.* 114, 310-317.
- Konstantopoulos, K., McIntire, L.V., 1996. Effects of fluid dynamic forces on vascular cell adhesion. *The Journal of clinical investigation.* 98, 2661-2665.
- Kopp, H.G., Placke, T., Salih, H.R., 2009. Platelet-derived transforming growth factor-beta down-regulates NKG2D thereby inhibiting natural killer cell antitumor reactivity. *Cancer Res.* 69, 7775-7783.
- Krengel, U., Schlichting, I., Scherer, A., Schumann, R., Frech, M., John, J., Kabsch, W., Pai, E.F., Wittinghofer, A., 1990. Three-dimensional structures of H-ras p21 mutants: molecular basis for their inability to function as signal switch molecules. *Cell.* 62, 539-548.
- Kristina, G., Radomir, P., Eva, B., Lenka, D., Radek, L., Rostislav, V., Borivoj, V., Dalibor, V., 2009. When one chip is not enough: augmenting the validity of SELDI-TOF proteomic profiles of clinical specimens. *Lab on a chip.* 9, 1014-1017.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Kepp, O., Zitvogel, L., 2013. Immunogenic cell death in cancer therapy. *Annu Rev Immunol.* 31, 51-72.
- Kronenberg, M., 2005. Toward an understanding of NKT cell biology: progress and paradoxes. *Annu Rev Immunol.* 23, 877-900.
- Krysko, D.V., Garg, A.D., Kaczmarek, A., Krysko, O., Agostinis, P., Vandenabeele, P., 2012. Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nature reviews. Cancer.* 12, 860-875.
- Kubo, M., Morisaki, T., Kuroki, H., Tasaki, A., Yamanaka, N., Matsumoto, K., Nakamura, K., Onishi, H., Baba, E., Katano, M., 2003. Combination of adoptive immunotherapy with Herceptin for patients with HER2-expressing breast cancer. *Anticancer Res.* 23, 4443-4449.

- Kulich, P., Roubalova, E., Dubska, L., Sychra, O., Smid, B., Literak, I., 2008. Avipoxvirus in blackcaps (*Sylvia atricapilla*). *Avian pathology : journal of the W.V.P.A.* 37, 101-107.
- Kunzmann, V., Bauer, E., Feurle, J., Weissinger, F., Tony, H.P., Wilhelm, M., 2000. Stimulation of gammadelta T cells by aminobisphosphonates and induction of antiplasma cell activity in multiple myeloma. *Blood.* 96, 384-392.
- Kurzen, H., Schmitt, S., Naher, H., Mohler, T., 2003. Inhibition of angiogenesis by non-toxic doses of temozolomide. *Anticancer Drugs.* 14, 515-522.
- Kuylentierna, C., Bjorkstrom, N.K., Andersson, S.K., Sahlstrom, P., Bosnjak, L., Paquin-Proulx, D., Malmberg, K.J., Ljunggren, H.G., Moll, M., Sandberg, J.K., 2011. NKG2D performs two functions in invariant NKT cells: direct TCR-independent activation of NK-like cytotoxicity and co-stimulation of activation by CD1d. *Eur J Immunol.* 41, 1913-1923.
- Ladoire, S., Martin, F., Ghiringhelli, F., 2011. Prognostic role of FOXP3+ regulatory T cells infiltrating human carcinomas: the paradox of colorectal cancer. *Cancer immunology, immunotherapy : CII.* 60, 909-918.
- Lafont, V., Sanchez, F., Laprevotte, E., Michaud, H.A., Gros, L., Eliaou, J.F., Bonnefoy, N., 2014. Plasticity of gammadelta T Cells: Impact on the Anti-Tumor Response. *Frontiers in immunology.* 5, 622.
- Lakomy, R., Poprach, A., 2015. [Side effects of Modern Immunotherapy and How to Solve Them in the Clinics]. *Klinicka onkologie : casopis Ceske a Slovenske onkologicke spolocnosti.* 28 Suppl 4, 4S103-114.
- Lawrence, M.S., Stojanov, P., Polak, P., Kryukov, G.V., Cibulskis, K., Sivachenko, A., Carter, S.L., Stewart, C., Mermel, C.H., Roberts, S.A., Kiezun, A., Hammerman, P.S., McKenna, A., Drier, Y., Zou, L., Ramos, A.H., Pugh, T.J., Stransky, N., Helman, E., Kim, J., Sougnez, C., Ambrogio, L., Nickerson, E., Shefler, E., Cortes, M.L., Auclair, D., Saksena, G., Voet, D., Noble, M., DiCara, D., Lin, P., Lichtenstein, L., Heiman, D.I., Fennell, T., Imielinski, M., Hernandez, B., Hodis, E., Baca, S., Dulak, A.M., Lohr, J., Landau, D.A., Wu, C.J., Melendez-Zajgla, J., Hidalgo-Miranda, A., Koren, A., McCarroll, S.A., Mora, J., Lee, R.S., Crompton, B., Onofrio, R., Parkin, M., Winckler, W., Ardlie, K., Gabriel, S.B., Roberts, C.W., Biegel, J.A., Stegmaier, K., Bass, A.J., Garraway, L.A., Meyerson, M., Golub, T.R., Gordenin, D.A., Sunyaev, S., Lander, E.S., Getz, G., 2013. Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature.* 499, 214-218.
- Le, X.F., Claret, F.X., Lammayot, A., Tian, L., Deshpande, D., LaPushin, R., Tari, A.M., Bast, R.C., Jr., 2003. The role of cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 in anti-HER2 antibody-induced G1 cell cycle arrest and tumor growth inhibition. *J Biol Chem.* 278, 23441-23450.
- Lebeau, B., Chastang, C., Muir, J.F., Vincent, J., Massin, F., Fabre, C., 1993. No effect of an antiaggregant treatment with aspirin in small cell lung cancer treated with CCAVP16 chemotherapy. Results from a randomized clinical trial of 303 patients. The "Petites Cellules" Group. *Cancer.* 71, 1741-1745.
- Ledford, H., 2015. Cancer-fighting viruses win approval. *Nature.* 526, 622-623.
- Lee, H.Y., Crawley, S., Hokari, R., Kwon, S., Kim, Y.S., 2010. Bile acid regulates MUC2 transcription in colon cancer cells via positive EGFR/PKC/Ras/ERK/CREB, PI3K/Akt/IkappaB/NF-kappaB and p38/MSK1/CREB pathways and negative JNK/c-Jun/AP-1 pathway. *Int J Oncol.* 36, 941-953.
- Lee, Y.K., Mazmanian, S.K., 2010. Has the microbiota played a critical role in the evolution of the adaptive immune system? *Science.* 330, 1768-1773.
- Lefebvre, P., Cariou, B., Lien, F., Kuipers, F., Staels, B., 2009. Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation. *Physiol. Rev.* 89, 147-191.
- Leibovich, S.J., Polverini, P.J., Shepard, H.M., Wiseman, D.M., Shively, V., Nuseir, N., 1987. Macrophage-induced angiogenesis is mediated by tumour necrosis factor-alpha. *Nature.* 329, 630-632.
- Li, A., Dubey, S., Varney, M.L., Dave, B.J., Singh, R.K., 2003. IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. *J Immunol.* 170, 3369-3376.
- Li, T., Chiang, J.Y., 2014. Bile acid signaling in metabolic disease and drug therapy. *Pharmacol Rev.* 66, 948-983.
- Lien, K., Georgsdottir, S., Sivanathan, L., Chan, K., Emmenegger, U., 2013. Low-dose metronomic chemotherapy: a systematic literature analysis. *Eur J Cancer.* 49, 3387-3395.
- Lievre, A., Bachet, J.B., Boige, V., Cayre, A., Le Corre, D., Buc, E., Ychou, M., Bouche, O., Landi, B., Louvet, C., Andre, T., Bibeau, F., Diebold, M.D., Rougier, P., Ducreux, M., Tomasic, G., Emile, J.F., Penault-Llorca, F., Laurent-Puig, P., 2008. KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 26, 374-379.
- Lievre, A., Bachet, J.B., Le Corre, D., Boige, V., Landi, B., Emile, J.F., Cote, J.F., Tomasic, G., Penna, C., Ducreux, M., Rougier, P., Penault-Llorca, F., Laurent-Puig, P., 2006. KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res.* 66, 3992-3995.
- Liikanen, I., Ahtiainen, L., Hirvonen, M.L., Bramante, S., Cerullo, V., Nokisalmi, P., Hemminki, O., Diaconu, I., Pesonen, S., Koski, A., Kangasniemi, L., Pesonen, S.K., Oksanen, M., Laasonen, L., Partanen, K., Joensuu, T., Zhao, F., Kanerva, A.,

