

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Přírodovědecká fakulta

**Hledání agonistů Toll-like receptorů použitelných  
synergicky s ligandy fagocytárních receptorů  
pro imunoterapii nádorových onemocnění  
v humánní medicíně**

Diplomová práce

**Bc. Zuzana Kumžáková**

Školitel: RNDr. Jan Ženka, CSc.

České Budějovice 2015

Kumžáková, Z., 2015: Hledání agonistů Toll-like receptorů použitelných synergicky s ligandy fagocytárních receptorů pro imunoterapii nádorových onemocnění v humánní medicíně. [Searching for Toll-like receptors agonists that would interact synergistically with ligands of phagocytic receptors and that could be used in cancer immunotherapy in human medicine. Mgr. Thesis, in Czech.] – 86 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

**Annotation:**

The goal of this thesis was to find agonists of Toll-like receptors that would interact with ligands of phagocytic receptors synergistically, would cause a strong suppression of tumour growth, and could be safely used in human medicine.

**Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.**

**Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.**

**V Českých Budějovicích, 15. 4. 2015**

**Zuzana Kumžáková**

.....

## **Poděkování**

Na tomto místě bych chtěla poděkovat především svému školiteli RNDr. Janu Ženkovi, CSc., a to hlavně za možnost podílet se na tak velké věci, jako je vymyšlení a hledání léku na nádorová onemocnění. Dále si velmi cením nekonečného úsměvu v jeho tváři, moře trpělivosti, nápadů a cenných rad, bez nichž bychom se rozhodně neobešli.

Velký dík patří rovněž všem členům celého našeho týmu, kterým jsem vděčná za ochotu pomoci, poradit a za příjemnou spolupráci. Dále děkuji zaměstnancům a studentům Oddělení imunologie parazitů Parazitologického ústavu AV ČR v Českých Budějovicích a laboratoří Katedry medicínské biologie Přírodovědecké fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích za poskytnutí příjemného pracovního prostředí.

Nesmím zapomenout na celou moji rodinu a přátele, kterým děkuji ze všech nejvíc, protože jsou po celou dobu studia mou největší oporou.

# Obsah

<b>1. Úvod</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Přehled literatury</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1 Úvodní charakteristika nádorových onemocnění</b> .....	<b>3</b>
2.1.1 Definice .....	3
2.1.2 Společné znaky nádorových buněk .....	3
2.1.3 Dělení nádorů .....	4
2.1.4 Maligní melanom.....	5
2.1.5 Myší melanom B16 a jeho linie.....	5
<b>2.2 Nádory a imunitní systém</b> .....	<b>6</b>
2.2.1 Základní charakteristika vrozené a získané imunity.....	6
2.2.2 PRRs a PAMPs.....	7
2.2.3 Efektorové buňky imunitního systému a jejich úloha v boji s rakovinou .....	11
2.2.4 Současná imunoterapie nádorových onemocnění.....	14
2.2.5 Náš přístup k imunoterapii nádorových onemocnění.....	17
<b>3. Cíle práce</b> .....	<b>22</b>
<b>4. Materiál a metody</b> .....	<b>23</b>
<b>4.1 Chemické látky</b> .....	<b>23</b>
4.1.1 Příprava terapeutických roztoků.....	23
<b>4.2 Experimentální zvířata</b> .....	<b>25</b>
<b>4.3 Buněčná linie</b> .....	<b>25</b>
<b>4.4 Metodika in vivo experimentů</b> .....	<b>26</b>
4.4.1 Příprava a transplantace melanomových buněk .....	26
4.4.2 Určení velikosti nádorů a aplikace terapeutik .....	26
4.4.3 Počítání metastáz .....	27
4.4.4 Určení průměrné redukce nádorového růstu .....	27
<b>4.5 Metodika in vitro experimentů</b> .....	<b>27</b>
4.5.1 Příprava nádorových buněk a jejich inkubace s ligandem .....	27

4.5.2	Izolace neutrofilů a jejich priming .....	28
4.5.3	Inhibice oxidativního vzplanutí.....	29
4.5.4	Příprava vzorků pro počítání buněk.....	29
<b>4.6</b>	<b>Statistické vyhodnocení .....</b>	<b>29</b>
<b>4.7</b>	<b>Experimenty in vivo.....</b>	<b>30</b>
4.7.1	Pokus č. 1 - Testování vlivu f-MLFG <sub>5</sub> K <sub>8</sub> (K(STE))(K(STE))-NH <sub>2</sub> a jeho případné synergie s LPS nebo LTA na terapii maligního melanomu.....	30
4.7.2	Pokus č. 2 – Předběžný screening vlivu R848 (baze) jako náhrady LPS na imunoterapii maligního melanomu a průkaz případné synergie R848 s mananem-BAM.....	30
4.7.3	Pokus č. 3 – Použitelnost R848 (baze) v imunoterapii melanomu B16-F10 a jeho synergie s mananem-BAM .....	31
4.7.4	Pokus č. 4 – Studium možnosti použití kovalentně kotvených bakterií <i>Listeria monocytogenes</i> pro léčbu melanomu B16-F10 a sledování jejich případné synergie s mananem-SMCC .....	31
4.7.5	Pokus č. 5 – Studium vlivu přidání bakterií <i>Listeria monocytogenes</i> ke směsi mananu-SMCC a R848.HCl na účinnost terapie maligního melanomu.....	32
4.7.6	Pokus č. 6 – Studium vlivu přidání bakterií <i>Listeria monocytogenes</i> ke směsi látek manan-SMCC, R848.HCl a poly I:C na účinnost imunoterapie maligního melanomu .....	33
4.7.7	Pokus č. 7 – Ovlivnění protinádorového účinku směsi mananu-BAM s R848.HCl zablokováním oxidativního vzplanutí neutrofilů pomocí epicatechinu .....	34
<b>4.8</b>	<b>Experimenty in vitro.....</b>	<b>34</b>
4.8.1	Pokus č. 1 – Vliv epicatechinu, inhibitoru oxidativního vzplanutí, na cytotoxický účinek primovaných neutrofilů na buňky B16-F10 s ukotveným mananem.....	34
4.8.2	Pokus č. 2 – Vliv epicatechinu na cytotoxické působení primovaných neutrofilů na nádorové buňky s ukotveným mananem při použití dvojnásobného množství neutrofilů a nádorových buněk.....	35

4.8.3	Pokus č. 3 – Studium vlivu různých koncentrací epicatechinu na cytotoxické působení primovaných neutrofilů na nádorové buňky s ukotveným mananem. .....	36
<b>5.</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>38</b>
<b>5.1</b>	<b>Experimenty in vivo.....</b>	<b>38</b>
5.1.1	Pokus č. 1 - Testování vlivu f-MLFG <sub>5</sub> K <sub>8</sub> (K(STE))(K(STE))-NH <sub>2</sub> a jeho případné synergie s LPS nebo LTA na terapii maligního melanomu.....	38
5.1.2	Pokus č. 2 – Předběžný screening vlivu R848 (baze) jako náhrady LPS na imunoterapii maligního melanomu a průkaz případné synergie R848 s mananem-BAM.....	40
5.1.3	Pokus č. 3 – Použitelnost R848 (baze) v imunoterapii melanomu B16-F10 a jeho synergie s mananem-BAM .....	42
5.1.4	Pokus č. 4 – Studium možnosti použití kovalentně kotvených bakterií <i>Listeria monocytogenes</i> pro léčbu melanomu B16-F10 a sledování jejich případné synergie s mananem-SMCC .....	44
5.1.5	Pokus č. 5 – Studium vlivu přidání bakterií <i>Listeria monocytogenes</i> ke směsi mananu-SMCC a R848.HCl na účinnost terapie maligního melanomu.....	46
5.1.6	Pokus č. 6 – Studium vlivu přidání bakterií <i>Listeria monocytogenes</i> ke směsi látek manan-SMCC, R848.HCl a poly I:C na účinnost imunoterapie maligního melanomu .....	50
5.1.7	Pokus č. 7 - Ovlivnění protinádorového účinku směsi mananu-BAM s R848.HCl zablokováním oxidativního vzplanutí neutrofilů pomocí epicatechinu .....	54
<b>5.2</b>	<b>Experimenty in vitro.....</b>	<b>57</b>
5.2.1	Pokus č. 1 – Vliv epicatechinu, inhibitoru oxidativního vzplanutí, na cytotoxický účinek primovaných neutrofilů na buňky B16-F10 s ukotveným mananem.....	57
5.2.2	Pokus č. 2 – Vliv epicatechinu na cytotoxické působení primovaných neutrofilů na nádorové buňky s ukotveným mananem při použití dvojnásobného množství neutrofilů a nádorových buněk .....	58

5.2.3	Pokus č. 3 - Studium vlivu různých koncentrací epicatechinu na cytotoxické působení primovaných neutrofilů na nádorové buňky s ukotveným mananem. .....	60
<b>6.</b>	<b>Diskuse.....</b>	<b>63</b>
<b>7.</b>	<b>Souhrn .....</b>	<b>71</b>
<b>8.</b>	<b>Seznam zkratk .....</b>	<b>72</b>
<b>9.</b>	<b>Seznam použité literatury .....</b>	<b>74</b>

# 1. Úvod

V současné době se udává, že rakovinou onemocní každý třetí obyvatel naší republiky a každý čtvrtý tomuto zákeřnému onemocnění podlehe. Vzhledem k prodlužování průměrné délky života obyvatel, životnímu stylu plnému stresu, kouření a spoustě dalších rizikových faktorů se incidence nádorových onemocnění neustále zvyšuje. V nedávné době se po předstížení kardiovaskulárních onemocnění staly zhoubné novotvary nejčastější příčinou smrti obyvatel vyspělých zemí a druhou nejčastější příčinou smrti v zemích rozvojových. Z tohoto důvodu se domnívám, že vynakládání nemalých finančních obnosů a obrovského úsilí vědeckých týmů z celého světa na objevení vhodných léků jsou bezpochyby dobrou a velmi prospěšnou investicí.

Na druhou stranu je nutno říci, že se v současnosti prodlužuje doba od diagnózy nádorového onemocnění do úmrtí pacienta. To je dáno zejména neoddiskutovatelnými pokroky v medicíně umožňujícími diagnostikovat rakovinu v časnějším stádiu, což hraje rozhodující roli v pacientově prognóze. Pokud je nádorové onemocnění diagnostikováno až v pozdější fázi, kdy už došlo k tvorbě metastáz, snižuje se pravděpodobnost uzdravení nemocného z padesáti na deset procent.

Budeme-li se soustředit na způsoby terapie nádorových onemocnění, které se v této době používají, musíme se zmínit o chirurgických zásazích, radioterapii, chemoterapii a imunoterapii.

Ačkoli je chirurgický zásah metodou nejstarší, sám o sobě není dostatečný pro kompletní vyléčení pacienta, a tudíž musí být kombinován s dalšími terapeutickými metodami, jako jsou chemoterapie, radioterapie či imunoterapie, a ne vždy dokáže tato kombinace léceb nemocného zachránit.

Největším problémem radioterapie i chemoterapie je jejich nespecifita a s tím související fakt, že nedochází k likvidaci jen buněk nádorových, ale i krvetvorných, zárodečných, buněk vlasových folikulů a gastrointestinálního epitelu, tedy všech buněk, které se rychle dělí. Absolvování radioterapie dále významně zvyšuje pravděpodobnost vzniku dalšího nádorového onemocnění, a to zejména v pozdějším věku. Vůči chemoterapii jsou navíc citlivé pouze ty buňky, které jsou v S nebo M fázi buněčného cyklu, ostatní buňky léčbu přečkají a umožňují tak opětovný vznik novotvaru.

Imunoterapie zaznamenává v poslední době mohutný rozvoj. K léčbě nádorů se používají nejen monoklonální protilátky (MAbs), ale i cytokiny a dendritické buňky.



Velikou nevýhodou imunoterapie je však její finanční náročnost a to, že její možnosti zůstávají do jisté míry neobjeveny. Z tohoto důvodu se i náš tým vydal právě touto cestou. Doufáme, že se nám podaří najít takový lék, který bude v první řadě pro člověka nezávadný a v druhé řadě bude s co možná největší účinností vyvolávat cílenou likvidaci pouze buněk primárního nádoru, popřípadě metastáz. Klíčovou roli v celém procesu likvidace zhoubného bujení by podle našich představ měly hrát buňky vrozené imunity, i když neopomenutelná je i jejich spolupráce s buňkami imunity získané.

Rakovina je pro lidstvo opravdu velkou hrozbou. Předpokládá se, že v roce 2050 již každý druhý obyvatel naší planety touto chorobou onemocní, a pokud se nepodaří objevit vhodný lék, poroste i celkový počet zemřelých. Myslím si, že uzdravení byť jediného člověka za veškerou snahu všech vědeckých týmů po celém světě stojí!

## **2. Přehled literatury**

### **2.1 Úvodní charakteristika nádorových onemocnění**

#### **2.1.1 Definice**

Pojem nádorové onemocnění, nebo také rakovina či zhoubný novotvar, je používán pro souhrnné označení zhruba stovky velmi heterogenních chorob, které však mají i mnoho společného. Nádorové onemocnění je charakterizováno jako přírůstek tkáňové hmoty klonálního charakteru, který je geneticky podmíněný. Růst zhoubného novotvaru neodpovídá růstu okolních tkání ani rovnovážnému stavu organismu. Dokonce přetrvává i po odstranění příčiny vzniku zhoubného bujení (Rejthar a Vojtěšek 2002).

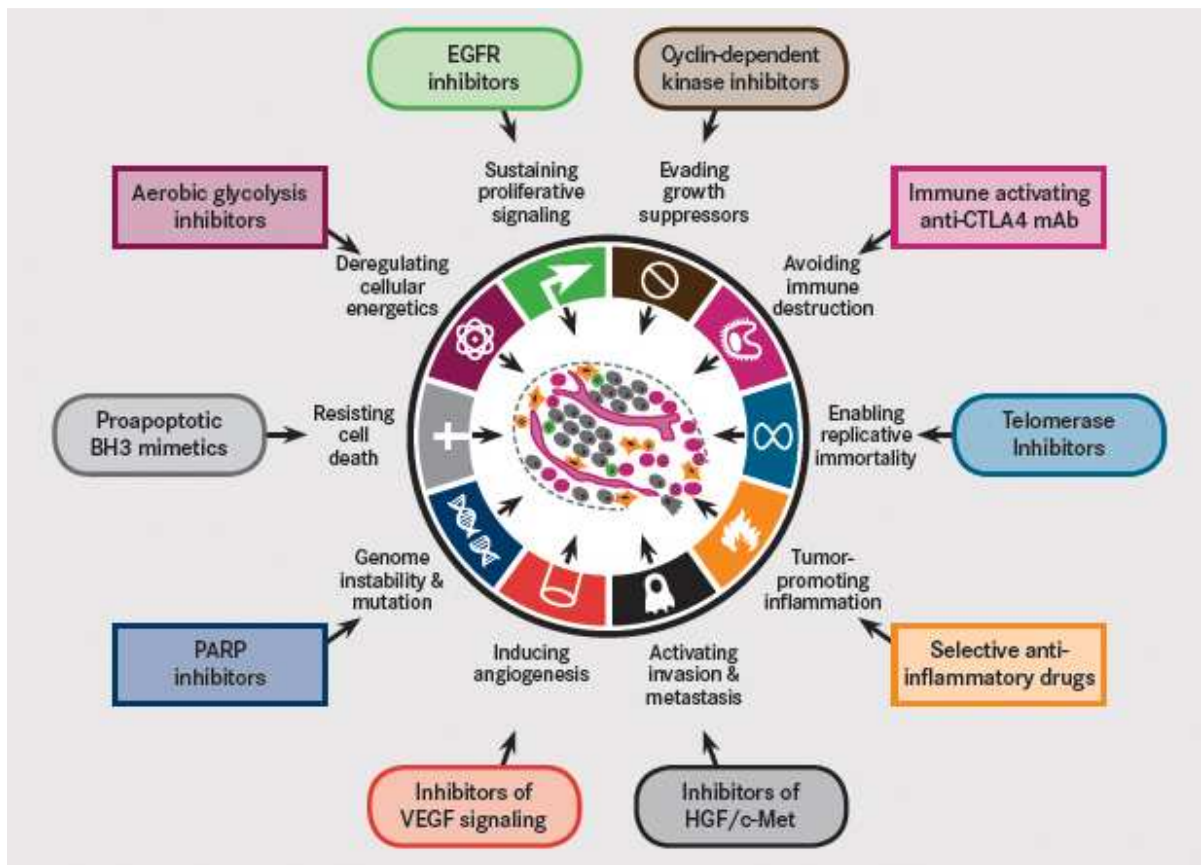
#### **2.1.2 Společné znaky nádorových buněk**

Léta studií odhalila, že vznik rakoviny je mnohastupňový proces zahrnující nahromadění genetických změn v normální lidské buňce a její následnou transformaci v buňku vysoce maligní (Renan 1993, Stratton a kol. 2009).

Již v roce 2000 byla detailně popsána šestice společných rysů pro všechny nádorové buňky. Jsou jimi soběstačnost v produkci růstových faktorů, necitlivost vůči signálům bránícím proliferaci, neomezený replikační potenciál, únik apoptóze, angiogeneze a invazivita a metastazování. (Hanahan a Weinberg 2000). Později byla skupina charakteristických znaků rozšířena o nestabilitu genomu nádorové buňky, deregulaci hospodaření s energií uvnitř buňky, vznik zánětu podporujícího nádor a maskování se před imunitním systémem (Hanahan a Weinberg 2011).

Kvůli těmto charakteristikám jsou nádory na okolním prostředí nejen méně závislé, ale současně jej poškozují a omezují. Z důvodu úniku imunitnímu systému jsou jím těžko rozpoznávány, a tudíž dochází k nedostatečné odpovědi imunitního systému na nádorové bujení. Toto souhrnně činí z nádoru skutečně obtížného a sofistikovaně se bránícího soupeře nemocných lidí, onkologů i celých vědeckých týmů.

Na druhou stranu je nutno říci, že z každé z těchto společných vlastností nádorových buněk vychází různá možnost a způsob cílení protinádorové terapie. Všechny společné rysy a z nich vycházející principy, na nichž může být protinádorová terapie založena, jsou znázorněny na Obr. 1.



Obr. 1: Možnosti cílení terapeutik proti charakteristickým rysům nádorových buněk (Hanahan a Weinberg 2011).

### 2.1.3 Dělení nádorů

Podle vztahu k okolní tkáni a způsobu šíření se nádory rozdělují na benigní, neboli nezhoubné, a maligní, čili zhoubné.

Benigní nádory rostou pomalu, bývají zpravidla diferencovány a dobře ohraničeny či zapouzdřeny, což umožňuje jejich relativně snadnou chirurgickou odstranitelnost. Ačkoli nevytvářejí metastázy a nejsou invazivní, mohou pacienta ohrožovat lokálně, a to tlakem na okolní tkáň a svou endokrinní aktivitou.

Růst maligních nádorů je rychlejší, mnohem agresivnější a invazivní. Jejich ohraničení nebývá přesné, čímž se maligní nádory stávají hůře odstranitelnými. Jsou charakteristické schopností šířit se po těle pomocí lymfatického a cévního systému a následným zakládáním dceřiných nádorových ložisek, čili metastáz, které nejsou závislé na primárním nádoru (Abercrombie a Ambrose 1962, Chambers a kol. 2009, Seyfried a Huysentruyt 2013). Metastázy jsou špatně lokalizovatelné, což znesnadňuje jejich léčbu. Po odstranění primárního nádoru mívá jejich přehlédnutí často za následek recidivu. Svým

biologickým chováním způsobují maligní nádory destrukci napadené tkáně a bez včasného terapeutického zákroku bývají fatální (Steeg a Theodorescu 2008).

**Podle tkáňového původu** rozlišujeme nádory epiteliální, mezenchymální, hematopoetické a lymforetikulární, neuroektodermální, germinální a teratomy, nádory smíšené a nádory ostatních tkání (Becker a kol. 2005, Sell 2004).

Dalším možným kritériem pro dělení nádorů je jejich **orgánová lokalizace**. Takto rozlišujeme například nádory plic, tlustého střeva a konečníku, prsu, varlat, vaječníku, kůže a jiné.

#### **2.1.4 Maligní melanom**

Maligní melanom je řazen mezi nádory neuroektodermálního původu (Sell 2004). Tento agresivní a velmi zhoubný novotvar odvozený od melanocytů (Clarc a kol. 1969) se zpravidla vyskytuje na kůži (Tuong a kol. 2012), nejčastěji na hlavě, horních a dolních končetinách a trupu (Crombie 1981). Méně často může být maligní melanom lokalizován v oku (Bowen a kol. 1964) a v tenkém střevě (Krausz a kol. 1978).

Poprvé byl maligní melanom popsán v 18. století (Hajdu 2011). Nejčastěji postihuje lidi mezi 60. a 70. rokem jejich života a jeho incidence stále roste. Udává se, že tento nárůst se v bělošské populaci každoročně pohybuje mezi třemi a sedmi procenty (Marks 2000). Přes veškeré snahy lékařů zůstává medián přežití nemocných po dobu posledních 30 let stále v rozmezí šesti až osmi měsíců od diagnózy (Garbe a kol. 2000, Kocák 2012). Ačkoli se maligní melanom s incidencí blížící se 20 osobám na 100 000 obyvatel České republiky (Kocák 2012) neřadí mezi nádory nejčastější, bez pochyby patří mezi nádory nejagresivnější.

#### **2.1.5 Myší melanom B16 a jeho linie**

Vznik myšího maligního melanomu je datován na počátek 20. století. Tehdy se u inbredního myšího kmene spontánně vyvinul i melanom B16, který je asi nejznámějším a experimentálně nejčastěji používaným ze všech myších maligních melanomů (Damsky a Bosenberg 2010).

Do skupiny B16 patří čtyři linie, konkrétně B16-F0, což je linie mateřská, z ní vzniklé linie B16-F1 a B16-F10, a linie B16-F6, která je odvozená od linie B16-F10 (Nakamura a kol. 2002). Jednotlivé linie se liší jak mírou invazivity, tak tvorbou metastáz. Nejagresivnější a nejinvasivnější je přitom melanom B16-F10, který jsme právě z tohoto důvodu používali i ve všech našich experimentech (Hart 1979). Další jeho důležitou charakteristikou je metastazování, a to zejména do plicní tkáně (Fidler 1975).

## 2.2 Nádory a imunitní systém

### 2.2.1 Základní charakteristika vrozené a získané imunity

Souhrnně lze říci, že úlohou imunitního systému je zachovávání integrity organismu, odlišení „cizího od vlastního“ s následnou eliminací „cizího“ a zajišťování imunologického dohledu. Kromě toho je nesmírně důležité i rozpoznání buněk těla vlastních, které však byly patologicky pozměněny, jako je tomu i u buněk nádorových.

K plnění všech těchto úkolů imunitního systému slouží dvě jeho složky, imunita vrozená, neboli nespecifická, a imunita získaná, neboli specifická. Ačkoli se svou funkcí velmi liší, pro správné fungování imunitního systému jako celku je jejich spolupráce nezbytná.

**Imunita vrozená** je fylogeneticky mnohem starší než imunita získaná (Medzhitov a Janeway 1997) a imunitní odpověď je rychlejší než v případě imunity získané. Zatímco zde mluvíme řádově o hodinách, v případě získané imunity se jedná až o dny. Název vrozené imunity vychází z faktu, že receptory zodpovědné za rozpoznání patogenních struktur, neboli PRRs (z anglického pattern recognition receptors), jsou kódovány již v zárodečné linii, jsou tedy vrozené (Janeway a Medzhitov 2002, Hoffmann a kol. 1999).

Dalšími hlavními znaky vrozené imunity jsou nízká specifita a absence imunologické paměti. To znamená, že při prvním i každém dalším setkání s antigenem je imunitní reakce vždy stejná, stejně rychlá, nikdy nevznikají paměťové buňky a protilátky (Turvey 2010).

Mechanismy, jimiž vrozená imunita bojuje s infekcí, jsou fagocytóza, indukce syntézy antimikrobiálních peptidů, indukce syntézy oxidu dusnatého v makrofágách, vznik zánětu, cytokinů a exprese kostimulačních molekul přítomných na antigen prezentujících buňkách (dále APC; Liu a Janeway 1991).

**Získaná imunita** je fylogeneticky mladší, objevuje se až u vyšších obratlovců (Medzhitov a Janeway 1997). Její funkce je založena na existenci receptorů vznikajících v průběhu života na základě předcházejícího setkání s antigenem. Každý jedinec má tedy různé receptory odlišných specifit, které jsou klonálně exprimovány na T a B lymfocytech (Medzhitov a Janeway 1997). Na základě prvního setkání s antigenem vznikají paměťové buňky a protilátky, tento proces je však relativně pomalý. Díky imunologické paměti a specifitě získané imunity je možné, aby při dalším setkání s tímtož antigenem imunitní odpověď proběhla rychleji (Turvey 2010).

V aktivaci mechanismů získané imunity hraje důležitou roli imunita vrozená (Hoffmann a kol. 1999, Medzhitov a Janeway 1998). Na imunitní systém se tedy musí pohlížet jako na složitý spolupracující celek, ve kterém každá z jeho složek plní část jeho funkcí, ale teprve dohromady vytvářejí propracovaný, koordinovaný a správně fungující systém.

### **2.2.2 PRRs a PAMPs**

Pokud dojde k napadení obratlovce patogenním organismem, nejprve musí být tento škodlivý organismus rozpoznán. První linií obrany je vždy vrozená imunita a k tomuto účelu slouží již zmiňované PRRs.

PRRs, jež byly popsány u APC, granulocytů a buněk endoteliálních a slizničních (Mushegian a Medzhitov 2001), jsou schopny rozlišit až tisícovku vysoce konzervovaných molekulových vzorů typických pro patogenní organizmy, takzvaných PAMPs (z anglického pathogen associated molecular patterns). Dále jsou PRRs schopny rozlišit struktury spojené s poškozením tkáně, čili DAMPs (z anglického damage associated molecular patterns). Mezi PAMPs řadíme například lipopolysacharid (dále LPS), lipoteichoovou kyselinu (dále LTA), flagelin, zymosan, manan, peptidoglykan,  $\beta$ -glukan, syntetické sloučeniny a spoustu dalších (Kumar a kol. 2011). Typy PRRs a jejich ligandy jsou znázorněny v Tab. I.

Na základě setkání s některým z PAMPs či DAMPs je indukována destrukce patogenního organismu, a to buď mechanismem fagocytózy, nebo pomocí komplementu (Akira a kol. 2006, Bianchi 2007).

Existuje celá řada možností, jak mohou být PRRs děleny. Jedna z nich je členění podle účinků, které následují po vazbě příslušných PAMPs, a to na sekretované, signální a fagocytární PRRs.

Tab. I: **PRRs a jejich ligandy** (Takeuchi a Akira 2010).

PRRs	Lokalizace	Ligand	Původ ligandu
<b>TLR</b>			
TLR1	plasmatická membrána	triacyl lipoproteiny	bakterie
TLR2	plasmatická membrána	lipoproteiny	bakterie, viry, paraziti, vlastní
TLR3	endolysosom	dsRNA	viry
TLR4	plasmatická membrána	LPS	bakterie, viry, vlastní
TLR5	plasmatická membrána	flagelin	bakterie
TLR6	plasmatická membrána	diacyl lipoproteiny	bakterie, viry
TLR7 (human TLR8)	endolysosom	ssRNA	viry, bakterie, vlastní
TLR9	endolysosom	CpG-DNA	viry, bakterie, protozoa, vlastní
TLR10	endolysosom	neznámý	neznámý
TLR11	plasmatická membrána	profilin-like molekula	protozoa
<b>RLR</b>			
RIG-I	cytoplasma	krátká dsRNA, 5'trifosfát dsRNA	RNA viry, DNA viry
MDA5	cytoplasma	dlouhá dsRNA	RNA viry (Picornaviridae)
LGP2	cytoplasma	neznámý	RNA viry
<b>NLR</b>			
NOD1	cytoplasma	iE-DAP	bakterie
NOD2	cytoplasma	MDP	bakterie
<b>CLR</b>			
Dectin-1	plasmatická membrána	$\beta$ -glukan	fungi
Dectin-2	plasmatická membrána	$\beta$ -glukan	fungi
MINCLE	plasmatická membrána	SAP130	fungi, vlastní

### 2.2.2.1 Sekretované PRRs

jsou charakteristické tím, že po navázání příslušného z PAMPs spouštějí komplementovou kaskádu a následně dochází k opsonizaci fagocytózy na úrovni C3b. Do této skupiny řadíme například C-reaktivní protein (dále CRP) a lektin vázající manosu nebo mannan (dále MBL; Black a kol. 2004, Clos 2000, Turner 1996).

#### MBL

Lektin vázající manosu a lektin vázající mannan jsou synonyma používaná pro označení téhož receptoru. MBL patří do rodiny C-lektinů a skupiny kolektinů (Kilpatrick 2002) a je produkován hlavně hepatocyty (Sørensen a kol. 2006). V krevním řečišti může vytvářet několik typů oligomerních struktur, avšak k aktivaci komplementu je potřeba minimálně tetramerní struktura, dimery a trimery se zdají být nefunkční (Sheriff a Ezekowitz 1994). MBL je schopen detekovat cizorodé uhlíkaté molekulové vzory z povrchových struktur bakterií, virů, protozoí i hub. Navázáním na zmiňované PAMPs dochází k aktivaci komplementu lektinovou drahou. Mimo jiné MBL opsonizuje apoptotické a stárnoucí buňky, a tak iniciuje jejich fagocytózu. (Petersen a kol. 2001).

### 2.2.2.2 Signální PRRs

jsou hlavními spouštěči mechanismů vrozené imunity. Rozpoznání patogenního organismu a jeho navázání signálním receptorem vyvolá expresi celé řady genů odpovědných za imunitní odpověď. Do této skupiny řadíme membránově vázané Toll-like receptory (dále TLRs) a cytoplasmatické NOD-like receptory (Moresco a kol. 2011, Chen a kol. 2008).

#### TLRs

Gen Toll byl poprvé identifikován a prozkoumán u *Drosophily*. Bylo zjištěno, že zodpovídá nejen za vznik dorzoventrální osy v embryu, ale také kóduje receptor zajišťující imunitní odpověď proti patogenním houbám. Lidský homolog genu Toll je dnes označován jako TLR4 a po stimulaci indukuje produkci cytokinů a expresi kostimulačních molekul (Muzio a Mantovani 2000).

TLRs jsou exprimovány nejen v membránách buněk imunitního systému, jako jsou monocyty a makrofágy, dendritické buňky a T a B lymfocyty, ale i u fibroblastů a buněk epitelálních (Zarembek a Godowski 2002). U člověka bylo popsáno 10 typů TLRs, myši mají 13 typů těchto receptorů (Uematsu a Akira 2006). Seznam lidských TLRs a jejich agonistů je znázorněn v Tab. II.

Tab. II: TLRs a jejich agonisti (Mills 2011).

TLR	Localization	Pathogen-derived agonists	Endogenous agonists	Synthetic agonists
TLR1 and TLR2	Extracellular	Bacteria: peptidoglycan, lipoproteins, LTA Fungi: zymosan	–	Pam <sub>3</sub> Cys
TLR2 and TLR6	Extracellular	Bacteria: lipoproteins	Veriscan	MALP2
TLR3	Intracellular	Viruses: dsRNA	mRNA	PolyI:C
TLR4	Extracellular	Bacteria: LPS Viruses: RSV fusion protein Fungi: mannan Protozoa: glycoinositolphospholipids	Saturated fatty acids, β-defensins, oxLDL*, amyloid-β*	Lipid A derivatives
TLR5	Extracellular	Bacteria: flagellin	–	–
TLR7 and TLR8	Intracellular	Viruses: ssRNA	Self RNA	Imiquimod, R-848
TLR9	Intracellular	Bacteria: CpG DNA Viruses: CpG DNA Protozoa: CpG DNA, haemozoin	Self DNA	CpG-ODNs
TLR11	Extracellular	Uropathogenic bacteria Protozoa: profilin-like molecule	–	–

CpG-ODNs, CpG-containing oligodeoxynucleotides; dsRNA, double-stranded RNA; LPS, lipopolysaccharide; LTA, lipoteichoic acid; MALP2, mycoplasma macrophage-activating lipopeptide 2; oxLDL, oxidized low-density lipoprotein; polyI:C, polyinosinic-polycytidylic acid; RSV, respiratory syncytial virus; ssRNA, single-stranded RNA. \*Amyloid-β and oxLDL bind to CD36 and a TLR4–TLR6 heterodimer.