- Hemminki, A., 2013. Oncolytic adenovirus with temozolomide induces autophagy and antitumor immune responses in cancer patients. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 21, 1212-1223.
- Lippi, G., Franchini, M., Biasiutti, C., Dellagiocoma, G., Salvagno, G.L., Guidi, G.C., 2007. Increased D-dimer value and occult cancer in the absence of detectable thrombosis. *Haematologica*. 92, e53-55.
- Lipton, A., Scialla, S., Harvey, H., Dixon, R., Gordon, R., Hamilton, R., Ramsey, H., Weltz, M., Heckard, R., White, D., 1982. Adjuvant antiplatelet therapy with aspirin in colo-rectal cancer. *Journal of medicine*. 13, 419-429.
- Literak, I., Mrlik, V., Hovorkova, A., Mikulicek, P., Lengyel, J., Stastny, K., Cepak, J., Dubska, L., 2007. Origin and genetic structure of white-tailed sea eagles (*Haliaeetus albicilla*) in the Czech Republic: an analysis of breeding distribution, ringing data and DNA microsatellites. *Eur J Wildl Res*. 53, 195-203.
- Literak, I., Stekolnikov, A.A., Sychra, O., Dubska, L., Taragelova, V., 2008. Larvae of chigger mites *Neotrombicula* spp. (Acari: Trombiculidae) exhibited *Borrelia* but no *Anaplasma* infections: a field study including birds from the Czech Carpathians as hosts of chiggers. *Experimental & applied acarology*. 44, 307-314.
- Littman, D.R., 2015. Releasing the Brakes on Cancer Immunotherapy. *Cell*. 162, 1186-1190.
- Liu, W., Lin, Y.T., Yan, X.L., Ding, Y.L., Wu, Y.L., Chen, W.N., Lin, X., 2015. Hepatitis B virus core protein inhibits Fas-mediated apoptosis of hepatoma cells via regulation of mFas/FasL and sFas expression. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 29, 1113-1123.
- Lou, Y., Diao, L., Parra Cuentas, E.R., Denning, W.L., Chen, L., Fan, Y.H., Byers, L.A., Wang, J., Papadimitrakopoulou, V.A., Behrens, C., Rodriguez, J., Hwu, P., Wistuba, II, Heymach, J.V., Gibbons, D.L., 2016. Epithelial-mesenchymal transition is associated with a distinct tumor microenvironment including elevation of inflammatory signals and multiple immune checkpoints in lung adenocarcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*.
- Loupakis, F., Ruzzo, A., Salvatore, L., Cremolini, C., Masi, G., Frumento, P., Schirripa, M., Catalano, V., Galluccio, N., Canestrari, E., Vincenzi, B., Santini, D., Bencardino, K., Ricci, V., Manzoni, M., Danova, M., Tonini, G., Magnani, M., Falcone, A., Graziano, F., 2011. Retrospective exploratory analysis of VEGF polymorphisms in the prediction of benefit from first-line FOLFIRI plus bevacizumab in metastatic colorectal cancer. *BMC Cancer*. 11, 247.
- Loza, M.J., Metelitsa, L.S., Perussia, B., 2002. NKT and T cells: coordinate regulation of NK-like phenotype and cytokine production. *Eur J Immunol*. 32, 3453-3462.
- Lu, P.H., Negrin, R.S., 1994. A novel population of expanded human CD3+CD56+ cells derived from T cells with potent in vivo antitumor activity in mice with severe combined immunodeficiency. *J Immunol*. 153, 1687-1696.
- Lyte, M., 2010. The microbial organ in the gut as a driver of homeostasis and disease. *Medical hypotheses*. 74, 634-638.
- Lyte, M., 2016. Microbial Endocrinology: An Ongoing Personal Journey. *Adv. Exp. Med. Biol*. 874, 1-24.
- Ma, J., Giovannucci, E., Pollak, M., Leavitt, A., Tao, Y., Gaziano, J.M., Stampfer, M.J., 2004. A prospective study of plasma C-peptide and colorectal cancer risk in men. *J. Natl. Cancer Inst*. 96, 546-553.
- Ma, Y., Chapman, J., Levine, M., Polireddy, K., Drisko, J., Chen, Q., 2014. High-dose parenteral ascorbate enhanced chemosensitivity of ovarian cancer and reduced toxicity of chemotherapy. *Science translational medicine*. 6, 222ra218.
- Macfarlane, S., Macfarlane, G.T., 2003. Regulation of short-chain fatty acid production. *Proc Nutr Soc*. 62, 67-72.
- Mahadevan, D., Von Hoff, D.D., 2007. Tumor-stroma interactions in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Mol Cancer Ther*. 6, 1186-1197.
- Malhotra, A., Bath, S., Elbarbry, F., 2015. An Organ System Approach to Explore the Antioxidative, Anti-Inflammatory, and Cytoprotective Actions of Resveratrol. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2015, 803971.
- Malumbres, M., Barbacid, M., 2003. RAS oncogenes: the first 30 years. *Nature reviews. Cancer*. 3, 459-465.
- Man, C.B., Kwan, P., Baum, L., Yu, E., Lau, K.M., Cheng, A.S., Ng, M.H., 2007. Association between HLA-B*1502 allele and antiepileptic drug-induced cutaneous reactions in Han Chinese. *Epilepsia*. 48, 1015-1018.
- Manavalan, J.S., Rossi, P.C., Vlad, G., Piazza, F., Yarilina, A., Cortesini, R., Mancini, D., Suci-Foca, N., 2003. High expression of ILT3 and ILT4 is a general feature of tolerogenic dendritic cells. *Transpl Immunol*. 11, 245-258.
- Manegold, P.C., Hutter, J., Pahernik, S.A., Messmer, K., Dellian, M., 2003. Platelet-endothelial interaction in tumor angiogenesis and microcirculation. *Blood*. 101, 1970-1976.
- Manoochchri, M., Karbasi, A., Bandehpour, M., Kazemi, B., 2014. Down-regulation of BAX gene during carcinogenesis and acquisition of resistance to 5-FU in colorectal cancer. *Pathology oncology research : POR*. 20, 301-307.
- Maraveyas, A., Lam, T., Hetherington, J.W., Greenman, J., 2005. Can a rational design for metronomic chemotherapy dosing be devised? *Br J Cancer*. 92, 1588-1590.

- Martens, A., Wistuba-Hamprecht, K., Geukes Foppen, M.H., Yuan, J., Postow, M.A., Wong, P., Romano, E., Khammari, A., Dreno, B., Capone, M., Ascierto, P.A., Di Giacomo, A.M., Maio, M., Schilling, B., Sucker, A., Schadendorf, D., Hassel, J.C., Eigentler, T.K., Martus, P., Wolchok, J.D., Blank, C.U., Pawelec, G., Garbe, C., Weide, B., 2016. Baseline peripheral blood biomarkers associated with clinical outcome of advanced melanoma patients treated with ipilimumab. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*.
- Matalova, E., Dubska, L., Fleischmannova, J., Chlastakova, I., Janeckova, E., Tucker, A.S., 2010. Cell proliferation and apoptosis in the primary enamel knot measured by flow cytometry of laser microdissected samples. *Archives of oral biology*. 55, 570-575.
- Matalova, E., Holesovska, Z., Dubska, L., Fellnerova, I., Misek, I., Doubek, J., 2007. *Physiology I. Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR*.
- Matsuo, Y., Campbell, P.M., Brekken, R.A., Sung, B., Ouellette, M.M., Fleming, J.B., Aggarwal, B.B., Der, C.J., Guha, S., 2009. K-Ras promotes angiogenesis mediated by immortalized human pancreatic epithelial cells through mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Molecular cancer research : MCR*. 7, 799-808.
- Matzinger, P., 2002. The danger model: a renewed sense of self. *Science*. 296, 301-305.
- Maurer, T., Heit, A., Hochrein, H., Ampenberger, F., O'Keeffe, M., Bauer, S., Lipford, G.B., Vabulas, R.M., Wagner, H., 2002. CpG-DNA aided cross-presentation of soluble antigens by dendritic cells. *Eur. J. Immunol*. 32, 2356-2364.
- Mayne, C.G., Spanier, J.A., Relland, L.M., Williams, C.B., Hayes, C.E., 2011. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 acts directly on the T lymphocyte vitamin D receptor to inhibit experimental autoimmune encephalomyelitis. *Eur. J. Immunol*. 41, 822-832.
- McCray, A.N., 2014. TRAIL mediated reduction of an immunogenic cell death protein, heat shock protein 70, in glioblastoma.
- McGranahan, N., Furness, A.J., Rosenthal, R., Ramskov, S., Lyngaa, R., Saini, S.K., Jamal-Hanjani, M., Wilson, G.A., Birkbak, N.J., Hiley, C.T., Watkins, T.B., Shafi, S., Murugaesu, N., Mitter, R., Akarca, A.U., Linares, J., Marafioti, T., Henry, J.Y., Van Allen, E.M., Miao, D., Schilling, B., Schadendorf, D., Garraway, L.A., Makarov, V., Rizvi, N.A., Snyder, A., Hellmann, M.D., Merghoub, T., Wolchok, J.D., Shukla, S.A., Wu, C.J., Peggs, K.S., Chan, T.A., Hadrup, S.R., Quezada, S.A., Swanton, C., 2016. Clonal neoantigens elicit T cell immunoreactivity and sensitivity to immune checkpoint blockade. *Science*.
- McKenzie, S.E., Schreiber, A.D., 1994. Biological advances and clinical applications of Fc receptors for IgG. *Current opinion in hematology*. 1, 45-52.
- McWhorter, W.P., 1988. Allergy and risk of cancer. A prospective study using NHANESI followup data. *Cancer*. 62, 451-455.
- Medzhitov, R., 2007. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*. 449, 819-826.
- Mehlen, P., Tauszig-Delamasure, S., 2014. Dependence receptors and colorectal cancer. *Gut*. 63, 1821-1829.
- Meirow, Y., Kanterman, J., Baniyash, M., 2015. Paving the Road to Tumor Development and Spreading: Myeloid-Derived Suppressor Cells are Ruling the Fate. *Frontiers in immunology*. 6, 523.
- Meng, X., Huang, Z., Teng, F., Xing, L., Yu, J., 2015. Predictive biomarkers in PD-1/PD-L1 checkpoint blockade immunotherapy. *Cancer treatment reviews*. 41, 868-876.
- Menger, L., Vacchelli, E., Adjemian, S., Martins, I., Ma, Y., Shen, S., Yamazaki, T., Sukkurwala, A.Q., Michaud, M., Mignot, G., Schlemmer, F., Sulpice, E., Locher, C., Gidrol, X., Ghiringhelli, F., Modjtahedi, N., Galluzzi, L., Andre, F., Zitvogel, L., Kepp, O., Kroemer, G., 2012. Cardiac glycosides exert anticancer effects by inducing immunogenic cell death. *Science translational medicine*. 4, 143ra199.
- Michaud, D.S., Wolpin, B., Giovannucci, E., Liu, S., Cochrane, B., Manson, J.E., Pollak, M.N., Ma, J., Fuchs, C.S., 2007. Prediagnostic plasma C-peptide and pancreatic cancer risk in men and women. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 16, 2101-2109.
- Michels, K.B., Solomon, C.G., Hu, F.B., Rosner, B.A., Hankinson, S.E., Colditz, G.A., Manson, J.E., 2003. Type 2 diabetes and subsequent incidence of breast cancer in the Nurses' Health Study. *Diabetes care*. 26, 1752-1758.
- Mineo, J.F., Bordron, A., Quintin-Roue, I., Loisel, S., Ster, K.L., Buhe, V., Lagarde, N., Berthou, C., 2004. Recombinant humanised anti-HER2/neu antibody (Herceptin) induces cellular death of glioblastomas. *Br J Cancer*. 91, 1195-1199.
- Minchinton, A.I., Tannock, I.F., 2006. Drug penetration in solid tumours. *Nature reviews. Cancer*. 6, 583-592.
- Mittal, D., Gubin, M.M., Schreiber, R.D., Smyth, M.J., 2014. New insights into cancer immunoediting and its three component phases--elimination, equilibrium and escape. *Curr Opin Immunol*. 27, 16-25.

- Modlin, R.L., Pirmez, C., Hofman, F.M., Torigian, V., Uyemura, K., Rea, T.H., Bloom, B.R., Brenner, M.B., 1989. Lymphocytes bearing antigen-specific gamma delta T-cell receptors accumulate in human infectious disease lesions. *Nature*. 339, 544-548.
- Mohamed-Ali, V., Goodrick, S., Rawesh, A., Katz, D.R., Miles, J.M., Yudkin, J.S., Klein, S., Coppack, S.W., 1997. Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-alpha, in vivo. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 82, 4196-4200.
- Mohsin, S.K., Weiss, H.L., Gutierrez, M.C., Chamness, G.C., Schiff, R., Digiovanna, M.P., Wang, C.X., Hilsenbeck, S.G., Osborne, C.K., Allred, D.C., Elledge, R., Chang, J.C., 2005. Neoadjuvant trastuzumab induces apoptosis in primary breast cancers. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 23, 2460-2468.
- Monk, B.J., Poveda, A., Vergote, I., Raspagliesi, F., Fujiwara, K., Bae, D.S., Oaknin, A., Ray-Coquard, I., Provencher, D.M., Karlan, B.Y., Lhomme, C., Richardson, G., Rincon, D.G., Coleman, R.L., Herzog, T.J., Marth, C., Brize, A., Fabbro, M., Redondo, A., Bamias, A., Tassoudji, M., Navale, L., Warner, D.J., Oza, A.M., 2014. Anti-angiopoietin therapy with trebananib for recurrent ovarian cancer (TRINOVA-1): a randomised, multicentre, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. *The Lancet. Oncology*. 15, 799-808.
- Monti, D.A., Mitchell, E., Bazzan, A.J., Littman, S., Zabrecky, G., Yeo, C.J., Pillai, M.V., Newberg, A.B., Deshmukh, S., Levine, M., 2012. Phase I evaluation of intravenous ascorbic acid in combination with gemcitabine and erlotinib in patients with metastatic pancreatic cancer. *PLoS one*. 7, e29794.
- Morgan, D.J., Kreuwel, H.T., Fleck, S., Levitsky, H.I., Pardoll, D.M., Sherman, L.A., 1998. Activation of low avidity CTL specific for a self epitope results in tumor rejection but not autoimmunity. *J Immunol*. 160, 643-651.
- Morisset, M., Richard, C., Astier, C., Jacquenet, S., Croizier, A., Beaudouin, E., Cordebar, V., Morel-Codreanu, F., Petit, N., Moneret-Vautrin, D.A., Kanny, G., 2012. Anaphylaxis to pork kidney is related to IgE antibodies specific for galactose-alpha-1,3-galactose. *Allergy*. 67, 699-704.
- Morita, C.T., Beckman, E.M., Bukowski, J.F., Tanaka, Y., Band, H., Bloom, B.R., Golan, D.E., Brenner, M.B., 1995. Direct presentation of nonpeptide prenyl pyrophosphate antigens to human gamma delta T cells. *Immunity*. 3, 495-507.
- Moroni, M., Veronese, S., Benvenuti, S., Marrapese, G., Sartore-Bianchi, A., Di Nicolantonio, F., Gambacorta, M., Siena, S., Bardelli, A., 2005. Gene copy number for epidermal growth factor receptor (EGFR) and clinical response to antiEGFR treatment in colorectal cancer: a cohort study. *The Lancet. Oncology*. 6, 279-286.
- Motrich, R.D., van Etten, E., Depovere, J., Riera, C.M., Rivero, V.E., Mathieu, C., 2009. Impact of vitamin D receptor activity on experimental autoimmune prostatitis. *J Autoimmun*. 32, 140-148.
- Mousa, S.A., 2004. Low-molecular-weight heparins in thrombosis and cancer: emerging links. *Cardiovascular drug reviews*. 22, 121-134.
- Myskowski, P.L., Straus, D.J., Safai, B., 1990. Lymphoma and other HIV-associated malignancies. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 22, 1253-1260.
- Nagy, J.A., Chang, S.H., Shih, S.C., Dvorak, A.M., Dvorak, H.F., 2010. Heterogeneity of the tumor vasculature. *Seminars in thrombosis and hemostasis*. 36, 321-331.
- Naidu, K.A., 2003. Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An overview. *Nutrition journal*. 2, 7.
- Nazario, S., Das, S., de Silva, A.M., Deponte, K., Marcantonio, N., Anderson, J.F., Fish, D., Fikrig, E., Kantor, F.S., 1998. Prevention of *Borrelia burgdorferi* transmission in guinea pigs by tick immunity. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 58, 780-785.
- NCT00668382.
- NCT00668512.
- Nemecek, V., 2003. Sérologický přehled ČR v roce 2001 – virová hepatitida A, B, C. *Zprávy CEM*. 12, 55-61.
- Nesmelova, I.V., Sham, Y., Dudek, A.Z., van Eijk, L.I., Wu, G., Slungaard, A., Mortari, F., Griffioen, A.W., Mayo, K.H., 2005. Platelet factor 4 and interleukin-8 CXC chemokine heterodimer formation modulates function at the quaternary structural level. *J. Biol. Chem*. 280, 4948-4958.
- Neufeld, G., Kessler, O., 2008. The semaphorins: versatile regulators of tumour progression and tumour angiogenesis. *Nature reviews. Cancer*. 8, 632-645.
- Neuman, H., Debelius, J.W., Knight, R., Koren, O., 2015. Microbial endocrinology: the interplay between the microbiota and the endocrine system. *FEMS Microbiol Rev*. 39, 509-521.
- Ng, K., Wolpin, B.M., Meyerhardt, J.A., Wu, K., Chan, A.T., Hollis, B.W., Giovannucci, E.L., Stampfer, M.J., Willett, W.C., Fuchs, C.S., 2009. Prospective study of predictors of vitamin D status and survival in patients with colorectal cancer. *Br J Cancer*. 101, 916-923.

- Nieminen, U., Kauppila, A., Gronroos, M., Kuoppala, T., Vayrynen, M., 1990. Placebo-controlled study on the efficacy of the pyrimido-pyrimidine derivative RA 233 in ovarian cancer. *Gynecologic oncology*. 36, 226-231.
- Nicholaou, T., Chen, W., Davis, I.D., Jackson, H.M., Dimopoulos, N., Barrow, C., Browning, J., Macgregor, D., Williams, D., Hopkins, W., Maraskovsky, E., Venhaus, R., Pan, L., Hoffman, E.W., Old, L.J., Cebon, J., 2011. Immunoediting and persistence of antigen-specific immunity in patients who have previously been vaccinated with NY-ESO-1 protein formulated in ISCOMATRIX. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*. 60, 1625-1637.
- Nishimura, T., Nakui, M., Sato, M., Iwakabe, K., Kitamura, H., Sekimoto, M., Ohta, A., Koda, T., Nishimura, S., 2000. The critical role of Th1-dominant immunity in tumor immunology. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 46 Suppl, S52-61.
- Noonan, D.M., De Lerma Barbaro, A., Vannini, N., Mortara, L., Albini, A., 2008. Inflammation, inflammatory cells and angiogenesis: decisions and indecisions. *Cancer metastasis reviews*. 27, 31-40.
- Nordlund, J.J., Kirkwood, J.M., Forget, B.M., Milton, G., Albert, D.M., Lerner, A.B., 1983. Vitiligo in patients with metastatic melanoma: a good prognostic sign. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 9, 689-696.
- Nugent, J.L., McCoy, A.N., Addamo, C.J., Jia, W., Sandler, R.S., Keku, T.O., 2014. Altered tissue metabolites correlate with microbial dysbiosis in colorectal adenomas. *Journal of proteome research*. 13, 1921-1929.
- Nunez, R., Carballada, F., Gonzalez-Quintela, A., Gomez-Rial, J., Boquete, M., Vidal, C., 2011. Delayed mammalian meat-induced anaphylaxis due to galactose-alpha-1,3-galactose in 5 European patients. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 128, 1122-1124 e1121.
- Obeid, M., Tesniere, A., Ghiringhelli, F., Fimia, G.M., Apetoh, L., Perfettini, J.L., Castedo, M., Mignot, G., Panaretakis, T., Casares, N., Metivier, D., Larochette, N., van Endert, P., Ciccocanti, F., Piacentini, M., Zitvogel, L., Kroemer, G., 2007. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med*. 13, 54-61.
- Obermannova, R., Demlova, R., Drabova, K., Melicharkova, K., Greplova, K., Mrkvicova, M., Zdrzilova-Dubska, L., Vyzula, R., Valik, D., 2014. [Vitamin D as an important steroid hormone in breast cancer]. *Klinicka onkologie : casopis Ceske a Slovenske onkologicke spolocnosti*. 27 Suppl 1, S143-149.
- Obermannova, R., Dusek, L., Greplova, K., Jarkovsky, J., Sterba, J., Vyzula, R., Demlova, R., Zdrzilova-Dubska, L., Valik, D., 2015. Time-course pattern of blood 25-hydroxycholecalciferol is a significant predictor of survival outcome in metastatic colorectal cancer: a clinical practice-based study. *Neoplasma*. 62, 958-965.
- Ogawa, M., Yamamoto, H., Nagano, H., Miyake, Y., Sugita, Y., Hata, T., Kim, B.N., Ngan, C.Y., Damdinsuren, B., Ikenaga, M., Ikeda, M., Ohue, M., Nakamori, S., Sekimoto, M., Sakon, M., Matsuura, N., Monden, M., 2004. Hepatic expression of ANG2 RNA in metastatic colorectal cancer. *Hepatology*. 39, 528-539.
- Ogawa, Y., Calhoun, W.J., 2006. The role of leukotrienes in airway inflammation. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 118, 789-798; quiz 799-800.
- Oh, Y.T., Yue, P., Zhou, W., Balko, J.M., Black, E.P., Owonikoko, T.K., Khuri, F.R., Sun, S.Y., 2012. Oncogenic Ras and B-Raf proteins positively regulate death receptor 5 expression through co-activation of ERK and JNK signaling. *J Biol Chem*. 287, 257-267.
- Ohl, L., Mohaupt, M., Czeloth, N., Hintzen, G., Kiafard, Z., Zwirner, J., Blankenstein, T., Henning, G., Forster, R., 2004. CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions. *Immunity*. 21, 279-288.
- Okada, F., Rak, J.W., Croix, B.S., Lieubeau, B., Kaya, M., Roncari, L., Shirasawa, S., Sasazuki, T., Kerbel, R.S., 1998. Impact of oncogenes in tumor angiogenesis: mutant K-ras up-regulation of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is necessary, but not sufficient for tumorigenicity of human colorectal carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95, 3609-3614.
- Oronsky, B., Carter, C.A., Mackie, V., Scicinski, J., Oronsky, A., Oronsky, N., Caroan, S., Parker, C., Lybeck, M., Reid, T., 2014. The war on cancer: a military perspective. *Frontiers in oncology*. 4, 387.
- Orosz, P., Echtenacher, B., Falk, W., Ruschoff, J., Weber, D., Mannel, D.N., 1993. Enhancement of experimental metastasis by tumor necrosis factor. *J. Exp. Med*. 177, 1391-1398.
- Oslejskova, H., Horinova, V., Sterba, J., Pavelka, Z., Babovic-Vuksanovic, D., Dubska, L., Valik, D., 2008. Malignant intracranial germinoma in Smith-Lemli-Opitz syndrome: cholesterol homeostasis possibly connecting morphogenesis and cancer development. *Journal of pediatric hematology/oncology*. 30, 689-691.
- Pabla, B., Bissonnette, M., Konda, V.J., 2015. Colon cancer and the epidermal growth factor receptor: Current treatment paradigms, the importance of diet, and the role of chemoprevention. *World journal of clinical oncology*. 6, 133-141.
- Palmer, M.T., Lee, Y.K., Maynard, C.L., Oliver, J.R., Bikle, D.D., Jetten, A.M., Weaver, C.T., 2011. Lineage-specific effects of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) on the development of effector CD4 T cells. *J. Biol. Chem*. 286, 997-1004.
- Panigrahy, D., Kaipainen, A., Butterfield, C.E., Chaponis, D.M., Laforme, A.M., Folkman, J., Kieran, M.W., 2010. Inhibition of tumor angiogenesis by oral etoposide. *Experimental and therapeutic medicine*. 1, 739-746.