Lidské TLR1, 2, 4, 5, 6 a 10 jsou receptory povrchové a rozpoznávají povrchové PAMPs. Například TLR2 váže peptidoglykan a LTA gram pozitivních bakterií, dále zymosan,  $\beta$ -glukan a některé z DAMPs (Schwandner a kol. 1999). LPS je agonistou TLR4. Kromě LPS váže TLR4 i některé z heat-shock proteinů patřících do skupiny DAMPs (Hoshino a kol. 1999).

TLR3, 7, 8 a 9 se vyskytují v membránách fagolysosomů a rozpoznávají cizorodou RNA a různé syntetické sloučeniny. TLR3 váže viriální dvouřetězcovou RNA a jí podobnou syntetickou sloučeninu nazvanou polyinosinická-polycytidylická kyselina (dále poly I:C; Alexopoulou a kol. 2001). Agonisty TLR7 a 8 jsou rovněž cizorodé jednořetězcové RNA, ale i různé syntetické sloučeniny, z nichž jedna, resiquimod (dále R848), byla hojně používána v našich experimentech (Gorden a kol. 2005, Heil a kol. 2004).

Navázáním příslušného TLR na některý z jeho agonistů vzniká informace, která je transportována do jádra a způsobuje zvýšení exprese prozánětlivých cytokinů, a následný vznik zánětlivé imunitní odpovědi. Dále je podporována maturace dendritických buněk (dále DC) podílejících se na prezentaci antigenu, aktivace cytotoxických T-lymfocytů a přirozených zabíječů (dále NK buňky) a fagocytóza zprostředkovaná neutrofily a makrofágy (Barton a Medzhitov 2003).

### **2.2.2.3 Fagocytární PRRs**

nalezneme na povrchu všech typů fagocytů, tedy neutrofilů, makrofágů a dendritických buněk. Interakce fagocytárního receptoru s mikroorganismem nesoucím příslušný PAMP vede k fagocytóze daného mikroorganismu. Do této skupiny patří formylpeptidové receptory (dále FPRs), scavenger receptory, manosový receptor a dectin 1 (Le a kol. 2002, Peiser a kol. 2002, Stahl a Ezekowitz 1998, Brown a kol. 2002).

#### **FPRs**

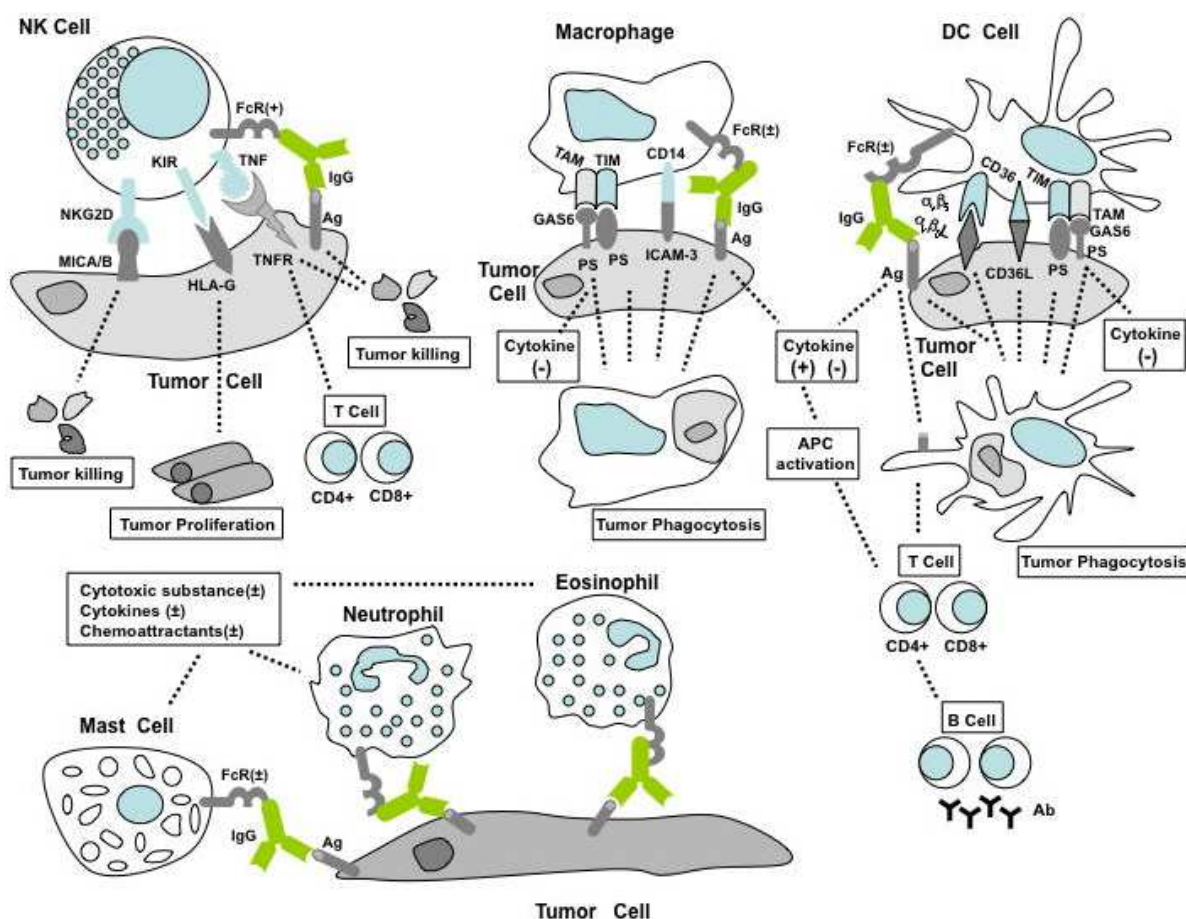
jsou skupinou transmembránových receptorů spřažených s G-proteiny (Fu a kol. 2006). Původně byly objeveny u polymorfonukleárních buněk, monocytů a makrofágů, ale pozdější výzkum prokázal jejich přítomnost i u dendritických buněk, hepatocytů, trombocytů a neuronů (Becker a kol. 1998).

U lidí byly zatím popsány 3 typy formylpeptidových receptorů. FPR1 je exprimován hlavně u neutrofilů. Jedním z jeho agonistů je formyl-methionyl-leucyl-fenylalanin (dále f-MLF), který byl hojně používán v našich experimentech (Dufton a Perretti 2010). FPR2 se vyskytuje rovněž primárně u neutrofilů. Je schopen rozeznat širší spektrum formyl

peptidových motivů než FPR1, ale podmínkou je, že musejí pocházet z mitochondrií. Má afinitu i k f-MLF, i když nižší než FPR1 (Cattaneo a kol. 2013). FPR3 jsou receptory monocytů, makrofágů a dendritických buněk. Na rozdíl od předchozích se jedná o cytoplasmatické receptory a jejich funkce nebyla dosud řádně prostudována (Rabiet a kol. 2011).

### 2.2.3 Efektorové buňky imunitního systému a jejich úloha v boji s rakovinou

Hovoříme-li o efektorových buňkách imunitního systému, které se podílejí na likvidaci nádorových buněk, musíme se zmínit hlavně o NK buňkách, dendritických buňkách, makrofázích a neutrofilech. Z mechanismů, jimiž k destrukci nádorových buněk dochází, nesmíme opomenout lýzu, fagocytózu a zánět. Celý proces destrukce nádorové buňky různými efektery a mechanismy je znázorněn na Obr. 2.



Obr. 2: Rozpoznání nádorové buňky prostřednictvím vrozené imunity (Liu a Zheng 2012).

### 2.2.3.1 NK buňky

NK buňky, nebo také přirození zabíječi, byly objeveny a popsány počátkem 70. let minulého století. Řadí se mezi velké granulární lymfocyty a představují asi 5 – 8% ze všech periferních lymfocytů. Jsou schopny lyzovat nádorové a virem infikované buňky, aniž by byly na jejich povrchu prezentovány antigeny ve společnosti molekul hlavního histokompatibilního systému (dále MHC) a aniž by došlo k předcházející senzibilizaci těchto NK buněk (Herberman a kol. 1975, Liu a Zheng 2012).

K vlastní likvidaci nádorových buněk prostřednictvím přirozených zabíječů dochází několika různými způsoby. Za prvé NK buňky exprimují receptor stimulující lýzu nádorových buněk nazývaný NKG2D. K té dojde, pokud receptor NKG2D specificky rozpozná nádorový ligand MICA/B. Opačný účinek však vyvolávají receptory, které lýzu inhibují a naopak stimulují nádorový růst. Řadíme sem například KIR receptory, mezi jejichž ligandy patří atypické MHCI molekuly. Druhou možností je spuštění apoptózy nádorových buněk. Naváže-li některý z faktorů nádorové nekrózy (dále TNF, z anglického tumor necrosis factor), jenž je přítomen na povrchu nádorových buněk, receptor NK buněk zodpovědný za jejich rozpoznání, je spuštěn proces programované buněčné smrti nádorové buňky. Následně jsou ve větší míře produkovány CD4+ pomahačské a CD8+ cytotoxické T-lymfocyty. Poslední možností je aktivace FcR/CD16. Díky ní dochází k zničení nádorové buňky prostřednictvím ADCC, neboli buněčné cytotoxicity závislé na protilátkách (Liu a Zheng 2012).

### 2.2.3.2 Dendritické buňky

Objev dendritických buněk je datován na konec 19. století. Bylo zjištěno, že dendritické buňky patří mezi mononukleární fagocyty a jejich hlavní role spočívá ve zpracování a následné prezentaci antigenu T-lymfocytům. Fungují tedy jako poslové mezi vrozenou a získanou imunitou. Jejich další důležitou rolí je iniciace a regulace vysoce specifické imunitní reakce proti patogenům a účast na navození imunologické tolerance a vzniku imunologické paměti (Geissmann a kol. 2011).

Co se týče destrukce nádorových buněk, dendritické buňky mohou pohltit apoptotické nádorové buňky díky aktivaci  $\alpha_v\beta_5$ , CD36, FCR, TIM a TAM receptorů. Dále spolu s makrofágy i dendritické buňky produkují cytokiny podporující aktivaci APC, která vede k vzniku buněčné a látkové imunitní odpovědi zprostředkované získanou imunitou.

Následkem aktivace FcR je umožněna lepší prezentace nádorových antigenů (Liu a Zheng 2012).

### **2.2.3.3 Makrofágy**

Makrofágy jsou všudypřítomné mononukleární leukocyty řadící se mezi buňky vrozené imunity. Kromě fagocytózy je jejich úkolem i prezentace antigenu a produkce celé řady cytokinů a dalších imunomodulátorů. Účastní se likvidace patogenů, zánětu a reparace tkáně. (Naradin a Abastado 2008, Liu a Zheng 2012).

Vztah makrofágů k nádorovým buňkám není jednoznačný. Na jednu stranu bylo prokázáno, že v pokročilém stádiu onkologického onemocnění produkuje určitá populace makrofágů, již nazýváme makrofágy spojené s nádorem, řadu látek, které přímo stimulují nádorový růst, ale i invazivitu a metastazování. Z myeloidních buněk vznikají i supresorové buňky, které potlačují adaptivní protinádorovou imunitní odpověď. Vhodně aktivované makrofágy jsou na druhou stranu schopny kontrolovat počáteční vývoj nádoru. Pilotní studie navíc prokázaly prospěšnost makrofágů jako adjuvantní terapie při onkologickém onemocnění. Mechanismy, jimiž makrofágy likvidují nádorové buňky, zůstávají však stále neobjasněny (Naradin a Abastado 2008).

### **2.2.3.4 Neutrofilly**

Neutrofilly se společně s basofily a eosinofily řadí mezi polymorfonukleární leukocyty a tvoří první obrannou linii imunitního systému, respektive vrozené imunity. V krvi se vyskytují v hojném zastoupení – je jich více než 60% ze všech leukocytů. Pokud však nejsou pomocí interleukinu (dále IL) -8, C5a, INF (dále interferonu) - $\gamma$  a leukotrienu B4 produkovaného endoteliálními buňkami, mastocyty a makrofágy chemotakticky přivedeny do patogenem infikovaného místa nebo místa, kde probíhá akutní fáze zánětu, brzy zanikají. Neutrofilly neexprimují jen receptory pro chemotaxi, ale i receptory pro ILs, INF $\gamma$ , Fc receptory, komplementové, lektinové a cytokinové receptory a receptory rozpoznávající endotelium.

Jejich hlavním úkolem je fagocytóza a sekrece prozánětlivých mediátorů. Neutrofilly pohlcují patogenní organismy do fagosómu, jenž posléze fúzuje s intracelulárními granuly za vzniku fagolysosómu. Zde jsou patogeny zabity v důsledku vystavení enzymům, antimikrobiálním peptidům a reaktivním formám kyslíku (dále ROS; Lee a kol. 2003, Appelberg 2007, Mayer-Scholl a kol. 2004).

Neutrofilní cytotoxické mechanismy se tradičně dělí do dvou skupin. První jsou nezávislé na kyslíku, druhé na něm závisí. Obě skupiny mechanismů spolu při zabití patogenů úzce spolupracují. Do první skupiny patří azurofilní, specifická a gelatinázová granula obsahující proteázy, antimikrobiální peptidy a enzymy. Úkolem proteáz, mezi které patří neutrofilní elastáza a katepsin G, je degradace bakteriálních peptidů a faktorů virulence. Defensiny, lysosym a proteiny zvyšující baktericiditu a permeabilitu bakteriální buňky patří mezi antimikrobiální peptidy, jejichž role v procesu fagocytózy je také nezanedbatelná. Důležitost mechanismů cytotoxicity neutrofilů nezávislé na kyslíku byla popsána u dvou vzácných genetických chorob nazývajících se Chediakův-Higashiho syndrom a specifická granulární deficiencie, které se projevují rekurentními infekcemi a zkrácenou průměrnou délkou života (Mayer-Scholl a kol. 2004).

Druhý způsob zabíjení patogenů neutrofilů je závislý na kyslíku. Ve fagocytujících neutrofilech probíhá takzvané oxidativní vzplanutí (z anglického oxidative burst), tedy proces, ve kterém komplex NADPH oxidázy na membráně fagosómů syntetizuje  $O_2^-$ . Z něj obratem díky superoxidodismutáze vzniká peroxid vodíku. Dále se uplatňuje myeloperoxidáza, jež je součástí azurofilních granul neutrofilů a dává vzniku HOCl. HOCl hraje důležitou roli v zabíjení patogenů, i když mechanismus tohoto jevu ještě nebyl vysvětlen. Význam ROS pro antimikrobiální aktivity byl potvrzen zvýšenou náchylností k infekcím u pacientů s chronickým granulomatózním onemocněním, tedy nemocí, jejíž podstata spočívá v inaktivitě komplexu NADPH oxidázy (Mayer-Scholl a kol. 2004).

Z vědeckých prací plyne, že se nepředpokládá žádný zvláště významný účinek neutrofilů proti nádorovým buňkám a celým tumorům. Naším cílem je ale prokázat opak, a proto jsme se v této práci snažili inhibovat oxidativní vzplanutí neutrofilů pomocí epicatechinu a prokázat tak jeho význam v likvidaci nádorových buněk.

#### **2.2.4 Současná imunoterapie nádorových onemocnění**

Imunoterapií se rozumí povzbuzení imunitního systému k jeho následnému zásahu proti nádorovým buňkám vedoucím k jejich cílené likvidaci. Jedná se o mohutně se rozvíjející vědní obor představující naději pro celou řadu onkologických pacientů.

### 2.2.4.1 Viditelnost nádorových buněk pro imunitní systém

Pokud se jedné z nádorových buněk, které v těle vznikají s každodenní pravidelností, podaří uniknout imunitnímu dozoru a není imunitním systémem zlikvidována, dochází k vzniku nádoru (Burnet 1957).

Nádorové buňky, a tedy i celé nádory z nich vzniklé, jsou obecně velmi málo imunogenní (Qin a kol. 1998). Jde o vlastní tkáň a vlivem nahromaděných mutací vznikají jen slabé antigeny. Navíc dochází k manipulaci s antigeny ze strany nádorů. Jedná se o snížení jejich exprese mající za následek ochranu před T-lymfocyty, maskování antigenních determinant pomocí sializace, záměrnou selekci ve prospěch nádorových populací exprimujících co nejméně antigenů a vznik mutací v antigenech, čímž se dané antigeny stávají pro imunitní systém neviditelnými (Smyth a kol. 2006, Kim a kol. 1975).