- Park, E.J., Lee, J.H., Yu, G.Y., He, G., Ali, S.R., Holzer, R.G., Osterreicher, C.H., Takahashi, H., Karin, M., 2010. Dietary and genetic obesity promote liver inflammation and tumorigenesis by enhancing IL-6 and TNF expression. *Cell*. 140, 197-208.
- Parkin, D.M., Bray, F.I., Devesa, S.S., 2001. Cancer burden in the year 2000. The global picture. *Eur J Cancer*. 37 Suppl 8, S4-66.
- Pawelec, G., 2014. Immunosenesescence: role of cytomegalovirus. *Exp Gerontol*. 54, 1-5.
- Perollet, C., Han, Z.C., Savona, C., Caen, J.P., Bikfalvi, A., 1998. Platelet factor 4 modulates fibroblast growth factor 2 (FGF-2) activity and inhibits FGF-2 dimerization. *Blood*. 91, 3289-3299.
- Peterson, J.E., Zurakowski, D., Italiano, J.E., Jr., Michel, L.V., Connors, S., Oenick, M., D'Amato, R.J., Klement, G.L., Folkman, J., 2012. VEGF, PF4 and PDGF are elevated in platelets of colorectal cancer patients. *Angiogenesis*. 15, 265-273.
- Peterson, J.E., Zurakowski, D., Italiano, J.E., Jr., Michel, L.V., Fox, L., Klement, G.L., Folkman, J., 2010. Normal ranges of angiogenesis regulatory proteins in human platelets. *American journal of hematology*. 85, 487-493.
- Philippe, C., Philippe, B., Fouqueray, B., Perez, J., Leuret, M., Baud, L., 1993. Protection from tumor necrosis factor-mediated cytotoxicity by platelets. *Am J Pathol*. 143, 1713-1723.
- Pilatova, K., 2010. Proteomické přístupy v onkologii: separační metody, SELDI-TOF MS a imunoanalýzy při studiu nádorové angiogeneze. Diplomová práce. Mgr.
- Pilatova, K., Greplova, K., Demlova, R., Bencsikova, B., Klement, G.L., Zdrzilova-Dubská, L., 2013. Role of platelet chemokines, PF-4 and CTAP-III, in cancer biology. *Journal of hematology & oncology*. 6, 42.
- Pilatova, K., Zdrzilova-Dubská, L., Klement, G.L., 2012. The role of platelets in tumour growth. *Klinická onkologie : časopis Ceske a Slovenske onkologicke spolecnosti*. 25 Suppl 2, 2S50-57.
- Piper, E.K., Jonsson, N.N., Gondro, C., Lew-Tabor, A.E., Moolhuijzen, P., Vance, M.E., Jackson, L.A., 2009. Immunological profiles of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle infested with the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Clinical and vaccine immunology : CVI*. 16, 1074-1086.
- Plebani, M., 2012. HE4 in gynecological cancers: report of a European investigators and experts meeting. *Clinical chemistry and laboratory medicine*. 50, 2127-2136.
- Podrazil, M., Horvath, R., Becht, E., Rozkova, D., Bilkova, P., Sochorova, K., Hromadkova, H., Kayserova, J., Vavrova, K., Lastovicka, J., Vrabцова, P., Kubackova, K., Gasova, Z., Jarolim, L., Babjuk, M., Spisek, R., Bartunkova, J., Fucikova, J., 2015. Phase I/II clinical trial of dendritic-cell based immunotherapy (DCVAC/PCa) combined with chemotherapy in patients with metastatic, castration-resistant prostate cancer. *Oncotarget*. 6, 18192-18205.
- Pol, J., Vacchelli, E., Aranda, F., Castoldi, F., Eggermont, A., Cremer, I., Sautes-Fridman, C., Fucikova, J., Galon, J., Spisek, R., Tartour, E., Zitvogel, L., Kroemer, G., Galluzzi, L., 2015. Trial Watch: Immunogenic cell death inducers for anticancer chemotherapy. *Oncoimmunology*. 4, e1008866.
- Pollard, J.W., 2004. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nature reviews. Cancer*. 4, 71-78.
- Preston, S.G., Majtan, J., Kouremenou, C., Rysnik, O., Burger, L.F., Cabezas Cruz, A., Chiong Guzman, M., Nunn, M.A., Paesen, G.C., Nuttall, P.A., Austyn, J.M., 2013. Novel immunomodulators from hard ticks selectively reprogramme human dendritic cell responses. *PLoS Pathog*. 9, e1003450.
- Price, T.J., Hardingham, J.E., Lee, C.K., Weickhardt, A., Townsend, A.R., Wrin, J.W., Chua, A., Shivasami, A., Cummins, M.M., Murone, C., Tebbutt, N.C., 2011. Impact of KRAS and BRAF Gene Mutation Status on Outcomes From the Phase III AGITG MAX Trial of Capecitabine Alone or in Combination With Bevacizumab and Mitomycin in Advanced Colorectal Cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 29, 2675-2682.
- Profet, M., 1991. The function of allergy: immunological defense against toxins. *Q. Rev. Biol*. 66, 23-62.
- Pryke, A.M., Duggan, C., White, C.P., Posen, S., Mason, R.S., 1990. Tumor necrosis factor-alpha induces vitamin D-1-hydroxylase activity in normal human alveolar macrophages. *J Cell Physiol*. 142, 652-656.
- Qiao, L., Studer, E., Leach, K., McKinstry, R., Gupta, S., Decker, R., Kukreja, R., Valerie, K., Nagarkatti, P., El Deiry, W., Molkentin, J., Schmidt-Ullrich, R., Fisher, P.B., Grant, S., Hylemon, P.B., Dent, P., 2001. Deoxycholic acid (DCA) causes ligand-independent activation of epidermal growth factor receptor (EGFR) and FAS receptor in primary hepatocytes: inhibition of EGFR/mitogen-activated protein kinase-signaling module enhances DCA-induced apoptosis. *Mol Biol Cell*. 12, 2629-2645.
- Qiu, Y., Xu, M.B., Yun, M.M., Wang, Y.Z., Zhang, R.M., Meng, X.K., Ou-Yang, X.H., Yun, S., 2011. Hepatocellular carcinoma-specific immunotherapy with synthesized alpha1,3- galactosyl epitope-pulsed dendritic cells and cytokine-induced killer cells. *World journal of gastroenterology : WJG*. 17, 5260-5266.

- Rabinovich, G.A., Gabrilovich, D., Sotomayor, E.M., 2007. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annu Rev Immunol.* 25, 267-296.
- Rak, J., Mitsuhashi, Y., Bayko, L., Filmus, J., Shirasawa, S., Sasazuki, T., Kerbel, R.S., 1995. Mutant ras oncogenes upregulate VEGF/VPF expression: implications for induction and inhibition of tumor angiogenesis. *Cancer Res.* 55, 4575-4580.
- Rak, J., Yu, J.L., Kerbel, R.S., Coomber, B.L., 2002. What do oncogenic mutations have to do with angiogenesis/vascular dependence of tumors? *Cancer Res.* 62, 1931-1934.
- Rao, B., Gao, Y., Huang, J., Gao, X., Fu, X., Huang, M., Yao, J., Wang, J., Li, W., Zhang, J., Liu, H., Wang, L., 2011. Mutations of p53 and K-ras correlate TF expression in human colorectal carcinomas: TF downregulation as a marker of poor prognosis. *International journal of colorectal disease.* 26, 593-601.
- Ray, M., Hostetter, D.R., Loeb, C.R., Simko, J., Craik, C.S., 2012. Inhibition of Granzyme B by PI-9 protects prostate cancer cells from apoptosis. *The Prostate.* 72, 846-855.
- Reeves, G.K., Pirie, K., Beral, V., Green, J., Spencer, E., Bull, D., 2007. Cancer incidence and mortality in relation to body mass index in the Million Women Study: cohort study. *BMJ.* 335, 1134.
- Reynolds, L.M., Dalton, C.F., Reynolds, G.P., 2001. Phospholipid fatty acids and neurotoxicity in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Neurosci. Lett.* 309, 193-196.
- Ribas, A., 2015. Releasing the Brakes on Cancer Immunotherapy. *The New England journal of medicine.* 373, 1490-1492.
- Ridlon, J.M., Bajaj, J.S., 2015. The human gut sterolbiome: bile acid-microbiome endocrine aspects and therapeutics. *Acta pharmaceutica Sinica. B.* 5, 99-105.
- Rihacek, M., Bienertova-Vasku, J., Valik, D., Sterba, J., Pilatova, K., Zdrzilova-Dubská, L., 2015. B-Cell Activating Factor as a Cancer Biomarker and Its Implications in Cancer-Related Cachexia. *BioMed research international.* 2015, 792187.
- Rincon-Orozco, B., Kunzmann, V., Wrobel, P., Kabelitz, D., Steinle, A., Herrmann, T., 2005. Activation of V gamma 9V delta 2 T cells by NKG2D. *J Immunol.* 175, 2144-2151.
- Robison, N.J., Campigotto, F., Chi, S.N., Manley, P.E., Turner, C.D., Zimmerman, M.A., Chordas, C.A., Werger, A.M., Allen, J.C., Goldman, S., Rubin, J.B., Isakoff, M.S., Pan, W.J., Khatib, Z.A., Comito, M.A., Bendel, A.E., Pietrantonio, J.B., Kondrat, L., Hubbs, S.M., Neuberg, D.S., Kieran, M.W., 2014. A phase II trial of a multi-agent oral antiangiogenic (metronomic) regimen in children with recurrent or progressive cancer. *Pediatric blood & cancer.* 61, 636-642.
- Rosenberg, S.A., Yang, J.C., Restifo, N.P., 2004. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med.* 10, 909-915.
- Rothwell, P.M., Wilson, M., Elwin, C.E., Norrving, B., Algra, A., Warlow, C.P., Meade, T.W., 2010. Long-term effect of aspirin on colorectal cancer incidence and mortality: 20-year follow-up of five randomised trials. *Lancet.* 376, 1741-1750.
- Roubalova, E., Kvardova, V., Hrstka, R., Borilova, S., Michalova, E., Dubská, L., Müller, P., Sova, P., Vojtesek, B., 2010. The effect of cellular environment and p53 status on the mode of action of the platinum derivative LA-12. *Investigational new drugs.* 28, 445-453.
- Roux, S., Apetoh, L., Chalmin, F., Ladoire, S., Mignot, G., Puig, P.E., Lauvau, G., Zitvogel, L., Martin, F., Chauffert, B., Yagita, H., Solary, E., Ghiringhelli, F., 2008. CD4+CD25+ Tregs control the TRAIL-dependent cytotoxicity of tumor-infiltrating DCs in rodent models of colon cancer. *The Journal of clinical investigation.* 118, 3751-3761.
- Rozkova, D., Tiserova, H., Fucikova, J., Last'ovicka, J., Podrazil, M., Ulcova, H., Budinsky, V., Prausova, J., Linke, Z., Minarik, I., Sediva, A., Spisek, R., Bartunkova, J., 2009. FOCUS on FOCIS: combined chemo-immunotherapy for the treatment of hormone-refractory metastatic prostate cancer. *Clin Immunol.* 131, 1-10.
- Russo, M., Russo, G.L., Daglia, M., Kasi, P.D., Ravi, S., Nabavi, S.F., Nabavi, S.M., 2016. Understanding genistein in cancer: The "good" and the "bad" effects: A review. *Food Chem.* 196, 589-600.
- Rutella, S., Zavala, F., Danese, S., Kared, H., Leone, G., 2005. Granulocyte colony-stimulating factor: a novel mediator of T cell tolerance. *J Immunol.* 175, 7085-7091.
- Sabrkhanly, S., Griffioen, A.W., Oude Egbrink, M.G., 2011. The role of blood platelets in tumor angiogenesis. *Biochim Biophys Acta.* 1815, 189-196.
- Sahu, R.P., Batra, S., Kandala, P.K., Brown, T.L., Srivastava, S.K., 2011. The role of K-ras gene mutation in TRAIL-induced apoptosis in pancreatic and lung cancer cell lines. *Cancer chemotherapy and pharmacology.* 67, 481-487.
- Saito, H., Kranz, D.M., Takagaki, Y., Hayday, A.C., Eisen, H.N., Tonegawa, S., 1984. Complete primary structure of a heterodimeric T-cell receptor deduced from cDNA sequences. *Nature.* 309, 757-762.

- Salama, P., Phillips, M., Grieu, F., Morris, M., Zeps, N., Joseph, D., Platell, C., Iacopetta, B., 2009. Tumor-infiltrating FOXP3+ T regulatory cells show strong prognostic significance in colorectal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 27, 186-192.
- Salavoura, K., Kolialex, A., Tsangaris, G., Mavrou, A., 2008. Development of cancer in patients with primary immunodeficiencies. *Anticancer Res*. 28, 1263-1269.
- Saltz, L., Badarinarath, S., Dakhil, S., Bienvenu, B., Harker, W.G., Birchfield, G., Tokaz, L.K., Barrera, D., Conkling, P.R., O'Rourke, M.A., Richards, D.A., Reidy, D., Solit, D., Vakiani, E., Capanu, M., Scales, A., Zhan, F., Boehm, K.A., Asmar, L., Cohn, A., 2012. Phase III trial of cetuximab, bevacizumab, and 5-fluorouracil/leucovorin vs. FOLFOX-bevacizumab in colorectal cancer. *Clinical colorectal cancer*. 11, 101-111.
- Samad, A.K., Taylor, R.S., Marshall, T., Chapman, M.A., 2005. A meta-analysis of the association of physical activity with reduced risk of colorectal cancer. *Colorectal disease : the official journal of the Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland*. 7, 204-213.
- Sandrini, S., Aldriwesh, M., Alruways, M., Freestone, P., 2015. Microbial endocrinology: host-bacteria communication within the gut microbiome. *J. Endocrinol*. 225, R21-34.
- Santagata, S., Thakkar, A., Ergonul, A., Wang, B., Woo, T., Hu, R., Harrell, J.C., McNamara, G., Schwede, M., Culhane, A.C., Kindelberger, D., Rodig, S., Richardson, A., Schnitt, S.J., Tamimi, R.M., Ince, T.A., 2014. Taxonomy of breast cancer based on normal cell phenotype predicts outcome. *The Journal of clinical investigation*. 124, 859-870.
- Seidel, U.J., Schlegel, P., Lang, P., 2013. Natural killer cell mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity in tumor immunotherapy with therapeutic antibodies. *Frontiers in immunology*. 4, 76.
- Semple, J.W., Italiano, J.E., Jr., Freedman, J., 2011. Platelets and the immune continuum. *Nature reviews. Immunology*. 11, 264-274.
- Shaked, Y., Ciarrocchi, A., Franco, M., Lee, C.R., Man, S., Cheung, A.M., Hicklin, D.J., Chaplin, D., Foster, F.S., Benezra, R., Kerbel, R.S., 2006. Therapy-induced acute recruitment of circulating endothelial progenitor cells to tumors. *Science*. 313, 1785-1787.
- Shalapour, S., Font-Burgada, J., Di Caro, G., Zhong, Z., Sanchez-Lopez, E., Dhar, D., Willmsky, G., Ammirante, M., Strasner, A., Hansel, D.E., Jamieson, C., Kane, C.J., Klatter, T., Birner, P., Kenner, L., Karin, M., 2015. Immunosuppressive plasma cells impede T-cell-dependent immunogenic chemotherapy. *Nature*. 521, 94-98.
- Shau, H., Roth, M.D., Golub, S.H., 1993. Regulation of natural killer function by nonlymphoid cells. *Nat Immun*. 12, 235-249.
- Sheikh, N.A., Jones, L.A., 2008. CD54 is a surrogate marker of antigen presenting cell activation. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*. 57, 1381-1390.
- Shepard, H.M., Lewis, G.D., Sarup, J.C., Fendly, B.M., Maneval, D., Mordenti, J., Figari, I., Kotts, C.E., Palladino, M.A., Jr., Ullrich, A., et al., 1991. Monoclonal antibody therapy of human cancer: taking the HER2 protooncogene to the clinic. *J Clin Immunol*. 11, 117-127.
- Sherman, P.W., Holland, E., Sherman, J.S., 2008. Allergies: their role in cancer prevention. *Q. Rev. Biol*. 83, 339-362.
- Sheu, J., Shih Ie, M., 2010. HLA-G and immune evasion in cancer cells. *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan yi zhi*. 109, 248-257.
- Shi, S., Chen, L., Huang, G., 2013. Antiangiogenic therapy improves the antitumor effect of adoptive cell immunotherapy by normalizing tumor vasculature. *Med Oncol*. 30, 698.
- Shojaei, F., Wu, X., Qu, X., Kowanetz, M., Yu, L., Tan, M., Meng, Y.G., Ferrara, N., 2009a. G-CSF-initiated myeloid cell mobilization and angiogenesis mediate tumor refractoriness to anti-VEGF therapy in mouse models. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106, 6742-6747.
- Shojaei, H., Oberg, H.H., Juricke, M., Marischen, L., Kunz, M., Mundhenke, C., Gieseler, F., Kabelitz, D., Wesch, D., 2009b. Toll-like receptors 3 and 7 agonists enhance tumor cell lysis by human gammadelta T cells. *Cancer Res*. 69, 8710-8717.
- Scheffzek, K., Ahmadian, M.R., Kabsch, W., Wiesmuller, L., Lautwein, A., Schmitz, F., Wittinghofer, A., 1997. The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants. *Science*. 277, 333-338.
- Schlom, J., 2012. Therapeutic cancer vaccines: current status and moving forward. *J. Natl. Cancer Inst*. 104, 599-613.
- Schmidt, R.E., Murray, C., Daley, J.F., Schlossman, S.F., Ritz, J., 1986. A subset of natural killer cells in peripheral blood displays a mature T cell phenotype. *J Exp Med*. 164, 351-356.
- Schon, M., Schon, M.P., 2007a. The antitumoral mode of action of imiquimod and other imidazoquinolines. *Curr Med Chem*. 14, 681-687.
- Schon, M.P., Schon, M., 2007b. Imiquimod: mode of action. *The British journal of dermatology*. 157 Suppl 2, 8-13.