K prezentaci těchto antigenů je nutná přítomnost molekul kostimulačních a MHCI, ale nádory oboje exprimují jen velmi slabě, či dokonce vůbec (Pietra a kol. 2012, Bicknell a kol. 1994). Je-li antigen prezentován lymfocytům bez kostimulačních molekul, nedochází k vzniku imunitní odpovědi, ale naopak k navození tolerance.

K další supresi imunitního systému ze strany nádorů dochází důsledkem produkce TGF $\beta$  (z anglického transforming growth factor  $\beta$ ). Ten způsobuje vznik regulačních T-lymfocytů z CD4+ buněk. Regulační T-lymfocyty suprimují pomocí TGF $\beta$  útok cytotoxických T-lymfocytů na nádorové buňky a zároveň autokrinně podporují vznik dalších regulačních lymfocytů (Yamagiwa a kol. 2001). Na navození nádorové tolerance se podílí také IL-10 (Fortis a kol. 1996).

Stejně jako všechna imunoprivilegovaná místa exprimují i nádory velké množství Fas ligandu. Jedná se o transmembránový protein, který vytváří na povrchu buňky heterodimér a je agonistou transmembránového Fas receptoru. Navázání Fas receptoru na Fas ligand vede ke spuštění programované buněčné smrti. U nádorových buněk je exprese Fas receptoru snížena, aby nelikvidovaly sebe sama, ale zvýšená exprese Fas ligandu má za následek cílenou likvidaci T-lymfocytů, na jejichž povrchu je z regulačních důvodů Fas receptor také exprimován (O'Connell a kol. 1999).

Souhrnně lze říci, že všemi těmito způsoby navozují nádory svou imunologickou toleranci, dochází k vzniku takzvaného patologicky imunoprivilegovaného místa. Z tohoto důvodu je nutno imunitnímu systému pomoci, aby se byl schopen se zhoubným bujením vypořádat.

#### 2.2.4.2 Imunoterapeutické metody pro léčbu onkologických onemocnění

V této době se k léčbě nádorových onemocnění využívá několik hlavních imunoterapeutických metod, které jsou založeny na mechanismech a funkci získané imunity.

Prvním z možných legálních způsobů imunoterapie nádorových onemocnění je vystavení dendritických buněk antigennímu pulzu. Nejprve musí být pacientovi odoperován primární nádor, ze kterého je připraven lyzát. Pomocí leukaferézy se separují monocyty, z nichž jsou v laboratorních podmínkách získány nezralé dendritické buňky. Jejich smícháním s nádorovým lyzátem je docíleno toho, že nezralé dendritické buňky začnou nádorové antigeny zpracovávat a prezentovat v komplexu s MHC molekulami. Zralé dendritické buňky prezentující nádorové antigeny jsou vráceny do pacientova těla, kde svou činností umožňují T-lymfocytům, aby rozpoznaly nádorové antigeny a následně zničily nádorové buňky. Jelikož se takovýchto vakcín připravuje dvacet až pětadvacet najednou a jsou injikovány pacientovi v širším časovém období, může nastat problém se změnou antigenní charakteristiky nádoru (Schuler 2010, Engleman 2003, Schuler a kol. 2003).

Druhou možností je bojovat proti rakovině s využitím monoklonálních protilátek, a to jak lidských, tak humanizovaných. Tato metoda zaznamenala obrovský rozvoj na počátku 90. let minulého století (McKenzie a kol. 2003). Do obsáhlého seznamu výhod této metody řadíme vysokou specifitu monoklonálních protilátek pro nádorové antigeny, nízkou míru zkřížené reaktivity se somatickými buňkami, vysokou čistotu, možnost předurčit antigenní specifitu, ovlivnitelnost efektorové funkce monoklonálních protilátek a možnost navázání toxinu, cytostatika, radionuklidu či cytokinu na monoklonální protilátku. Nevýhodami jsou nesnadná distribuce a průnik monoklonálních protilátek do nádorů, antigenní heterogenita nádorů a maskování nebo internalizace nádorových antigenů (Weiner a kol. 2010, Weiner a kol. 2009, Melero a kol. 2007, Christiansen a kol. 2004).

Za třetí lze v boji s rakovinou využít různé cytokiny a jejich kombinace. Jednou z možností je použití INF- $\alpha$ , který je využíván zejména k terapii hematologických malignit, ale i některých solidních tumorů, jako je třeba metastatický karcinom ledviny (Kirkwood 2002). Bylo však prokázáno, že vůči nádorovým buňkám i buňkám imunitního systému vykazuje INF- $\alpha$  různé a mnohdy antagonistické účinky (Lukešová a kol. 2006). Velikými výhodami použití tohoto cytokinu však zůstává jeho přímý cytostatický a lytický efekt na nádorové buňky, stimulace NK buněk a makrofágů, zvyšování exprese MHCI antigenů a následné zvýšení citlivosti vůči cytotoxickým T-lymfocytům, lepší zpracování nádorových antigenů mající za následek rozvoj specifické T-lymfocytární imunitní odpovědi a další.

INF- $\alpha$  se v imunoterapii nádorových onemocnění často používá i v kombinaci s dalšími látkami, jako například IL-2, 5-fluorouracil a zidovudin. (Lukešová a kol. 2006, Belardelli a kol. 2002, Ferrantini a kol. 2007).

Dalšími možnostmi imunoterapie nádorů jsou například blokáce TGF- $\beta$ , používání DNA nebo peptidových vakcín a úprava nádorových buněk in vitro.

### **2.2.5 Náš přístup k imunoterapii nádorových onemocnění**

Na rozdíl od všech výše zmíněných způsobů imunoterapie nádorových onemocnění se náš tým vydal cestou aktivace mechanismů vrozené imunity. Je zcela samozřejmé, že nepostradatelná v boji s rakovinou je i imunita získaná a spolupráce obou systémů, naším cílem ale bylo (a stále zůstává) prokázat a popsat důležitou roli fagocytujících buněk a zánětu v procesu boje s rakovinou.

Při našich experimentech jsme se nechali inspirovat zejména dvěma vědeckými pracemi, z nichž starší je dílem Williama Coleyho a pochází již z 19. století. Její podstatou je, že doktor Coley používal k léčbě neoperovatelného sarkomu takzvaný Coleyho toxin, čili směs kultur bakterií *Streptococcus pyogenes* a *Serratia marcescens* (Coley 1891). Tento pokus byl úspěšný, a ačkoli je účinnost léčby pomocí Coleyho toxinu stále předmětem nejednoho sporu, je považován za prvopočátek imunoterapie nádorových onemocnění (McCarthy 2006).

Druhé dílo, jímž jsme byli inspirováni, pochází z vědeckých laboratoří týmu pana profesora Cuiho a z přelomu tisíciletí. Po transplantaci sarkomu myším kmene BALB/c objevili jedince, jenž je díky dominantní mutaci, označované jako SR/CR, odolný vůči všem transplantovaným nádorům. Fakt, že přenesení NK buněk, makrofágů a nebo neutrofilů z odolného jedince do jedince s nádorovým onemocněním v pokročilém stádiu vyvolává spontánní regresi nádoru, je považován za jeden z důkazů, že v procesu likvidace nádorového onemocnění jsou stěžejní mechanismy vrozené imunity. Další důkaz byl popsán u nu-nu myší, jimž chybí thymus, a tudíž i T-lymfocyty. Přenesení odolnosti vůči nádorům na tyto myši neznamenal zmenšení míry odolnosti těchto jedinců, čímž bylo prokázáno, že role T-lymfocytů není rozhodující. Zajímavé je, že buňky vrozené imunity jedince odolného vůči nádorům se nijak neliší od buněk ostatních jedinců. Není jich ani víc, ani nejsou aktivnější, nebo morfologicky a funkčně odlišné. Jediným rozdílem je schopnost lépe rozpoznat nádorové buňky, a tudíž je i cíleně likvidovat (Cui a kol. 2003).

Jsme přesvědčeni, že navázáním některé sloučeniny patřící do skupiny PAMPs na povrch nádorových buněk se nám podaří nejen zvýšit imunogenitu nádorů, a tudíž i jejich



viditelnosti pro imunitní systém, ale i dostatečně aktivovat mechanismy vrozené imunity. Kombinací signálních a fagocytárních PAMPs chceme docílit vzniku zánětu a mohutné infiltrace fagocytů do místa nádoru vedoucí ideálně k totální likvidaci nádorů.

### 2.2.5.1 Látky, které jsme v této práci používali při nádorové imunoterapii

V této práci jsme při nádorové imunoterapii používali látky dvojího druhu. První skupinu tvoří TLR agonisti (LPS, LTA, poly I:C, R848), jež jsme používali vždy v rozpustné formě. Jejich účelem bylo vyvolat zánět a zánětlivou infiltraci neutrofilů, později monocytů, respektive makrofágů. Tyto látky byly kombinovány s agonisty fagocytárních receptorů (f-MLF, manan), protože iniciují komplementovou opsonizaci. Agonisty fagocytárních receptorů však bylo nutno na povrch nádorových buněk ukotvit (viz další kapitola). Testovali jsme rovněž kotvení pomocí bakterie *Listeria monocytogenes*, u které najdeme směs signálních i fagocytárních motivů. Nyní přistoupíme k podrobnějšímu popisu jednotlivých látek.

**Lipopolysacharid (dále LPS)** je agonista TLR4 a hlavní složka vnější membrány gramnegativních bakterií, která je pro tyto organismy nezbytná. Má nejen strukturní, ale i ochrannou funkci. Skládá se ze tří částí, jimiž jsou hydrofobní doména zvaná lipid A nebo také endotoxin, plnicí funkci kotvy, jaderný oligosacharid a O-antigen, jež pomáhá bakteriím odolávat vůči antibiotikům, komplementovému systému a dalším stresům. LPS je velmi silný endotoxin, který vyvolává výraznou reakci imunitního systému. Dojde-li k aktivaci TLR4 pomocí lipidu A, je spuštěna biosyntéza prozánětlivých mediátorů, jako jsou TNF- $\alpha$  a IL-1 $\beta$ , kostimulačních molekul a tkáňového faktoru. Pro vznik zánětlivého procesu je vyvážená přítomnost LPS klíčová. Problém nastává při jeho nadprodukcii, jež může vyústit v septický šok, diseminovanou intravaskulární koagulaci, multiorgánové selhání a následnou smrt (Raetz a Whitfield 2002, Rosenfeld a kol. 2006).

**Lipoteichoová kyselina (dále LTA)** je hlavní strukturní jednotkou buněčné stěny grampozitivních bakterií a agonista TLR2. Její struktura se s jednotlivými druhy grampozitivních bakterií mírně liší, ale vždy je v membráně bakterií kotvena pomocí diacylglycerolu. Její antigenní vlastnosti spouštějí imunitní odpověď zahrnující produkci stejných prozánětlivých mediátorů, jak bylo zmíněno u LPS, dále produkci centrálního transkripčního faktoru, aktivaci komplementového systému a uvolňování kyslíkových a dusíkových radikálů z neutrofilů a makrofágů (Schwandner a kol. 1999).

**Poly I:C** je syntetická napodobenina virové dvouřetězcové RNA a agonista TLR3. Indukuje protivirovou imunitní odpověď, jejíž součástí je produkce INF- $\alpha$ , INF- $\beta$ , IL-1, IL-6, IL-12 a TNF- $\alpha$  (Zhou a kol. 2013, Fortier a kol. 2013)

**Resiquimod (dále R848)** je nízkomolekulární syntetický agonista TLR7 a 8. Spolu s imiquimodem je řazen do skupiny imidazoquinolinaminů. U obou sloučenin byl popsán významný antivirový a protinádorový účinek zapříčiněný produkcí endogenních cytokinů, jako například INF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 a TNF- $\alpha$ . Zároveň bylo prokázáno, že resiquimod účinkuje proti nádorům i virům silněji (Dockrell a Kinghorn 2001).

**Formyl-methionyl-leucyl-fenylalanin (dále f-MLF)** je řazen mezi formylmethioninové peptidy, které jsou typické pro prokaryota a mitochondrie a jsou rozpoznávané pomocí FPRs. Proteosyntéza prokaryot začíná vždy formylmethioninem, čímž se liší od proteosyntézy eukaryotní. F-MLF funguje jako vysoce účinný chemoreaktant pro leukocyty, zejména profesionální fagocyty, jimž signalizuje přítomnost bakterie a nutnost ji zlikvidovat. K tomu dochází hlavně díky produkci superoxidových aniontů (Hayashi a kol. 2013).

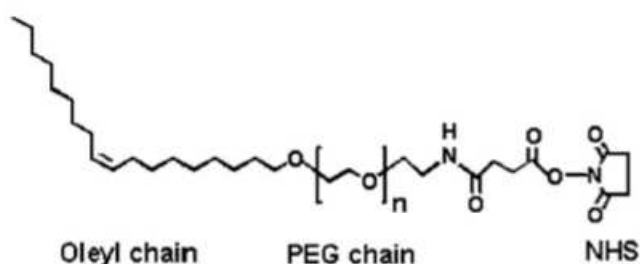
**Manan** je lineární polymer manosy. Vyskytuje se v buněčné stěně kvasinek, jako například *Saccharomyces cerevisiae*, a je agonistou MBL (Tada a kol. 2002). Detekce mananu zapříčiňuje aktivaci komplementu lektinovou drahou a opsonizaci fagocytózy. (Gadjeva a kol. 2001)

*Listeria monocytogenes* je všudypřítomná, malá, pohyblivá, nesporulující grampozitivní bakterie a původce listeriózy (Farber a Peterkin 1991). Její zvláštností je, že je schopna žít v cytoplasmě, a tudíž se řadí do nevelké skupiny intracelulárních patogenů. Z tohoto důvodu se používá jako vektor pro cílené vázání peptidových a proteinových antigenů, a to i v imunoterapii nádorových onemocnění (Pan a kol. 1995, Wallecha a kol. 2009).

#### 2.2.5.2 Způsoby vázání PAMPs k povrchu nádorových buněk

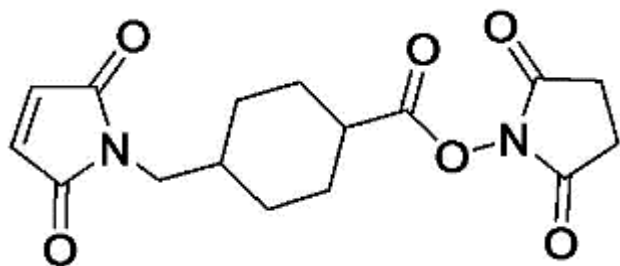
Prvním a zároveň nejjednodušším způsobem, jímž se dají PAMPs vázat na povrch nádorových buněk, je vázání nábojové. Představíme-li si nádor jako solidní kulovitý útvar, jehož povrch je díky přítomnosti kyseliny acetylsalicylové a fosfatidylserinu charakteristický záporným nábojem (Iwasaki a kol. 2008), dojde po intratumorální aplikaci kladně nabitě léčivé látky k jejímu navázání na povrch nádoru. Tímto způsobem se dají vázat například molekuly obsahující kladně nabitě řetězce bazických aminokyselin.

Druhý způsob, jenž byl v této práci využíván, je založen na kotvení léčiva do cytoplasmatické membrány nádorových buněk. K tomuto účelu nám sloužila sloučenina nazývaná biokompatibilní membránová kotva (dále BAM). **BAM** má na jednom ze svých konců hydrofobní olejovou skupinu, díky níž je schopna se pevně ukotvit do cytoplasmatické membrány nádorové buňky. Druhý konec BAM, na který se váže léčivo, je hydrofilní a tvořený polyethylenglykolem. Na konci této části molekuly je NHS skupina, která na základě interakce s aminoskupinami ligandů umožňuje jejich připojení. Velkou výhodou kotvení pomocí BAM je fakt, že nám umožňuje modifikovat antigenní vlastnosti nádorové buňky, aniž bychom ji jakýmkoli způsobem poškodili (Kato a kol. 2003, Kato a kol. 2004).



Obr. 3: **Struktura BAM** (Kato a kol. 2003)

Další možností vazby PAMPs na povrch nádorových buněk je jejich kovalentní navázání pomocí sukcinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyklohexan-1-karboxylátu (dále SMCC). SMCC je heterobifunkční neštěpitelná membránová kotva, která umožňuje kovalentní navázání ligandů na nádorové buňky. Obsahuje NHS – esterovou funkční skupinu na jednom a maleimidovou funkční skupinu na druhém konci. NHS – esterová skupina má afinitu k aminům, tudíž i k našim léčivům, a maleimidová skupina váže sulfhydrylové skupiny (Wu a kol. 2005, Bieniarz a kol. 1996). K tomu, aby bylo zajištěno správné navázání SMCC s příslušným ligandem k povrchu nádorových buněk, musí se nejprve zajistit přítomnost sulfhydrylových skupin na jejich povrchu. Pro tento účel byl používán tris(2-karboxyethyl)fosfin (dále TCEP), který redukcí cysteinů potřebné –SH vazby uvolnil a umožnil tak kovalentní navázání SMCC nesoucí léčivo (Janotová a kol. 2014).



Obr. 4: **Struktura SMCC** ([www.proteochem.com](http://www.proteochem.com))

### 3. Cíle práce

- otestovat účinnost dvojitého kotvení f-MLFG<sub>5</sub>K<sub>8</sub>(K(STE))(K(STE))-NH<sub>2</sub>, ligandu fagocytárních receptorů, do membrány nádorových buněk pomocí dvou alifatických řetězců kyseliny stearové
- ověřit předpoklad, že R848 (TLR7 a 8 agonista) by mohl být v humánní imunoterapii maligního melanomu použit jako vhodná náhrada LPS (TLR4 agonista)
- ověřit účinnost terapie melanomu B16-F10 založené na kovalentním navázání bakterií *Listeria monocytogenes* a mananu na cytoplasmatickou membránu nádorových buněk
- zjistit význam přidání bakterií *Listeria monocytogenes* ke kombinaci látek s výrazným protinádorovým účinkem
- provedením in vivo a in vitro experimentů potvrdit či vyvrátit hypotézu, že jedním z mechanismů, jímž neutrofilové zabíjejí nádorové buňky, je oxidativní vzplanutí

## 4. Materiál a metody

### 4.1 Chemické látky

- **BAM<sub>4000</sub>** – NOF Europe
- **EDTA** – Sigma-Aldrich
- **epicatechin** – Sigma-Aldrich
- **FCS** – Sigma-Aldrich
- **f-MLF** – Sigma-Aldrich
- **f-MLFG<sub>5</sub>K<sub>8</sub>(K(STE))(K(STE))-NH<sub>2</sub>** – Schafer-N
- **GM-CSF** – Sigma-Aldrich
- **laminarin** (*Laminaria digitata*) – Sigma-Aldrich
- **Listeria monocytogenes** – InvivoGen
- **LPS** (*Escherichia coli*) – Sigma-Aldrich
- **LTA** (*Bacillus subtilis*) – Sigma-Aldrich
- **manan** (*Saccharomyces cerevisiae*) – Sigma-Aldrich
- **poly I:C** – Sigma-Aldrich
- **RPMI 1640** – Sigma-Aldrich
- **R848** – Enzo, Tocris
- **SMCC** – Thermo Scientific
- **TCEP** – Sigma-Aldrich
- **TNF** – Sigma-Aldrich
- **Trypanová modř** – Sigma-Aldrich
- **Trypsin** – Sigma-Aldrich

#### 4.1.1 Příprava terapeutických roztoků

##### 4.1.1.1 Manan-BAM v PBS

Pětidenní redukční aminací roztoku mananu kyanoborohydridem sodným v prostředí octanu amonného (pH = 7,5; t = 50°C) byl získán roztok manan-NH<sub>2</sub> (Torosantucci a kol. 2005), jenž byl skrz dialyzační hadici MWCO 3500 přes noc za stálého míchání a při teplotě 4°C dialyzován proti PBS.

Při pH = 7,3 byla BAM navázána na aminoskupinu dříve aminovaného mananu (Kato a kol. 2004). Poté byl roztok znovu dialyzován za stejných podmínek, jako po aminaci. Výsledkem byl 0,2 mM manan-BAM v PBS.

Roztoky **manan-BAM+LPS v PBS** a **manan-BAM+R848 v PBS** byly připraveny smícháním 0,2 mM roztoku mananu-BAM v PBS s příslušným množstvím LPS, respektive R848 tak, aby jejich výsledná koncentrace činila 0,5 mg/ml.

#### **4.1.1.2 Manan-SMCC v PBS**

Roztok mananu-NH<sub>2</sub> připravený výše popsaným způsobem byl použit k navázání heterobifunkčního činidla SMCC na aminoskupinu mananu. Byl získán 0,2 mM manan-SMCC v PBS.

#### **4.1.1.3 *Listeria monocytogenes* v PBS**

Tepelně zabitě bakterie *Listeria monocytogenes* byly nejprve rozsuspendovány v PBS v množství 10<sup>10</sup> bakterií na 1 ml PBS. Následovalo upravení koncentrace suspenze tak, aby odpovídala 1 miliardě bakterií na 1 ml PBS.

#### **4.1.1.4 *Listeria monocytogenes*-SMCC v PBS**

Ze suspenze 10<sup>10</sup> bakterií *Listeria monocytogenes* v 1 ml PBS bylo odebráno 300 µl a společně s 0,75 mg SMCC řádně rozmícháno ve 3 ml PBS. Následovala čtyřicetiminutová inkubace při pokojové teplotě a dialýza proti PBS pomocí dialyzační hadice MWCO 3500 přes noc za stálého míchání a teploty 4°C. Koncentrace roztoku byla upravena tak, aby činila 1 miliardu bakterií *Listeria monocytogenes* s navázaným SMCC na 1 ml PBS.

#### **4.1.1.5 *Listeria monocytogenes*-SMCC v 0,2 mM manan-SMCC v PBS**

Ze suspenze 10<sup>10</sup> bakterií *Listeria monocytogenes* v 1 ml PBS bylo odebráno 300 µl a společně s 0,75 mg SMCC řádně rozmícháno ve 3 ml roztoku manan-SMCC v PBS, jehož příprava je popsána v kapitole 4.1.1.2. Roztok byl po dobu čtyřiceti minut inkubován při pokojové teplotě a následně přes noc dialyzován proti PBS pomocí dialyzační hadice MWCO 3500 za stálého míchání a teploty 4°C. Výsledná koncentrace byla upravena na 1 miliardu bakterií s navázaným SMCC na 1 ml roztoku mananu-SMCC v PBS.

#### **4.1.1.6 R848.HCl v PBS**

Z důvodu nedokonalé rozpustnosti R848 ve vodě byl v některých experimentech testován jeho hydrochlorid. Ten jsme získali smícháním 1,5 mg R848 s 4,2  $\mu$ l 3,5% HCl. Koncentrace roztoku byla upravena přidáním PBS.

#### **4.1.1.7 Ostatní experimentální látky**

Další léčiva byla připravována vzájemným smícháním roztoků, jejichž příprava byla popsána v předcházejících kapitolách, nebo smícháním některého z roztoků s chemickými látkami uvedenými v kapitole 4.1.

### **4.2 Experimentální zvířata**

K experimentům byly používány samice myši kmene C57BL/6 dodávané firmou Charles River Laboratories. Na počátku experimentů byly myši 8 týdnů staré a jejich hmotnost se pohybovala v rozmezí 18 – 20 g. Myši byly chovány ve zvěřinci Parazitologického ústavu Biologického centra Akademie věd České republiky v Českých Budějovicích a ve zvěřinci Katedry medicínské biologie Přírodovědecké fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích za standardních podmínek a světelného režimu 12/12 hodin.

### **4.3 Buněčná linie**

Ve všech pokusech byla používána buněčná linie maligního melanomu B16-F10, již jsme obdrželi od paní profesorky Říhové z ÚMG v Praze formou daru. Buňky byly kultivovány v médiu RPMI 1640 ve směsi s 10% fetálního bovinního séra (FCS), 1% glutaminu, 1% antibiotik a 0,1% merkaptetanolu. Ke kultivaci docházelo v termostatu při konstantní teplotě 37°C a v atmosféře nasycené vodními parami s obsahem 5% oxidu uhličitého.



## 4.4 Metodika in vivo experimentů

### 4.4.1 Příprava a transplantace melanomových buněk

Z kultivační nádoby s narostlými buňkami B16-F10 bylo slito médium a následovalo trojnásobné důkladné propláchnutí pomocí sterilního pufrovaného fyziologického roztoku (dále PBS). Dalším krokem byla trypsinizace pomocí 0,5 ml směsi obsahující 0,02% trypsinu a 0,02% EDTA v PBS. Následovala dvouminutová inkubace v termostatu při 37°C, nutná pro uvolnění adheovaných nádorových buněk. Poté bylo přidáno RPMI 1640 s 10% FCS a buňky byly opatrně rozsuspendovány. Posléze došlo k centrifugaci po dobu 10 minut, při 4°C a 150 g. Po centrifugaci byly buňky naředěny v RPMI bez séra tak, aby výsledný objem suspenze činil 2 ml. Buňky byly obarveny přidáním trypanové modři a následovalo jejich počítání v Bürkerově komůrce. Suspenze melanomových buněk byla upravena na koncentraci 4 miliony nádorových buněk na 1 ml RPMI.

Před přípravou nádorových buněk byly myši důkladně oholeny na pravé polovině zad. Každé takto nachystané myši bylo subkutánně transplantováno 400 000 nádorových buněk v 0,1 ml RPMI bez séra.

### 4.4.2 Určení velikosti nádorů a aplikace terapeutik

Po transplantaci melanomových buněk byly myši 12 dní ponechány v klidu, aby jejich nádory narostly do dostatečné velikosti. Následně byly myši randomizovány do skupin a po změření velikosti nádorů byla zahájena terapie.

Měření velikosti nádorů se provádělo vždy jednou za dva dny, tedy v den 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 a 14, a to podle Inabovy metody (Inaba a spol. 1986) pomocí kaliperu. Jelikož je maligní melanom zploštělý rotační elipsoid, bylo nutno změřit vždy největší a nejmenší rozměr nádoru. Výsledný objem nádorů byl vypočten ze vztahu  $V = \frac{\pi}{6} \times A \times B^2$ , kde A odpovídalo největšímu a B nejmenšímu rozměru jednotlivých nádorů.

Léčiva byla podávána intratumorálně ve dvou třídních pulzech, konkrétně tedy v den 0, 1, 2 a 8, 9, 10. Každé myši bylo aplikováno po 50  $\mu$ l terapeutika. V případě, že byla v tentýž den měřena velikost nádorů i podávána léčiva, bylo nutno vždy nejprve změřit velikost nádoru, poté až aplikovat terapeutickou látku.

Výjimkou byly pokusy 4.7.5 a 4.7.6, ve kterých jsme nádory měřili obden, ode dne 0 až do 30. dne a léčiva byla podávána ve čtyřech třídních pulzech, přesněji v den 0, 1, 2, 8, 9, 10, 16, 17, 18 a 24, 25, 26.

#### **4.4.3 Počítání metastáz**

Jelikož maligní melanom metastazuje do plic, metastatická ložiska byla počítána právě tam. Po vyjmutí byly plíce zakonzervovány v 4% roztoku formaldehydu a po určité době následovalo počítání metastáz pod binolupou. Tam se metastázy jeví jako sytě černé tečky různé velikosti, které je nutno odlišit od hematomů, charakteristických hnědým zabarvením.

#### **4.4.4 Určení průměrné redukce nádorového růstu**

Průměrná redukce nádorového růstu nám vyjadřuje, kolika procentní redukce nádorového růstu bylo dosaženo podáním daného terapeutika v porovnání s kontrolní skupinou. Je dána podílem rozdílu průměrného objemu nádorů pro kontrolní skupinu a průměrného objemu nádorů pro léčenou skupinu vynásobeného 100, ku průměrnému objemu nádorů pro kontrolní skupinu (Looney a kol. 1980).

Redukce nádorového růstu byla počítána pro dny 4, 6, 8, 10, 12 a 14 a ze všech hodnot byl vypočítán průměr, který vyjadřuje celkovou průměrnou redukci nádorového růstu pro danou látku v porovnání s kontrolou.

### **4.5 Metodika in vitro experimentů**

#### **4.5.1 Příprava nádorových buněk a jejich inkubace s ligandem**

Nádorové buňky byly připraveny způsobem uvedeným v kapitole 4.4.1 a byly naředěny v RPMI 1640 s 10% nedeaktivovaného FCS tak, aby koncentrace výsledné suspenze činila 1, respektive 2 miliony nádorových buněk na 1 ml suspenze.

Do jamek v destičce bylo napipetováno po 100  $\mu$ l suspenze nádorových buněk a následovalo přidávání 100  $\mu$ l ligandů. Těmi byl 0,04 mM manan-BAM a 0,04 mM volný manan. Do skupin, kam nebyl přidáván ligand, bylo dodáno 100  $\mu$ l RPMI 1640 s 10% nedeaktivovaného FCS v PBS v poměru 4:1.

Po přidání ligandů byla destička inkubována v termostatu s 5% CO<sub>2</sub>, při 37°C a po dobu 30 minut, následně stočena při 4°C a 424 g po dobu 2 minut a supernatanty byly odstraněny odcáknutím. Všechny jamky byly promyty 200  $\mu$ l RPMI 1640 s 10% nedeaktivovaného FCS. Následovalo další stočení destičky za stejných podmínek a odstranění supernatantů.

#### 4.5.2 Izolace neutrofilů a jejich priming

Myš byla usmrčena zlomením vazů. Ve sterilním boxu byla její srst dezinfikována etanolem, kůže odstřižena kolem dokola zadních končetin a stažena. Nohy byly odstřiženy co nejbližší k pánvi, aby nedošlo k poškození stehenních kostí, a opláchnuty ve sterilním PBS.

Svalovina a šlachy byly odstraněny s opatrností, aby nedošlo k poškození kloubních hlavic. Kostí byly opláchnuty v izopropanolu a vloženy do Petriho misky s RPMI 1640 s 10% FCS.

Kloubní hlavice byly odstřiženy a kosti propláchnuty RPMI 1640 s 10% FCS pomocí stříkačky s jehlou, čímž byla do další Petriho misky s RPMI 1640 s 10% FCS vyplavena kostní dřevina. Ta byla následně důkladně, ale jemně rozsuspendována a přefiltrována přes sítko s póry o velikosti 70  $\mu\text{m}$ . Buňky byly počítány v Bürkerově komůrce a následně centrifugovány při 150 g po dobu 10 minut.

K buněčnému peletu bylo přidáno médium MACS pro magnetickou separaci, obsahující 146,4 ml PBS, 3 ml FCS a 600  $\mu\text{l}$  2 mM EDTA, v množství 200  $\mu\text{l}$  média na 50 milionů buněk. Směs byla řádně rozsuspendována a následovalo přidání 50  $\mu\text{l}$  primární protilátky na 50 milionů buněk a promíchání. Následovala desetiminutová inkubace při 4°C. Směs byla promyta 5 – 10 ml média pro magnetickou separaci na 50 milionů buněk a centrifugována při 150 g po dobu 10 minut. Supernatant byl kompletně odsát a pelet byl rozsuspendován v 400  $\mu\text{l}$  média pro magnetickou separaci na 50 milionů buněk. Následovalo přidání 100  $\mu\text{l}$  sekundární protilátky na 50 milionů buněk, promíchání a patnáctiminutová inkubace při 4°C. Směs byla opakovaně promyta 5 – 10 ml média pro magnetickou separaci na 50 milionů buněk a centrifugována při 150 g po dobu 10 minut a následovalo odsátí supernatantu. Buňky byly rozsuspendovány v 1 ml média a byly připraveny pro magnetickou separaci.

Do separátoru byla umístěna kolonka a na ni byl nasazen preseparační filtr. Následovalo namočení filtru i kolonky 3 ml média pro magnetickou separaci, odkapání média a magnetická separace suspenze obsahující neutrofilů. Filtr s kolonkou byl devětkrát proplachován 1 ml média a filtrát byl přidán k separovaným neutrofilům. Buňky byly počítány, stočeny a naředěny v RPMI 1640 s 10% nedeaktivovaného FCS na požadovanou koncentraci, která činila 2,5, respektive 5 milionů neutrofilů na 1 ml suspenze.

V době, kdy se nádorové buňky inkubovaly s ligandy, byly neutrofilů primovány přidáním faktoru stimulujícího vznik kolonií granulocytů a makrofágů

(dále GM-CSF) na výslednou koncentraci 12 ng/ml, TNF na výslednou koncentraci 2,5 ng/ml a laminarinu na výslednou 2 mikromolární koncentraci. Následovala inkubace v termostatu s 5% CO<sub>2</sub>, při 37°C a po dobu 20 minut.

500 000, respektive 1 000 000 primovaných neutrofilů v 200 µl RPMI 1640 s 10% nedeaktivovaného FCS bylo přidáno do příslušných jamek destičky. Do skupin, kam neutrofilů nepatřily, bylo napipetováno 200 µl RPMI s 10% nedeaktivovaným FCS.