- Schubbert, S., Shannon, K., Bollag, G., 2007. Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nature reviews. Cancer.* 7, 295-308.
- Singh, M.S., Francis, P.A., Michael, M., 2011. Tamoxifen, cytochrome P450 genes and breast cancer clinical outcomes. *Breast.* 20, 111-118.
- Siroky, P., Belohlavek, T., Papousek, I., Jandzik, D., Mikulicek, P., Kubelova, M., Zdrzilova-Dubská, L., 2014. Hidden threat of tortoise ticks: high prevalence of Crimean-Congo haemorrhagic fever virus in ticks *Hyalomma aegyptium* in the Middle East. *Parasites & vectors.* 7, 101.
- Sistigu, A., Viaud, S., Chaput, N., Bracci, L., Proietti, E., Zitvogel, L., 2011. Immunomodulatory effects of cyclophosphamide and implementations for vaccine design. *Seminars in immunopathology.* 33, 369-383.
- Sitia, G., Aiolfi, R., Di Lucia, P., Mainetti, M., Fiocchi, A., Mingozzi, F., Esposito, A., Ruggeri, Z.M., Chisari, F.V., Iannaccone, M., Guidotti, L.G., 2012. Antiplatelet therapy prevents hepatocellular carcinoma and improves survival in a mouse model of chronic hepatitis B. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109, E2165-2172.
- Sliwkowski, M.X., Lofgren, J.A., Lewis, G.D., Hotaling, T.E., Fendly, B.M., Fox, J.A., 1999. Nonclinical studies addressing the mechanism of action of trastuzumab (Herceptin). *Semin Oncol.* 26, 60-70.
- Smith, G., Bounds, R., Wolf, H., Steele, R.J., Carey, F.A., Wolf, C.R., 2010. Activating K-Ras mutations outwith 'hotspot' codons in sporadic colorectal tumours - implications for personalised cancer medicine. *Br J Cancer.* 102, 693-703.
- Smorodin, E., Sergeev, B., Klaamas, K., Chuzmarov, V., Kurtenkov, O., 2013. The relation of the level of serum anti-TF, -Tn and -alpha-Gal IgG to survival in gastrointestinal cancer patients. *International journal of medical sciences.* 10, 1674-1682.
- Sokic-Milutinovic, A., Alempijevic, T., Milosavljevic, T., 2015. Role of *Helicobacter pylori* infection in gastric carcinogenesis: Current knowledge and future directions. *World journal of gastroenterology : WJG.* 21, 11654-11672.
- Solinas, G., Germano, G., Mantovani, A., Allavena, P., 2009. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *J Leukoc Biol.* 86, 1065-1073.
- Son, C.H., Shin, D.Y., Kim, S.D., Park, H.S., Jung, M.H., Bae, J.H., Kang, C.D., Yang, K., Park, Y.S., 2012. Improvement of antitumor effect of intratumoral injection of immature dendritic cells into irradiated tumor by cyclophosphamide in mouse colon cancer model. *J Immunother.* 35, 607-614.
- Song, S., Ewald, A.J., Stallcup, W., Werb, Z., Bergers, G., 2005. PDGFRbeta+ perivascular progenitor cells in tumours regulate pericyte differentiation and vascular survival. *Nat. Cell Biol.* 7, 870-879.
- Sousa, S., Brion, R., Lintunen, M., Kronqvist, P., Sandholm, J., Monkkonen, J., Kellokumpu-Lehtinen, P.L., Lauttia, S., Tynninen, O., Joensuu, H., Heymann, D., Maatta, J.A., 2015. Human breast cancer cells educate macrophages toward the M2 activation status. *Breast cancer research : BCR.* 17, 101.
- Sparmann, A., Bar-Sagi, D., 2004. Ras-induced interleukin-8 expression plays a critical role in tumor growth and angiogenesis. *Cancer Cell.* 6, 447-458.
- Spiridon, C.I., Ghetie, M.A., Uhr, J., Marches, R., Li, J.L., Shen, G.L., Vitetta, E.S., 2002. Targeting multiple Her-2 epitopes with monoclonal antibodies results in improved antigrowth activity of a human breast cancer cell line in vitro and in vivo. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 8, 1720-1730.
- Sterba, J., Pavelka, Z., Andre, N., Ventruha, J., Skotakova, J., Bajciová, V., Bronisová, D., Dubská, L., Valík, D., 2010. Second complete remission of relapsed medulloblastoma induced by metronomic chemotherapy. *Pediatric blood & cancer.* 54, 616-617.
- Sterba, J., Valík, D., Mudry, P., Kepak, T., Pavelka, Z., Bajciová, V., Zitterbart, K., Kadlecová, V., Mazanek, P., 2006. Combined biodifferentiating and antiangiogenic oral metronomic therapy is feasible and effective in relapsed solid tumors in children: single-center pilot study. *Onkologie.* 29, 308-313.
- Stintzing, S., Jung, A., Rossius, L., Modest, D.P., Fischer von Weikersthal, L., Decker, T., Möhler, M., Scheithauer, W., Kirchner, T., Heinemann, V., 2013. Analysis of KRAS/NRAS and BRAF mutations in FIRE-3: A randomized phase III study of FOLFIRI plus cetuximab or bevacizumab as first-line treatment for wild-type (WT)KRAS (exon2) metastatic colorectal cancer (mCRC) patients. *Eur J Cancer.* 49, LBA17.
- Stix, G., 2007. A malignant flame. Understanding chronic inflammation, which contributes to heart disease, Alzheimer's and a variety of other ailments, may be a key to unlocking the mysteries of cancer. *Sci. Am.* 297, 60-67.
- Stoeltzing, O., Ahmad, S.A., Liu, W., McCarty, M.F., Wey, J.S., Parikh, A.A., Fan, F., Reinmuth, N., Kawaguchi, M., Bucana, C.D., Ellis, L.M., 2003. Angiopoietin-1 inhibits vascular permeability, angiogenesis, and growth of hepatic colon cancer tumors. *Cancer Res.* 63, 3370-3377.
- Stroffolini, T., Andreone, P., Andriulli, A., Ascione, A., Craxi, A., Chiamonte, M., Galante, D., Manghisi, O.G., Mazzanti, R., Medaglia, C., Pilleri, G., Rapaccini, G.L., Albanese, M., Taliani, G., Tosti, M.E., Villa, E., Gasbarrini, G., 1999. Gross pathologic types of hepatocellular carcinoma in Italy. *Oncology.* 56, 189-192.

- Stuckey, D.W., Shah, K., 2013. TRAIL on trial: preclinical advances in cancer therapy. *Trends Mol Med.* 19, 685-694.
- Sugamura, K., Ishii, N., Weinberg, A.D., 2004. Therapeutic targeting of the effector T-cell co-stimulatory molecule OX40. *Nature reviews. Immunology.* 4, 420-431.
- Sutherst, R.W., 2001. The vulnerability of animal and human health to parasites under global change. *Int. J. Parasitol.* 31, 933-948.
- Szeles, L., Keresztes, G., Torocsik, D., Balajthy, Z., Krenacs, L., Poliska, S., Steinmeyer, A., Zuegel, U., Pruenster, M., Rot, A., Nagy, L., 2009. 1,25-dihydroxyvitamin D3 is an autonomous regulator of the transcriptional changes leading to a tolerogenic dendritic cell phenotype. *J Immunol.* 182, 2074-2083.
- Sznol, M., Chen, L., 2013. Antagonist antibodies to PD-1 and B7-H1 (PD-L1) in the treatment of advanced human cancer-response. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 19, 5542.
- Taieb, J., Chaput, N., Scharztz, N., Roux, S., Novault, S., Menard, C., Ghiringhelli, F., Terme, M., Carpentier, A.F., Darrasse-Jeze, G., Lemonnier, F., Zitvogel, L., 2006. Chemoimmunotherapy of tumors: cyclophosphamide synergizes with exosome based vaccines. *J Immunol.* 176, 2722-2729.
- Takahashi, Y., Kitadai, Y., Bucana, C.D., Cleary, K.R., Ellis, L.M., 1995. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer. *Cancer Res.* 55, 3964-3968.
- Talmadge, J.E., Gabrilovich, D.I., 2013. History of myeloid-derived suppressor cells. *Nature reviews. Cancer.* 13, 739-752.
- Tanemura, M., Miyoshi, E., Nagano, H., Eguchi, H., Taniyama, K., Kamiike, W., Mori, M., Doki, Y., 2013. Role of alpha-gal epitope/anti-Gal antibody reaction in immunotherapy and its clinical application in pancreatic cancer. *Cancer Sci.* 104, 282-290.
- Tejpar, S., Lenz, H.-J., Köhne, C.-H., Heinemann, V., Ciardiello, F., Esser, R., Beier, F., Stroh, C., Duecker, K., Bokemeyer, C., 2014. Effect of KRAS and NRAS mutations on treatment outcomes in patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) treated first-line with cetuximab plus FOLFOX4: New results from the OPUS study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 32, abstr LBA444.
- Teng, L.S., Jin, K.T., He, K.F., Wang, H.H., Cao, J., Yu, D.C., 2010. Advances in combination of antiangiogenic agents targeting VEGF-binding and conventional chemotherapy and radiation for cancer treatment. *Journal of the Chinese Medical Association : JCMSA.* 73, 281-288.
- Termeer, C., Johannsen, H., Braun, T., Renkl, A., Ahrens, T., Denfeld, R.W., Lappin, M.B., Weiss, J.M., Simon, J.C., 2001. The role of CD44 during CD40 ligand-induced dendritic cell clustering and maturation. *J Leukoc Biol.* 70, 715-722.
- Teulings, H.E., Limpens, J., Jansen, S.N., Zwinderman, A.H., Reitsma, J.B., Spuls, P.I., Luiten, R.M., 2015. Vitiligo-like depigmentation in patients with stage III-IV melanoma receiving immunotherapy and its association with survival: a systematic review and meta-analysis. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 33, 773-781.
- Teulings, H.E., Overkamp, M., Ceylan, E., Nieuweboer-Krobotova, L., Bos, J.D., Nijsten, T., Wolkerstorfer, A.W., Luiten, R.M., van der Veen, J.P., 2013. Decreased risk of melanoma and nonmelanoma skin cancer in patients with vitiligo: a survey among 1307 patients and their partners. *The British journal of dermatology.* 168, 162-171.
- Theirez, A., Sabourin, C., Gertner, J., Devilder, M.C., Allain-Maillet, S., Fournie, J.J., Scotet, E., Bonneville, M., 2007. Self/non-self discrimination by human gammadelta T cells: simple solutions for a complex issue? *Immunol Rev.* 215, 123-135.
- Thomas, G.V., Tran, C., Mellinshoff, I.K., Welsbie, D.S., Chan, E., Fueger, B., Czernin, J., Sawyers, C.L., 2006. Hypoxia-inducible factor determines sensitivity to inhibitors of mTOR in kidney cancer. *Nat Med.* 12, 122-127.
- Thompson, K., Rogers, M.J., 2004. Statins prevent bisphosphonate-induced gamma,delta-T-cell proliferation and activation in vitro. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research.* 19, 278-288.
- Thompson, R.H., Gillett, M.D., Chevillat, J.C., Lohse, C.M., Dong, H., Webster, W.S., Krejci, K.G., Lobo, J.R., Sengupta, S., Chen, L., Zincke, H., Blute, M.L., Strome, S.E., Leibovich, B.C., Kwon, E.D., 2004. Costimulatory B7-H1 in renal cell carcinoma patients: Indicator of tumor aggressiveness and potential therapeutic target. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101, 17174-17179.
- Thune, I., Furberg, A.S., 2001. Physical activity and cancer risk: dose-response and cancer, all sites and site-specific. *Medicine and science in sports and exercise.* 33, S530-550; discussion S609-510.
- Tjalsma, H., Boleij, A., Marchesi, J.R., Dutilh, B.E., 2012. A bacterial driver-passenger model for colorectal cancer: beyond the usual suspects. *Nature reviews. Microbiology.* 10, 575-582.
- Tokajuk, A., Krzyzanowska-Grycel, E., Grycel, S., Sadowska, A., Car, H., 2015. Antidiabetic drugs and risk of cancer. *Pharmacological reports : PR.* 67, 1240-1250.

Tol, J., Koopman, M., Cats, A., Rodenburg, C.J., Creemers, G.J., Schrama, J.G., Erdkamp, F.L., Vos, A.H., van Groeningen, C.J., Sinnige, H.A., Richel, D.J., Voest, E.E., Dijkstra, J.R., Vink-Borger, M.E., Antonini, N.F., Mol, L., van Krieken, J.H., Dalesio, O., Punt, C.J., 2009. Chemotherapy, bevacizumab, and cetuximab in metastatic colorectal cancer. *The New England journal of medicine*. 360, 563-572.

Topalian, S., 2013. Q&A: Suzanne Topalian on immune therapies. *Cancer discovery*. 3, 712.

Tremaroli, V., Backhed, F., 2012. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature*. 489, 242-249.

Trousseau, A., 1865. Phlegmatia alba dolens. *Clinique Medicale De L'Hotel-Dieu de Paris*. 3, 654-712.

Turnbaugh, P.J., Ridaura, V.K., Faith, J.J., Rey, F.E., Knight, R., Gordon, J.I., 2009. The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. *Science translational medicine*. 1, 6ra14.

Tzankov, A., Meier, C., Hirschmann, P., Went, P., Pileri, S.A., Dirnhofer, S., 2008. Correlation of high numbers of intratumoral FOXP3+ regulatory T cells with improved survival in germinal center-like diffuse large B-cell lymphoma, follicular lymphoma and classical Hodgkin's lymphoma. *Haematologica*. 93, 193-200.

Unfer, V., Casini, M.L., Costabile, L., Mignosa, M., Gerli, S., Di Renzo, G.C., 2004. Endometrial effects of long-term treatment with phytoestrogens: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Fertil Steril*. 82, 145-148, quiz 265.

Valik, D., Dubska, L., Nekulova, M., 2011. Nádorové markery., in: Souček, M. (Ed.), *Vnitřní lékařství*. Grada, Praha, pp. 522-524.

Valik, D., Zdrzilova Dubska, L., 2015. Klinické využití solubilních nádorových markerů., in: Tomasek, J. (Ed.), *Onkologie – minimum pro praxi*. Axonite CZ, Praha.

Vallejo, C.T., Rabinovich, M.G., Perez, J.E., Rodriguez, R., Machiavelli, M.R., Leone, B.A., Romero, A.D., Lacava, J.A., Cuevas, M.A., Langhi, M.J., et al., 1995. High-dose cisplatin with dipyrindamole in advanced non-small cell lung cancer. A Grupo Oncologico Cooperativo del Sur study. *American journal of clinical oncology*. 18, 185-188.

Van Cutsem, E., Kohne, C.H., Hitre, E., Zaluski, J., Chang Chien, C.R., Makhson, A., D'Haens, G., Pinter, T., Lim, R., Bodoky, G., Roh, J.K., Folprecht, G., Ruff, P., Stroh, C., Tejpar, S., Schlichting, M., Nippgen, J., Rougier, P., 2009. Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *The New England journal of medicine*. 360, 1408-1417.

van den Boorn, J.G., Konijnenberg, D., Dellemijn, T.A., van der Veen, J.P., Bos, J.D., Melief, C.J., Vyth-Dreese, F.A., Luiten, R.M., 2009. Autoimmune destruction of skin melanocytes by perilesional T cells from vitiligo patients. *The Journal of investigative dermatology*. 129, 2220-2232.

van der Meer, J.W., Weening, R.S., Schellekens, P.T., van Munster, I.P., Nagengast, F.M., 1993. Colorectal cancer in patients with X-linked agammaglobulinaemia. *Lancet*. 341, 1439-1440.

van der Meer, W., Pickkers, P., Scott, C.S., van der Hoeven, J.G., Gunnewiek, J.K., 2007. Hematological indices, inflammatory markers and neutrophil CD64 expression: comparative trends during experimental human endotoxemia. *J Endotoxin Res*. 13, 94-100.

Vandercappellen, J., Van Damme, J., Struyf, S., 2008. The role of CXC chemokines and their receptors in cancer. *Cancer Lett*. 267, 226-244.

Vandercappellen, J., Van Damme, J., Struyf, S., 2011. The role of the CXC chemokines platelet factor-4 (CXCL4/PF-4) and its variant (CXCL4L1/PF-4var) in inflammation, angiogenesis and cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*. 22, 1-18.

Vargas, A.J., Thompson, P.A., 2012. Diet and nutrient factors in colorectal cancer risk. *Nutrition in clinical practice : official publication of the American Society for Parenteral and Enteral Nutrition*. 27, 613-623.

Vasile, E., Tomita, Y., Brown, L.F., Kocher, O., Dvorak, H.F., 2001. Differential expression of thymosin beta-10 by early passage and senescent vascular endothelium is modulated by VEGF/VEGF: evidence for senescent endothelial cells in vivo at sites of atherosclerosis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 15, 458-466.

Veltman, J.D., Lambers, M.E., van Nimwegen, M., Hendriks, R.W., Hoogsteden, H.C., Aerts, J.G., Hegmans, J.P., 2010. COX-2 inhibition improves immunotherapy and is associated with decreased numbers of myeloid-derived suppressor cells in mesothelioma. Celecoxib influences MDSC function. *BMC Cancer*. 10, 464.

Vetizou, M., Pitt, J.M., Daillere, R., Lepage, P., Waldschmitt, N., Flament, C., Rusakiewicz, S., Routy, B., Roberti, M.P., Duong, C.P., Poirier-Colame, V., Roux, A., Becharef, S., Formenti, S., Golden, E., Cording, S., Eberl, G., Schlitzer, A., Ginhoux, F., Mani, S., Yamazaki, T., Jacquelot, N., Enot, D.P., Berard, M., Nigou, J., Opolon, P., Eggermont, A., Woerther, P.L., Chachaty, E., Chaput, N., Robert, C., Mateus, C., Kroemer, G., Raouf, D., Boneca, I.G., Carbonnel, F., Chamaillard, M., Zitvogel, L., 2015. Anticancer immunotherapy by CTLA-4 blockade relies on the gut microbiota. *Science*. 350, 1079-1084.

- Vierucci, F., Del Pistoia, M., Fanos, M., Erba, P., Saggese, G., 2014. Prevalence of hypovitaminosis D and predictors of vitamin D status in Italian healthy adolescents. *Italian journal of pediatrics*. 40, 54.
- Vigneri, P., Frasca, F., Sciacca, L., Pandini, G., Vigneri, R., 2009. Diabetes and cancer. *Endocrine-related cancer*. 16, 1103-1123.
- Villalta, D., Pantarotto, L., Da Re, M., Conte, M., Sjolander, S., Borres, M.P., Martelli, P., 2015. High prevalence of sIgE to Galactose-alpha1,3-galactose in rural pre-Alps area: a cross-sectional study. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*.
- Villanueva, H., de Cerio, A.L., Inoges, S., Pastor, F., Soldevilla, M.M., Bendandi, M., 2011. BiovaxID(R): a customized idiotype vaccine for the treatment of B-cell lymphoma. *Expert review of vaccines*. 10, 1661-1669.
- Vitale, M., Caruso, A., Licenziati, S., Rodella, L., Fiorentini, S., Zauli, G., Castelli, F., Manzoli, F.A., Turano, A., 2000. Differential production of IFN-gamma, analyzed at the single-cell level, by specific subsets of human NK and T cells from healthy and HIV(+) subjects. *Cytometry*. 39, 189-194.
- Viteri, S., Gonzalez-Cao, M., Barron, F., Riso, A., Rosell, R., 2015. Results of clinical trials with anti-programmed death 1/programmed death ligand 1 inhibitors in lung cancer. *Translational lung cancer research*. 4, 756-762.
- Vivier, E., Ugolini, S., Blaise, D., Chabannon, C., Brossay, L., 2012. Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer. *Nature reviews. Immunology*. 12, 239-252.
- Volejnikova, Z., 2012. Funkční vlastnosti krevních destiček u onkologických pacientů. *Fakulta chemicko-technologická Katedra biologických a biochemických věd. Diplomová práce*.
- von Boehmer, L., Mattle, M., Bode, P., Landshammer, A., Schafer, C., Nuber, N., Ritter, G., Old, L., Moch, H., Schafer, N., Jager, E., Knuth, A., van den Broek, M., 2013. NY-ESO-1-specific immunological pressure and escape in a patient with metastatic melanoma. *Cancer immunity*. 13, 12.
- Waight, J.D., Hu, Q., Miller, A., Liu, S., Abrams, S.I., 2011. Tumor-derived G-CSF facilitates neoplastic growth through a granulocytic myeloid-derived suppressor cell-dependent mechanism. *PLoS one*. 6, e27690.
- Wambura, P.N., Gwakisa, P.S., Silayo, R.S., Rugaimukamu, E.A., 1998. Breed-associated resistance to tick infestation in *Bos indicus* and their crosses with *Bos taurus*. *Vet. Parasitol*. 77, 63-70.
- Wan, X., Shen, N., Mendoza, A., Khanna, C., Helman, L.J., 2006. CCI-779 inhibits rhabdomyosarcoma xenograft growth by an antiangiogenic mechanism linked to the targeting of mTOR/Hif-1alpha/VEGF signaling. *Neoplasia*. 8, 394-401.
- Wang, C., Liu, X., Li, Z., Chai, Y., Jiang, Y., Wang, Q., Ji, Y., Zhu, Z., Wan, Y., Yuan, Z., Chang, Z., Zhang, M., 2015a. CD8(+)/NKT-like cells regulate the immune response by killing antigen-bearing DCs. *Scientific reports*. 5, 14124.
- Wang, D., Dubois, R.N., 2010. Eicosanoids and cancer. *Nature reviews. Cancer*. 10, 181-193.
- Wang, H., Yang, D., Xu, W., Wang, Y., Ruan, Z., Zhao, T., Han, J., Wu, Y., 2008. Tumor-derived soluble MICs impair CD3(+)/CD56(+)/NKT-like cell cytotoxicity in cancer patients. *Immunol Lett*. 120, 65-71.
- Wang, L., Chang, E.W., Wong, S.C., Ong, S.M., Chong, D.Q., Ling, K.L., 2013. Increased myeloid-derived suppressor cells in gastric cancer correlate with cancer stage and plasma S100A8/A9 proinflammatory proteins. *J Immunol*. 190, 794-804.
- Wang, X., Huycke, M.M., 2007. Extracellular superoxide production by *Enterococcus faecalis* promotes chromosomal instability in mammalian cells. *Gastroenterology*. 132, 551-561.
- Wang, X.Q., Li, H., Van Putten, V., Winn, R.A., Heasley, L.E., Nemenoff, R.A., 2009. Oncogenic K-Ras regulates proliferation and cell junctions in lung epithelial cells through induction of cyclooxygenase-2 and activation of metalloproteinase-9. *Mol Biol Cell*. 20, 791-800.
- Wang, Y., Quon, K.C., Knee, D.A., Nesterov, A., Kraft, A.S., 2005. RAS, MYC, and sensitivity to tumor necrosis factor-alpha-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis. *Cancer Res*. 65, 1615-1616; author reply 1616-1617.
- Wang, Z.D., Wei, S.Q., Wang, Q.Y., 2015b. Targeting oncogenic KRAS in non-small cell lung cancer cells by phenformin inhibits growth and angiogenesis. *American journal of cancer research*. 5, 3339-3349.
- Watnick, R.S., Cheng, Y.N., Rangarajan, A., Ince, T.A., Weinberg, R.A., 2003. Ras modulates Myc activity to repress thrombospondin-1 expression and increase tumor angiogenesis. *Cancer Cell*. 3, 219-231.
- Wei, X., Elizondo, G., Sapone, A., McLeod, H.L., Raunio, H., Fernandez-Salguero, P., Gonzalez, F.J., 1998. Characterization of the human dihydropyrimidine dehydrogenase gene. *Genomics*. 51, 391-400.
- Weiner, L.M., Surana, R., Wang, S., 2010. Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. *Nature reviews. Immunology*. 10, 317-327.
- Weisberg, S.P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R.L., Ferrante, A.W., Jr., 2003. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *The Journal of clinical investigation*. 112, 1796-1808.