#### **4.5.3 Inhibice oxidativního vzplanutí**

4 mM epicatechin, inhibitor oxidativního vzplanutí, byl přidáván do příslušných jamek v množství 5 µl na jamku pro pokus 4.8.1 a 4.8.2 a v množství 2,5, respektive 10 µl pro experiment 5.8.3. Jeho výsledná koncentrace byla tedy 0,1, respektive 0,05 a 0,2 milimolární. Do jamek, jež epicatechin neobsahovaly, bylo napipetováno odpovídající množství PBS.

Obsah všech jamek byl důkladně rozsuspendován pipetou a destička byla ponechána v termostatu s 5% CO<sub>2</sub>, při 37°C a po dobu 2 hodin.

#### **4.5.4 Příprava vzorků pro počítání buněk**

Po inkubaci byly buňky řádně, ale jemně rozsuspendovány pipetou, tak aby netvořily agregáty. Celý obsah jamky (200 µl) byl napipetován do mikrozkušavky, k němu bylo přidáno stejné množství trypanové modři a následovalo počítání nádorových buněk v Bürkerově komůrce.

### **4.6 Statistické vyhodnocení**

K vyhodnocení in vivo experimentů byly použity programy MS Excel a STATISTICA 12. V programu MS Excel byly vytvořeny grafy a byl vyhodnocen počet plicních metastáz. Vyhodnocení statistické významnosti bylo provedeno pomocí ANOVY pro opakovaná pozorování s Tukey či Unequal post hoc testem v programu STATISTICA 12.

Analýza přežívání byla provedena pomocí Kaplan-Meierova testu v programu STATISTICA 12.

## 4.7 Experimenty in vivo

### 4.7.1 Pokus č. 1 - Testování vlivu f-MLFG<sub>5</sub>K<sub>8</sub>(K(STE))(K(STE))-NH<sub>2</sub> a jeho případné synergie s LPS nebo LTA na terapii maligního melanomu

K tomuto pokusu bylo použito 28 samic myšního kmene C57BL/6. Dvanáctý den po transplantaci buněk melanomu B16-F10 byly myši randomizovány do šesti skupin po čtyřech (skupiny B a C), respektive pěti jedincích (skupiny A, D, E a F) podle podávaných terapeutických roztoků dle následujícího schématu:

- A) 0,5 mM f-MLFG<sub>5</sub>K<sub>8</sub>(K(STE))(K(STE))-NH<sub>2</sub> v PBS
- B) LTA v PBS (c = 10 mg/ml)
- C) LPS v PBS (c = 0,5 mg/ml)
- D) 0,5 mM f-MLFG<sub>5</sub>K<sub>8</sub>(K(STE))(K(STE))-NH<sub>2</sub> v PBS obsahujícím LTA (c = 10 mg/ml PBS)
- E) 0,5 mM f-MLFG<sub>5</sub>K<sub>8</sub>(K(STE))(K(STE))-NH<sub>2</sub> v PBS obsahujícím LPS (c = 0,5 mg/ml PBS)
- F) PBS

Následovalo zahájení terapie. Ve dnech 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 a 14 byly vždy měřeny velikosti nádorů, aplikace terapeutických roztoků byla prováděna ve dvou třídních pulzech, konkrétně v den 0, 1, 2, 8, 9 a 10. Každé myši bylo pokaždé intratumorálně aplikováno 50 µl příslušného roztoku.

Čtrnáctý den od zahájení terapie byly myši po změření velikosti nádorů usmrceny, byly jim vyjmuty plíce a spočítány metastázy.

### 4.7.2 Pokus č. 2 – Předběžný screening vlivu R848 (baze) jako náhrady LPS na imunoterapii maligního melanomu a průkaz případné synergie R848 s mananem-BAM

Pro tento pokus bylo použito 25 samic myšního kmene C57BL/6. Po transplantaci buněk melanomu B16-F10 byly myši ponechány dvanáct dní v klidu. Následovala jejich randomizace do šesti skupin po čtyřech (skupiny A – E), respektive pěti jedincích (skupina F). Schéma rozdělení do skupin a podávaná terapeutika byla následující:

- A) 0,2 mM manan-BAM v PBS
- B) LPS v PBS (c = 0,5 mg/ml)
- C) 0,2 mM manan-BAM v PBS obsahujícím LPS (c = 0,5 mg/ml PBS)

- D) R848 v PBS (c = 0,5 mg/ml)
- E) 0,2 mM manan-BAM v PBS obsahujícím R848 (c = 0,5 mg/ml PBS)
- F) PBS

Poté byla započata terapie. Velikosti nádorů byly měřeny obden, ve dnech 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 a 14. Terapeutika byla podávána intratumorálně po 50  $\mu$ l na myš ve dvou třídních pulzech, tedy v den 0, 1, 2 a 8, 9, 10.

Čtrnáctý den od zahájení terapie byly naposledy změřeny nádory a bylo zahájeno sledování doby přežití jednotlivých myší.

#### **4.7.3 Pokus č. 3 – Použitelnost R848 (baze) v imunoterapii melanomu B16-F10 a jeho synergie s mananem-BAM**

Pro účely tohoto pokusu bylo použito 24 myší kmene C57BL/6 samičího pohlaví. Dvanáctý den po transplantaci nádorových buněk byly myši rozděleny do čtyř skupin po šesti jedincích. Schéma rozdělení do skupin na základě aplikovaných terapeutik bylo následující:

- A) 0,2 mM manan-BAM v PBS
- B) R848 v PBS (c = 0,5 mg/ml)
- C) 0,2 mM manan-BAM v PBS obsahujícím R848 (c = 0,5 mg/ml PBS)
- D) PBS

Poté byla zahájena terapie. Ve dnech 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 a 14 byly měřeny velikosti nádorů. Terapeutika byla podávána intratumorálně po 50  $\mu$ l na myš. Jejich aplikace byla prováděna ve dvou třídních pulzech, konkrétně v den 0, 1, 2, 8, 9 a 10.

Po posledním měření velikosti nádorů byly myši dál pravidelně sledovány a byla zaznamenávána data jejich úhynů.

#### **4.7.4 Pokus č. 4 – Studium možnosti použití kovalentně kotvených bakterií *Listeria monocytogenes* pro léčbu melanomu B16-F10 a sledování jejich případné synergie s mananem-SMCC**

K tomuto experimentu bylo použito 30 samic myšího kmene C57BL/6. Dvanáctý den po transplantaci nádorových buněk byly myši randomizovány do pěti skupin po šesti jedincích. Skupiny a jim podávané terapeutické roztoky byly tyto:

- A) 1. aplikace – PBS
- 2. aplikace – *Listeria monocytogenes* v PBS (c = 1 miliarda/ml)
- B) 1. aplikace – 50 mM TCEP v PBS

- 2. aplikace – *Listeria monocytogenes*-SMCC v PBS (c = 1 miliarda bakterií/ml)
- C) 1. aplikace – 50 mM TCEP v PBS
  - 2. aplikace – 0,2 mM manan-SMCC v PBS
- D) 1. aplikace – 50 mM TCEP v PBS
  - 2. aplikace – *Listeria monocytogenes*-SMCC v 0,2 mM manan-SMCC v PBS (c = 1 miliarda bakterií/ml směsi)
- E) 1. aplikace – PBS
  - 2. aplikace – PBS

Po rozdělení myší do skupin byla zahájena terapie. Velikosti nádorů byly měřeny obden – ve dny 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 a 14. Aplikace léčiv probíhala ve dvou třídenních pulzech, tedy ve dny 0, 1, 2 a 8, 9, 10. Nejprve byl vždy intratumorálně aplikován TCEP nebo PBS v množství 50 µl na myš. Po uplynutí 1 hodiny následovala druhá intratumorální aplikace 50 µl terapeutik na myš podle výše uvedeného schématu.

Po posledním měření velikosti nádorů byly myši dál pravidelně sledovány a pro analýzu přežívání byla zaznamenávána data jejich úhynů.

#### **4.7.5 Pokus č. 5 – Studium vlivu přidání bakterií *Listeria monocytogenes* ke směsi mananu-SMCC a R848.HCl na účinnost terapie maligního melanomu**

Pro tento experiment bylo použito 24 samic myšího kmene C57BL/6. Po dobu dvanácti dnů od transplantace nádorových buněk byly myši ponechány v klidu, následovala jejich randomizace do čtyř skupin po šesti jedincích. Jednotlivým skupinám byla podávána terapeutika dle následujícího schématu:

- A) 1. aplikace – 50 mM TCEP v PBS
  - 2. aplikace – *Listeria monocytogenes*-SMCC v 0,2 mM manan-SMCC v PBS (c = 1 miliarda bakterií/ml směsi)
- B) 1. aplikace – 50 mM TCEP v PBS
  - 2. aplikace – 0,2 mM manan-SMCC v PBS + R848.HCl v PBS (c = 0,5 mg/ml PBS)
- C) 1. aplikace – 50 mM TCEP v PBS
  - 2. aplikace – *Listeria monocytogenes*-SMCC v 0,2 mM manan-SMCC v PBS (c = 1 miliarda bakterií/ml směsi) + R848.HCl v PBS (c = 0,5 mg/ml PBS)
- D) 1. aplikace – 50 mM TCEP v PBS
  - 2. aplikace – PBS

Po rozdělení myši do skupin byla započata terapie. Měření velikosti nádorů probíhalo obden, konkrétně ve dny 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28 a 30. Aplikace léčiv probíhala ve čtyřech třídních pulzech, tedy ve dny 0, 1, 2, 8, 9, 10, 16, 17, 18 a 24, 25, 26. Nejprve bylo vždy intratumorálně aplikováno 50  $\mu$ l TCEP na myš. Po uplynutí 1 hodiny následovala druhá intratumorální aplikace 50  $\mu$ l terapeutik na myš podle výše uvedeného schématu.

Po ukončení experimentu byly myši dále sledovány a kvůli analýze přežití byla zaznamenávána data jejich úhynů. Přeživším myším byly 120. den od zahájení terapie opětovně transplantovány nádorové buňky a myši byly dále monitorovány.

#### **4.7.6 Pokus č. 6 – Studium vlivu přidání bakterií *Listeria monocytogenes* ke směsi látek manan-SMCC, R848.HCl a poly I:C na účinnost imunoterapie maligního melanomu**

K provedení tohoto experimentu bylo použito 24 samic myšího kmene C57BL/6. Dvanáctý den od transplantace nádorových buněk byly myši randomizovány do čtyř skupin po šesti jedincích. Jednotlivým skupinám byla podávána terapeutika dle následujícího schématu:

- A) 1. aplikace – 50 mM TCEP v PBS  
2. aplikace – *Listeria monocytogenes*-SMCC v 0,2 mM manan-SMCC v PBS (c = 1 miliarda bakterií/ml směsi)
- B) 1. aplikace – 50 mM TCEP v PBS  
2. aplikace – 0,2 mM manan-SMCC v PBS + R848.HCl v PBS (c = 0,5 mg/ml PBS) + poly I:C v PBS (c = 0,5 mg/ml PBS)
- C) 1. aplikace – 50 mM TCEP v PBS  
2. aplikace – *Listeria monocytogenes*-SMCC v 0,2 mM manan-SMCC v PBS (c = 1 miliarda bakterií/ml směsi) + R848.HCl v PBS (c = 0,5 mg/ml PBS) + poly I:C v PBS (c = 0,5 mg/ml PBS)
- D) 1. aplikace – 50 mM TCEP v PBS  
2. aplikace – PBS

Po rozdělení myši do skupin byla započata terapie. Měření velikosti nádorů probíhalo obden, konkrétně ve dny 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28 a 30. Léčivé směsi byly podávány ve čtyřech třídních pulzech, konkrétně ve dny 0, 1, 2, 8, 9, 10, 16, 17, 18 a 24, 25, 26. Nejprve bylo vždy intratumorálně aplikováno 50  $\mu$ l TCEP na myš. Po



uplynutí 1 hodiny následovala druhá intratumorální aplikace 50 µl terapeutik na myš podle výše uvedeného schématu.

Po ukončení experimentu byly myši dále sledovány a kvůli analýze přežití byla zaznamenávána data jejich úhynů. Přeživším myším byly 120. den od zahájení terapie opětovně transplantovány nádorové buňky a myši byly dále monitorovány.

#### **4.7.7 Pokus č. 7 – Ovlivnění protinádorového účinku směsi mananu-BAM s R848.HCl zablokováním oxidativního vzplanutí neutrofilů pomocí epicatechinu**

Pro tento pokus bylo použito 30 samic myšího kmene C57BL/6. Dvanáct dní po transplantaci buněk melanomu B16-F10 byly myši randomizovány do pěti skupin po šesti jedincích. Schéma dle podávaných terapeutik vypadalo následovně:

- A) R848.HCl v PBS (c = 0,5 mg/ml)
- B) 0,2 mM manan-BAM v PBS
- C) 0,2 mM manan-BAM v PBS obsahujícím R848.HCl (c = 0,5 mg/ml)
- D) 0,2 mM manan-BAM v PBS obsahujícím R848.HCl (c = 0,5 mg/ml) a 4 mM epicatechin v PBS
- E) PBS

Po rozdělení myší do skupin byla započata terapie. Velikosti nádorů byly měřeny obden, tedy ve dnech 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 a 14. Terapeutika byla podávána intratumorálně po 50 µl na myš ve dvou třídních pulzech, tedy v den 0, 1, 2 a 8, 9, 10. Čtrnáctý den od zahájení terapie byly myši utraceny a byla provedena analýza výskytu metastáz v plicích.

## **4.8 Experimenty in vitro**

### **4.8.1 Pokus č. 1 – Vliv epicatechinu, inhibitoru oxidativního vzplanutí, na cytotoxický účinek primovaných neutrofilů na buňky B16-F10 s ukotveným mananem**

Nejprve byly vyizolovány neutrofilů ze stehenních a holenních kostí myší C57BL/6 a jejich koncentrace byla upravena na 2,5 milionu buněk na 1 mililitr RPMI 1640 s 10% nedeaktivovaného FCS. Neutrofilů byly primovány způsobem uvedeným v kapitole 4.5.2. Priming neutrofilů byl proveden během inkubace nádorových buněk s ligandy. Suspenze byla do doby použití uchovávána na ledu.

Nádorové buňky byly sklizeny a jejich koncentrace byla upravena na 1 milion buněk na 1 mililitr RPMI 1640 s 10% nedeaktivovaného FCS. Nádorové buňky byly dále po 100 µl napipetovány do 96 jamkové destičky a bylo přidáno 100 µl roztoků ligandů v témže médiu, aby byla vytvořena 0,02 mM koncentrace mananu-BAM. Volný manan byl přidán na výslednou 0,02 mM koncentraci. V kontrolní skupině žádný ligand přidáván nebyl. Následovala třicetiminutová inkubace.

Primované neutrofilie byly po 200 µl přidány do příslušných jamek podle následujícího schématu (triplety):

B16-F10

B16-F10 + manan-BAM

B16-F10 + primované neutrofilie

B16-F10 + manan-BAM + primované neutrofilie

B16-F10 + volný manan + primované neutrofilie

B16-F10 + 0,1 mM epicatechin v PBS

B16-F10 + manan-BAM + primované neutrofilie + 0,1 mM epicatechin v PBS

Ke skupinám bez neutrofilů bylo přidáno po 200 µl RPMI 1640 s 10% nedeaktivovaného FCS.

Poté byl přidán epicatechin na výslednou 0,1 mM koncentraci. Do jamek bez inhibitoru bylo přidáno po 5 µl PBS.

Po dvouhodinové inkubaci následovalo počítání nádorových buněk.

#### **4.8.2 Pokus č. 2 – Vliv epicatechinu na cytotoxické působení primovaných neutrofilů na nádorové buňky s ukotveným mananem při použití dvojnásobného množství neutrofilů a nádorových buněk**

Nejprve byly vyzolovány neutrofilie ze stehenních a holenních kostí myši C57BL/6 a jejich koncentrace byla upravena na 5 milionu buněk na 1 mililitr RPMI 1640 s 10% nedeaktivovaného FCS. Neutrofilie byly primovány způsobem uvedeným v kapitole 4.5.2. Priming neutrofilů byl proveden během inkubace nádorových buněk s ligandy. Suspenze byla do doby použití uchovávána na ledu.

Nádorové buňky byly sklizeny a jejich koncentrace byla upravena na 2 miliony buněk na 1 mililitr RPMI 1640 s 10% nedeaktivovaného FCS. Nádorové buňky byly dále po 100 µl napipetovány do 96 jamkové destičky a bylo přidáno 100 µl roztoků ligandů v témže médiu, aby byla vytvořena 0,02 mM koncentrace mananu-BAM. Volný manan byl přidán na

výslednou 0,02 mM koncentraci. V kontrolní skupině žádný ligand přidáván nebyl. Následovala třicetiminutová inkubace.

Primované neutrofilily byly po 200  $\mu$ l přidány do příslušných jamek podle následujícího schématu (triplety):

B16-F10

B16-F10 + manan-BAM

B16-F10 + primované neutrofilily

B16-F10 + manan-BAM + primované neutrofilily

B16-F10 + volný manan + primované neutrofilily

B16-F10 + 0,1 mM epicatechin v PBS

B16-F10 + manan-BAM + primované neutrofilily + 0,1 mM epicatechin v PBS

Ke skupinám bez neutrofilů bylo přidáno po 200  $\mu$ l RPMI 1640 s 10% nedeaktivovaného FCS.

Poté byl přidán epicatechin na výslednou 0,1 mM koncentraci. Do jamek bez inhibitoru bylo přidáno po 5  $\mu$ l PBS.

Po dvouhodinové inkubaci následovalo počítání nádorových buněk.

#### **4.8.3 Pokus č. 3 – Studium vlivu různých koncentrací epicatechinu na cytotoxické působení primovaných neutrofilů na nádorové buňky s ukotveným mananem.**

Nejprve byly vyzolovány neutrofilily ze stehenních a holenních kostí myší C57BL/6 a jejich koncentrace byla upravena na 2,5 milionu buněk na 1 mililitr RPMI 1640 s 10% nedeaktivovaného FCS. Neutrofilily byly primovány způsobem uvedeným v kapitole 4.5.2. Priming neutrofilů byl proveden během inkubace nádorových buněk s ligandy. Suspenze byla do doby použití uchovávána na ledu.

Nádorové buňky byly sklizeny a jejich koncentrace byla upravena na 1 milion buněk na 1 mililitr RPMI 1640 s 10% nedeaktivovaného FCS. Nádorové buňky byly dále po 100  $\mu$ l napipetovány do 96 jamkové destičky a bylo přidáno 100  $\mu$ l roztoků ligandů v témže médiu, aby byla vytvořena 0,02 mM koncentrace mananu-BAM. V kontrolní skupině žádný ligand přidáván nebyl. Následovala třicetiminutová inkubace.

Primované neutrofilily byly po 200  $\mu$ l přidány do příslušných jamek podle následujícího schématu (triplety):

B16-F10

B16-F10 + manan-BAM

B16-F10 + primované neutrofilly

B16-F10 + manan-BAM + primované neutrofilly

B16-F10 + 0,05 mM epicatechin v PBS

B16-F10 + manan-BAM + primované neutrofilly + 0,05 mM epicatechin v PBS

B16-F10 + 0,2 mM epicatechin v PBS

B16-F10 + manan-BAM + primované neutrofilly + 0,2 mM epicatechin v PBS

Ke skupinám bez neutrofilů bylo přidáno po 200  $\mu$ l RPMI 1640 s 10% nedeaktivovaného FCS.

Poté byl přidán epicatechin na výslednou 0,05, respektive 0,2 mM koncentraci. Do jamek bez inhibitoru bylo přidáno po odpovídající množství PBS.

Po dvouhodinové inkubaci následovalo počítání nádorových buněk.

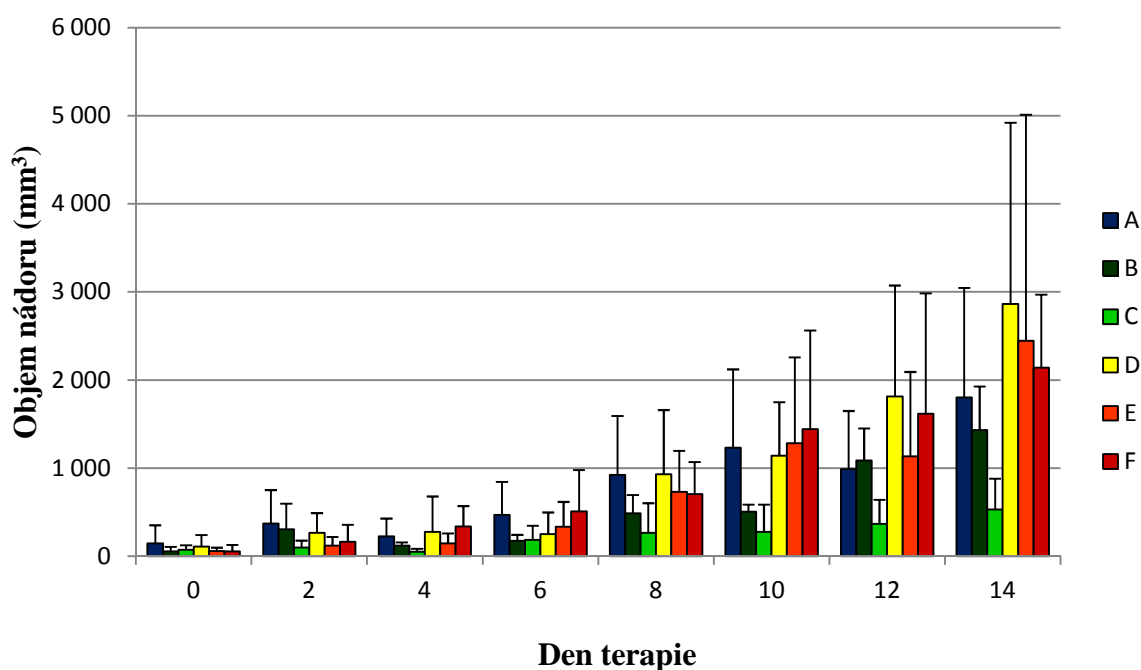
## 5. Výsledky

### 5.1 Experimenty in vivo

#### 5.1.1 Pokus č. 1 - Testování vlivu f-MLFG<sub>5</sub>K<sub>8</sub>(K(STE))(K(STE))-NH<sub>2</sub> a jeho případné synergie s LPS nebo LTA na terapii maligního melanomu

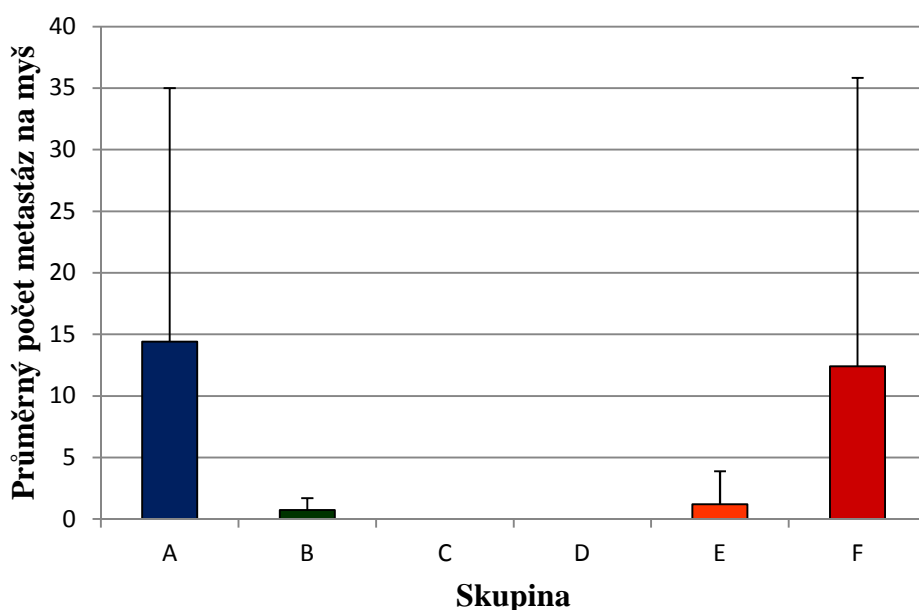
Účelem tohoto pokusu bylo otestovat pevnější kotvení peptidu do membrány nádorových buněk dvojitou kotvou – dvěma molekulami kyseliny stearové. Dalším cílem bylo vyzkoušet, zda bude LTA vhodnou náhradou za LPS.

Obrázek 5 znázorňuje vliv terapie založené na použití peptidu f-MLFG<sub>5</sub>K<sub>8</sub>(K(STE))(K(STE))-NH<sub>2</sub> (skupina A) na průměrné velikosti nádorů jednotlivých skupin. Vyplývá z něj, že peptid f-MLFG<sub>5</sub>K<sub>8</sub>(K(STE))(K(STE))-NH<sub>2</sub> nemá výrazný protinádorový účinek a nepůsobí synergicky s LTA (skupina D) ani LPS (skupina E).



Obr. 5: Vliv terapie založené na použití peptidu f-MLFG<sub>5</sub>K<sub>8</sub>(K(STE))(K(STE))-NH<sub>2</sub> a jeho kombinací s LTA a LPS na průměrnou velikost nádorů jednotlivých skupin. **A** – 0,5 mM f-MLFG<sub>5</sub>K<sub>8</sub>(K(STE))(K(STE))-NH<sub>2</sub> v PBS, **B** – LTA v PBS (c = 10 mg/ml), **C** – LPS v PBS (c = 0,5 mg/ml), **D** – 0,5 mM f-MLFG<sub>5</sub>K<sub>8</sub>(K(STE))(K(STE))-NH<sub>2</sub> v PBS obsahujícím LTA (c = 10 mg/ml PBS), **E** – 0,5 mM f-MLFG<sub>5</sub>K<sub>8</sub>(K(STE))(K(STE))-NH<sub>2</sub> v PBS obsahujícím LPS (c = 0,5 mg/ml PBS), **F** – PBS.

Obrázek 6 vyjadřuje intenzitu metastazování vyjádřenou průměrným počtem metastáz na myš v jednotlivých skupinách. Vyplývá z něj, že myši ze skupiny A, které byly léčeny podáním peptidu f-MLFG<sub>5</sub>K<sub>8</sub>(K(STE))(K(STE))-NH<sub>2</sub>, měly více než 14 metastáz na myš, tedy i více než myši kontrolní s průměrnými 12 metastázemi na myš (skupina F). Žádné metastázy nebyly pozorovány u skupin, jimž byl podáván LPS (skupina C) a f-MLFG<sub>5</sub>K<sub>8</sub>(K(STE))(K(STE))-NH<sub>2</sub> v kombinaci s LTA (skupina D). Nízká intenzita metastazování byla pozorována i u skupin léčených samotnou LTA (skupina B) a f-MLFG<sub>5</sub>K<sub>8</sub>(K(STE))(K(STE))-NH<sub>2</sub> v kombinaci s LPS (skupina E).

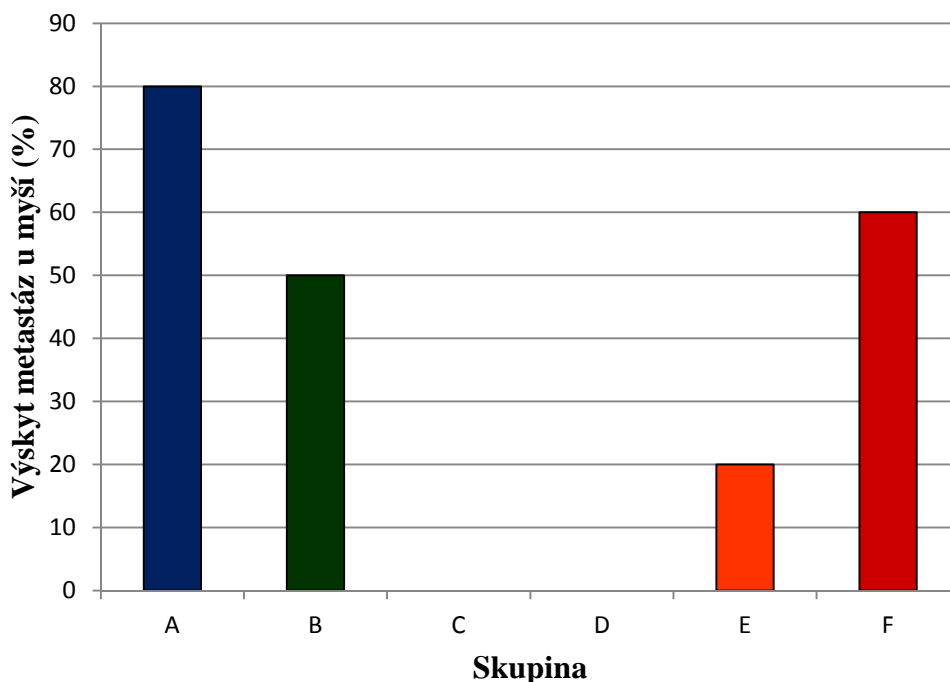


**Obr. 6: Vliv léčby pomocí peptidu f-MLFG<sub>5</sub>K<sub>8</sub>(K(STE))(K(STE))-NH<sub>2</sub> a jeho kombinace s LTA nebo LPS na intenzitu metastazování v jednotlivých skupinách.**

**A** – 0,5 mM f-MLFG<sub>5</sub>K<sub>8</sub>(K(STE))(K(STE))-NH<sub>2</sub> v PBS, **B** – LTA v PBS (c = 10 mg/ml), **C** – LPS v PBS (c = 0,5 mg/ml), **D** – 0,5 mM f-MLFG<sub>5</sub>K<sub>8</sub>(K(STE))(K(STE))-NH<sub>2</sub> v PBS obsahujícím LTA (c = 10 mg/ml PBS), **E** – 0,5 mM f-MLFG<sub>5</sub>K<sub>8</sub>(K(STE))(K(STE))-NH<sub>2</sub> v PBS obsahujícím LPS (c = 0,5 mg/ml PBS), **F** – PBS.

Obrázek 7 znázorňuje prevalenci metastáz u myší v jednotlivých skupinách. Plyne z něho, že metastázy se vyskytovaly u 80% myší, jimž byl podáván f-MLFG<sub>5</sub>K<sub>8</sub>(K(STE))(K(STE))-NH<sub>2</sub> (skupina A). Výskyt metastáz v této skupině byl o 20% větší než výskyt metastáz u myší kontrolních (skupina F). Ve skupinách, jimž byl podáván LPS, respektive f-MLFG<sub>5</sub>K<sub>8</sub>(K(STE))(K(STE))-NH<sub>2</sub> s LTA (C a D), nebyly nalezeny metastázy žádné. Myši, jimž byla podávána samotná LTA (skupina B), měly metastázy v

50% případů a u myší léčených kombinací f-MLFG<sub>5</sub>K<sub>8</sub>(K(STE))(K(STE))-NH<sub>2</sub> s LPS byly metastázy nalezeny v 20% případů.



Obr. 7: Prevalence metastáz u myší v jednotlivých skupinách.