- Wensveen, F.M., Valentic, S., Sestan, M., Turk Wensveen, T., Polic, B., 2015. Interactions between adipose tissue and the immune system in health and malnutrition. *Semin Immunol.*
- Wesch, D., Glatzel, A., Kabelitz, D., 2001. Differentiation of resting human peripheral blood gamma delta T cells toward Th1- or Th2-phenotype. *Cell Immunol.* 212, 110-117.
- Whalen, G.F., Sullivan, M., Piperdi, B., Wasseff, W., Galili, U., 2012. Cancer immunotherapy by intratumoral injection of alpha-gal glycolipids. *Anticancer Res.* 32, 3861-3868.
- Wheat, W.H., Cool, C.D., Morimoto, Y., Rai, P.R., Kirkpatrick, C.H., Lindenbaum, B.A., Bates, C.A., Ellison, M.C., Serls, A.E., Brown, K.K., Routes, J.M., 2005. Possible role of human herpesvirus 8 in the lymphoproliferative disorders in common variable immunodeficiency. *J. Exp. Med.* 202, 479-484.
- Whiteside, T.L., 2012. What are regulatory T cells (Treg) regulating in cancer and why? *Semin Cancer Biol.* 22, 327-334.
- Wikby, A., Mansson, I.A., Johansson, B., Strindhall, J., Nilsson, S.E., 2008. The immune risk profile is associated with age and gender: findings from three Swedish population studies of individuals 20-100 years of age. *Biogerontology.* 9, 299-308.
- Wikel, S., 2013. Ticks and tick-borne pathogens at the cutaneous interface: host defenses, tick countermeasures, and a suitable environment for pathogen establishment. *Frontiers in microbiology.* 4, 337.
- Wikel, S.K., 1996. Host immunity to ticks. *Annu. Rev. Entomol.* 41, 1-22.
- Wilke, H., Schmoll, H.J., Schober, C., Stahl, M., Preusser, P., Freund, M., Poliwooda, H., 1988. Folinic acid (FA) plus 5-fluorouracil (FU) in progressive advanced colorectal cancer. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie.* 42, 373-380.
- Wolchok, J.D., Hoos, A., O'Day, S., Weber, J.S., Hamid, O., Lebbe, C., Maio, M., Binder, M., Bohnsack, O., Nichol, G., Humphrey, R., Hodi, F.S., 2009. Guidelines for the evaluation of immune therapy activity in solid tumors: immune-related response criteria. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 15, 7412-7420.
- Wolchok, J.D., Weber, J.S., Maio, M., Neyns, B., Harmankaya, K., Chin, K., Cykowski, L., de Pril, V., Humphrey, R., Lebbe, C., 2013. Four-year survival rates for patients with metastatic melanoma who received ipilimumab in phase II clinical trials. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO.* 24, 2174-2180.
- Wolin, K.Y., Yan, Y., Colditz, G.A., Lee, I.M., 2009. Physical activity and colon cancer prevention: a meta-analysis. *Br J Cancer.* 100, 611-616.
- Wong, N.A., Gonzalez, D., Salto-Tellez, M., Butler, R., Diaz-Cano, S.J., Ilyas, M., Newman, W., Shaw, E., Taniere, P., Walsh, S.V., 2014. RAS testing of colorectal carcinoma—a guidance document from the Association of Clinical Pathologists Molecular Pathology and Diagnostics Group. *J Clin Pathol.* 67, 751-757.
- Wu, J., Waxman, D.J., 2014. Metronomic cyclophosphamide schedule-dependence of innate immune cell recruitment and tumor regression in an implanted glioma model. *Cancer Lett.* 353, 272-280.
- Wu, N., Yang, X., Zhang, R., Li, J., Xiao, X., Hu, Y., Chen, Y., Yang, F., Lu, N., Wang, Z., Luan, C., Liu, Y., Wang, B., Xiang, C., Wang, Y., Zhao, F., Gao, G.F., Wang, S., Li, L., Zhang, H., Zhu, B., 2013. Dysbiosis signature of fecal microbiota in colorectal cancer patients. *Microb. Ecol.* 66, 462-470.
- Xu, L., Hu, X., Qu, X., Hou, K., Zheng, H., Liu, Y., 2013. Cetuximab enhances TRAIL-induced gastric cancer cell apoptosis by promoting DISC formation in lipid rafts. *Biochem Biophys Res Commun.* 439, 285-290.
- Yakes, F.M., Chinratanalab, W., Ritter, C.A., King, W., Seelig, S., Arteaga, C.L., 2002. Herceptin-induced inhibition of phosphatidylinositol-3 kinase and Akt is required for antibody-mediated effects on p27, cyclin D1, and antitumor action. *Cancer Res.* 62, 4132-4141.
- Yilmaz, B., Portugal, S., Tran, T.M., Gozzelino, R., Ramos, S., Gomes, J., Regalado, A., Cowan, P.J., d'Apice, A.J., Chong, A.S., Doumbo, O.K., Traore, B., Crompton, P.D., Silveira, H., Soares, M.P., 2014. Gut microbiota elicits a protective immune response against malaria transmission. *Cell.* 159, 1277-1289.
- Yip, J., Shen, Y., Berndt, M.C., Andrews, R.K., 2005. Primary platelet adhesion receptors. *IUBMB Life.* 57, 103-108.
- Yoshizawa, H., 2002. Hepatocellular carcinoma associated with hepatitis C virus infection in Japan: projection to other countries in the foreseeable future. *Oncology.* 62 Suppl 1, 8-17.
- Yu, J., Du, W., Yan, F., Wang, Y., Li, H., Cao, S., Yu, W., Shen, C., Liu, J., Ren, X., 2013. Myeloid-derived suppressor cells suppress antitumor immune responses through IDO expression and correlate with lymph node metastasis in patients with breast cancer. *J Immunol.* 190, 3783-3797.
- Yu, N., Su, X., Wang, Z., Dai, B., Kang, J., 2015. Association of Dietary Vitamin A and beta-Carotene Intake with the Risk of Lung Cancer: A Meta-Analysis of 19 Publications. *Nutrients.* 7, 9309-9324.

- Yu, P., Ge, Y.Z., Zhao, Y., Wu, J.P., Wu, R., Zhou, L.H., Jia, R.P., 2014. Identification and significance of mobilized endothelial progenitor cells in tumor neovascularization of renal cell carcinoma. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 35, 9331-9341.
- Yushak, M., Kluger, H.M., Sznol, M., 2013. Advances in the systemic treatment of metastatic melanoma. *Oncology (Williston Park)*. 27, 374-381.
- Zacharski, L.R., Moritz, T.E., Baczek, L.A., Rickles, F.R., Edwards, R.L., Forman, W.B., Forcier, R.J., Cornell, C.J., Haakenson, C.M., Ballard, H.S., et al., 1988. Effect of mopidamol on survival in carcinoma of the lung and colon: final report of Veterans Administration Cooperative Study No. 188. *J. Natl. Cancer Inst.* 80, 90-97.
- Zapletalova, D., Andre, N., Deak, L., Kyr, M., Bajciová, V., Mudry, P., Dubska, L., Demlova, R., Pavelka, Z., Zitterbart, K., Skotakova, J., Husek, K., Martincekova, A., Mazanek, P., Kepak, T., Doubek, M., Kutnikova, L., Valik, D., Sterba, J., 2012. Metronomic chemotherapy with the COMBAT regimen in advanced pediatric malignancies: a multicenter experience. *Oncology*. 82, 249-260.
- Zdrzilova-Dubska, L., Valik, D., Budinska, E., Frgala, T., Bacikova, L., Demlova, R., 2012. NKT-like cells are expanded in solid tumour patients. *Klinicka onkologie : casopis Ceske a Slovenske onkologicke spolocnosti*. 25 Suppl 2, 2S21-25.
- Zhang, L., Takara, K., Yamakawa, D., Kidoya, H., Takakura, N., 2016. Apelin as a marker for monitoring the tumor vessel normalization window during antiangiogenic therapy. *Cancer Sci*. 107, 36-44.
- Zhao, X.Y., Xu, L.L., Lu, S.Y., Huang, X.J., 2011. IL-17-producing T cells contribute to acute graft-versus-host disease in patients undergoing unmanipulated blood and marrow transplantation. *Eur. J. Immunol.* 41, 514-526.
- Zhou, H., Hylemon, P.B., 2014. Bile acids are nutrient signaling hormones. *Steroids*. 86, 62-68.
- Zhou, L.J., Tedder, T.F., 1995. Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily. *J Immunol*. 154, 3821-3835.
- Zitvogel, L., Kepp, O., Kroemer, G., 2010. Decoding cell death signals in inflammation and immunity. *Cell*. 140, 798-804.
- Zullo, A., Romiti, A., Rinaldi, V., Vecchione, A., Tomao, S., Aiuti, F., Frati, L., Luzi, G., 1999. Gastric pathology in patients with common variable immunodeficiency. *Gut*. 45, 77-81.