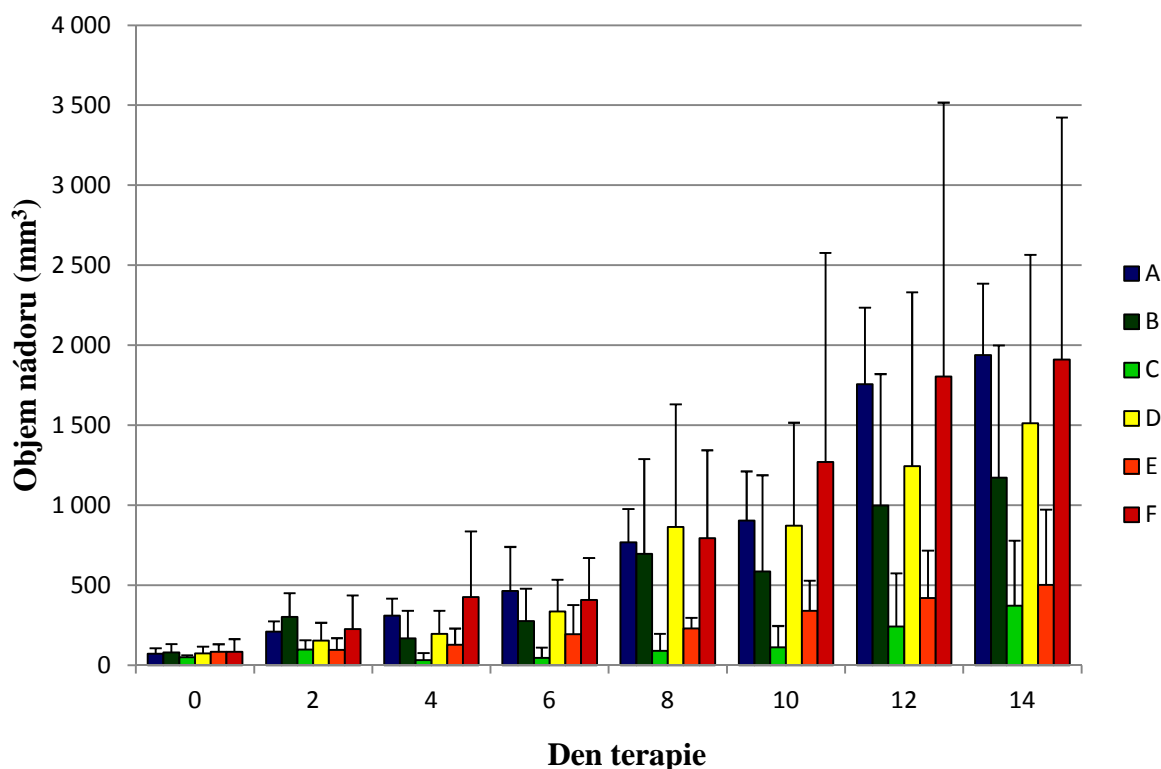
**A** – 0,5 mM f-MLFG<sub>5</sub>K<sub>8</sub>(K(STE))(K(STE))-NH<sub>2</sub> v PBS, **B** – LTA v PBS (c = 10 mg/ml), **C** – LPS v PBS (c = 0,5 mg/ml), **D** – 0,5 mM f-MLFG<sub>5</sub>K<sub>8</sub>(K(STE))(K(STE))-NH<sub>2</sub> v PBS obsahujícím LTA (c = 10 mg/ml PBS), **E** – 0,5 mM f-MLFG<sub>5</sub>K<sub>8</sub>(K(STE))(K(STE))-NH<sub>2</sub> v PBS obsahujícím LPS (c = 0,5 mg/ml PBS), **F** – PBS.

### 5.1.2 Pokus č. 2 – Předběžný screening vlivu R848 (baze) jako náhrady LPS na imunoterapii maligního melanomu a průkaz případné synergie R848 s mananem-BAM

Cílem druhého experimentu bylo získání odpovědi na otázku, zda by mohl R848 být použit v nádorové imunoterapii jako vhodná náhrada LPS. Dále bylo zjišťováno, jaký vliv bude mít na nádorový růst kombinace R848 s mananem-BAM.

Na Obrázku 8 je znázorněn vliv samotného R848 (skupina D) a jeho kombinace s mananem-BAM (skupina E) na terapii maligního melanomu. R848 samotný (skupina D) redukuje nádorový růst nepříliš výrazně, jen o 24,3%, avšak v kombinaci s mananem-BAM (skupina E) bylo dosaženo průměrné redukce nádorového růstu rovnající se 69,5%. Z porovnání tohoto výsledku s 88,0% redukcí nádorového růstu způsobenou mananem-BAM

v kombinaci s LPS vyplývá, že R848 by mohl být dále testován jako právoplatná náhrada LPS.

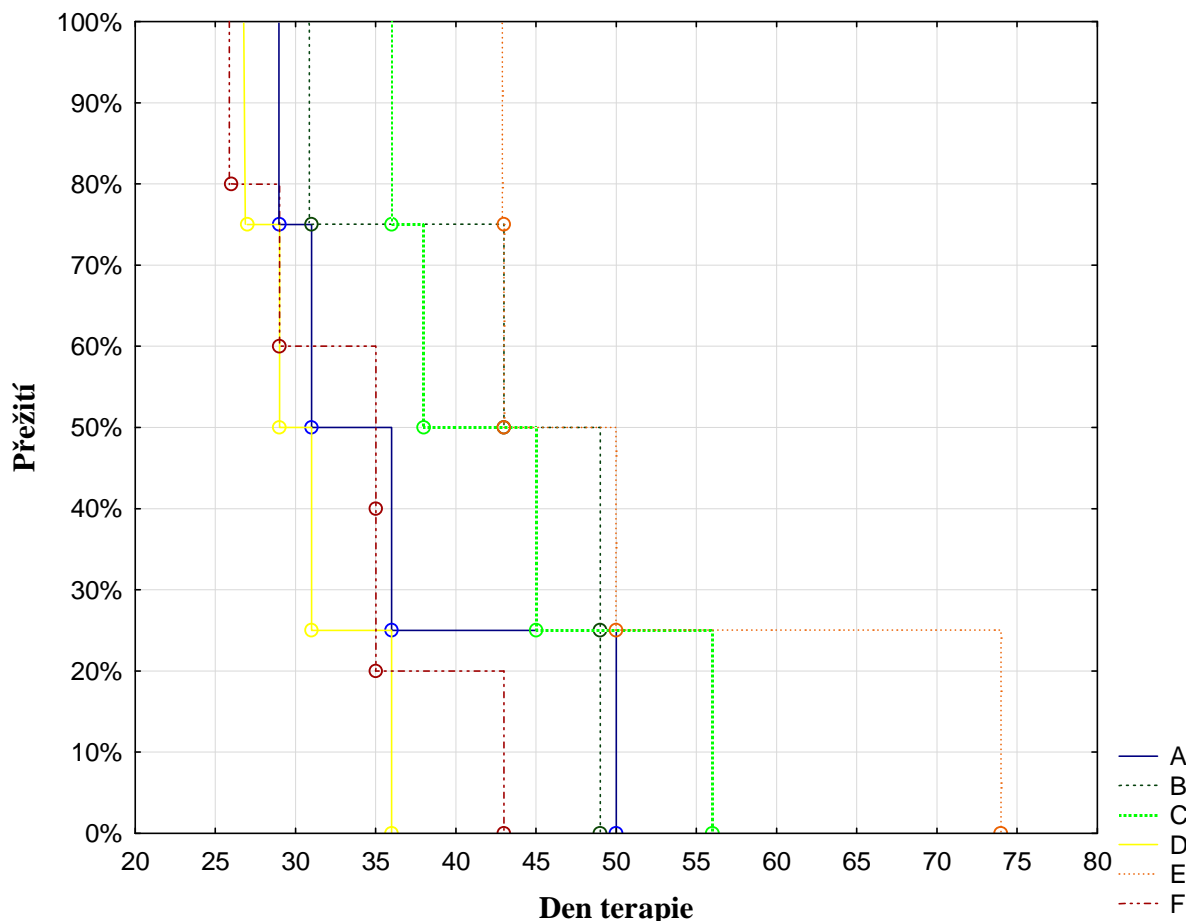


Obr. 8: Vliv R848 a jeho kombinace s mananem-BAM na velikost nádorů v jednotlivých skupinách při terapii maligního melanomu.

**A** – 0,2 mM manan-BAM v PBS, **B** – LPS v PBS ( $c = 0,5$  mg/ml), **C** – 0,2 mM manan-BAM v PBS obsahujícím LPS ( $c = 0,5$  mg/ml PBS), **D** – R848 v PBS ( $c = 0,5$  mg/ml), **E** – 0,2 mM manan-BAM v PBS obsahujícím R848 ( $c = 0,5$  mg/ml PBS), **F** – PBS.

Obrázek 9 vypovídá o době přežívání myši v jednotlivých skupinách. Zatímco myši, jimž byl podáván samotný R848 (skupina D) žily v průměru 30,8 dne od začátku terapie, myši léčené kombinací R848 s mananem-BAM (skupina E) přežily průměrně 52,5 dne. V porovnání s myši kontrolními (skupina F), které žily v průměru 39,6 dne od zahájení terapie však terapie založená na použití mananu-BAM v kombinaci s R848 nezaručuje statisticky významně delší dobu přežití.





Obr. 9: Vliv R848 a jeho kombinace s mananem-BAM na dobu přežívání myši.

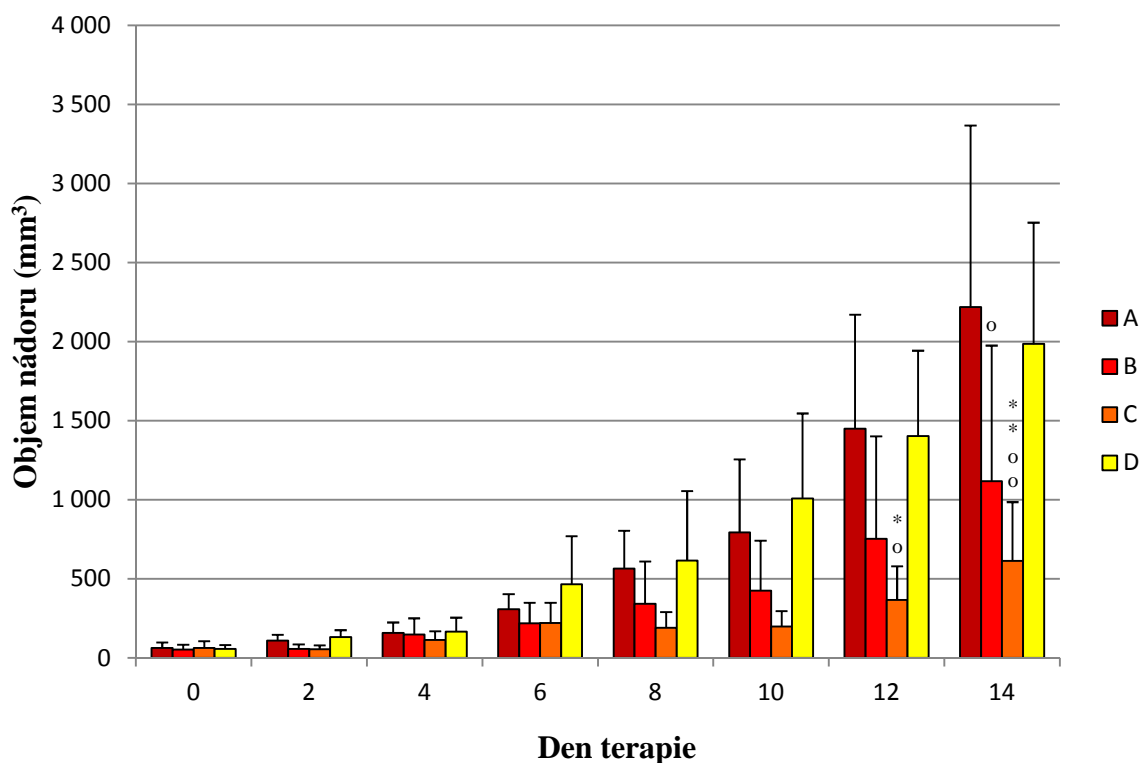
A – 0,2 mM manan-BAM v PBS, B – LPS v PBS (c = 0,5 mg/ml), C – 0,2 mM manan-BAM v PBS obsahujícím LPS (c = 0,5 mg/ml PBS), D – R848 v PBS (c = 0,5 mg/ml), E – 0,2 mM manan-BAM v PBS obsahujícím R848 (c = 0,5 mg/ml PBS), F – PBS.

### 5.1.3 Pokus č. 3 – Použitelnost R848 (baze) v imunoterapii melanomu B16-F10 a jeho synergie s mananem-BAM

Třetí experiment byl proveden za účelem testování účinku jak samotného R848, tak jeho kombinace s mananem-BAM na větším množství experimentálních zvířat. Rovněž bylo nutno ověřit předchozí zjištění, že R848 je použitelný v imunoterapii nádorových onemocnění jako vhodná náhrada LPS.

Obrázek 10 popisuje účinek R848 kombinovaného s mananem-BAM (skupina C) na terapii maligního melanomu. Vyplývá z něj, že samotný R848 (skupina B) vykazuje průměrnou redukci nádorového růstu rovnající se 42,8% a samotný manan-BAM (skupina

A) nemá takřka žádný terapeutický účinek, avšak jejich kombinací dosáhneme statisticky významné redukce nádorového růstu, která v průměru činí 62,7%.



Obr. 10: Vliv R848 (baze) a jeho kombinace s mananem-BAM na terapii melanomu B16-F10.

A – 0,2 mM manan-BAM v PBS, B – R848 v PBS (c = 0,5 mg/ml), C – 0,2 mM manan-BAM v PBS obsahujícím R848 (c = 0,5 mg/ml PBS), D – PBS.

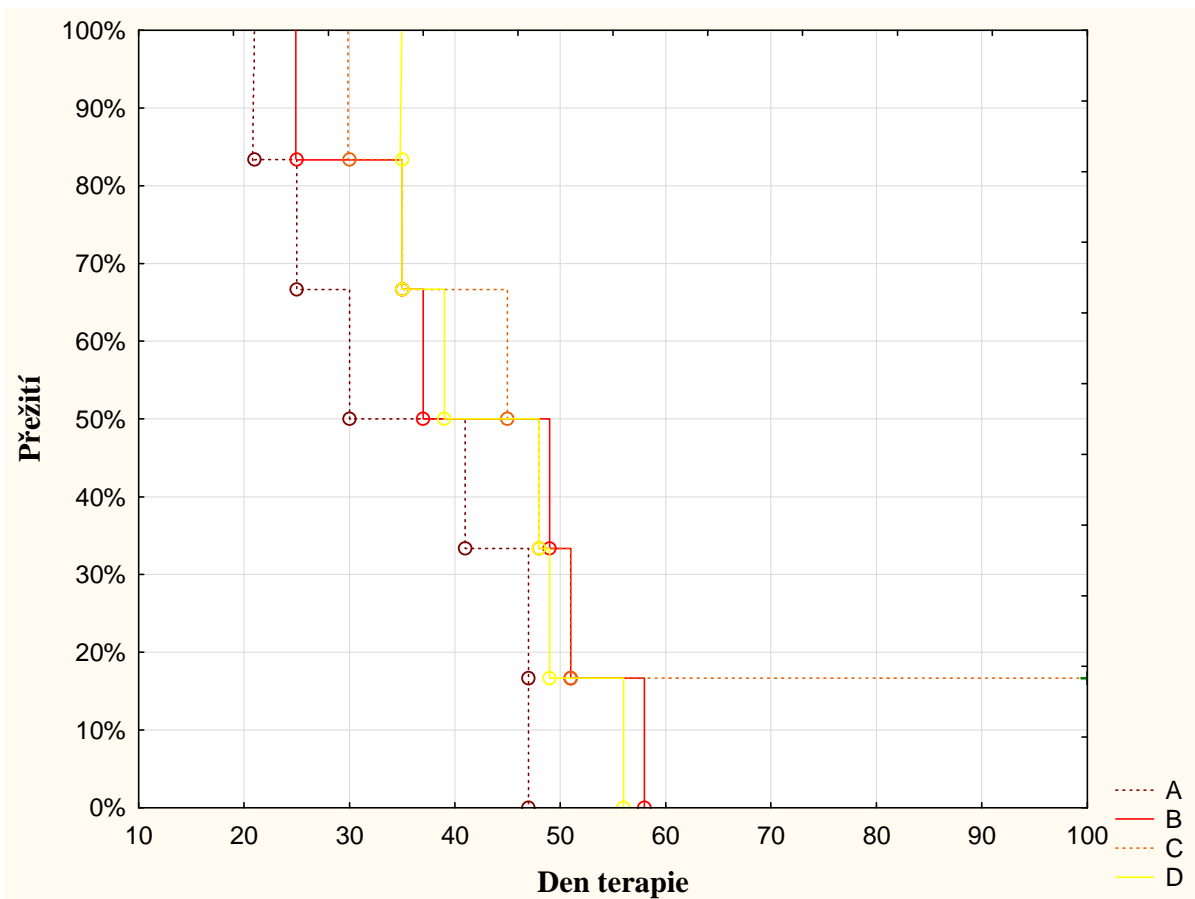
\*  $P \leq 0,01$  v porovnání s kontrolou (D)

\*\*  $P \leq 0,0005$  v porovnání s kontrolou (D)

o  $P \leq 0,005$  v porovnání s mananem-BAM (A)

oo  $P \leq 0,0005$  v porovnání s mananem-BAM (A)

Obrázek 11 znázorňuje dobu od počátku terapie, po kterou byly myši v jednotlivých skupinách živы. Zatímco myši kontrolní (skupina D) se dožily v průměru 43,6 dne od zahájení terapie, myši léčené mananem-BAM (skupina A) a R848 (skupina B) přežily v průměru ještě méně dní, konkrétně 35,2, respektive 42,5. Z myší, jimž byl podáván manan-BAM v PBS obsahující R848, se jedna dožila 100 dní. Průměrné přežití této skupiny je 51,5 dne, což ale v porovnání s myšmi kontrolními není statisticky významné.



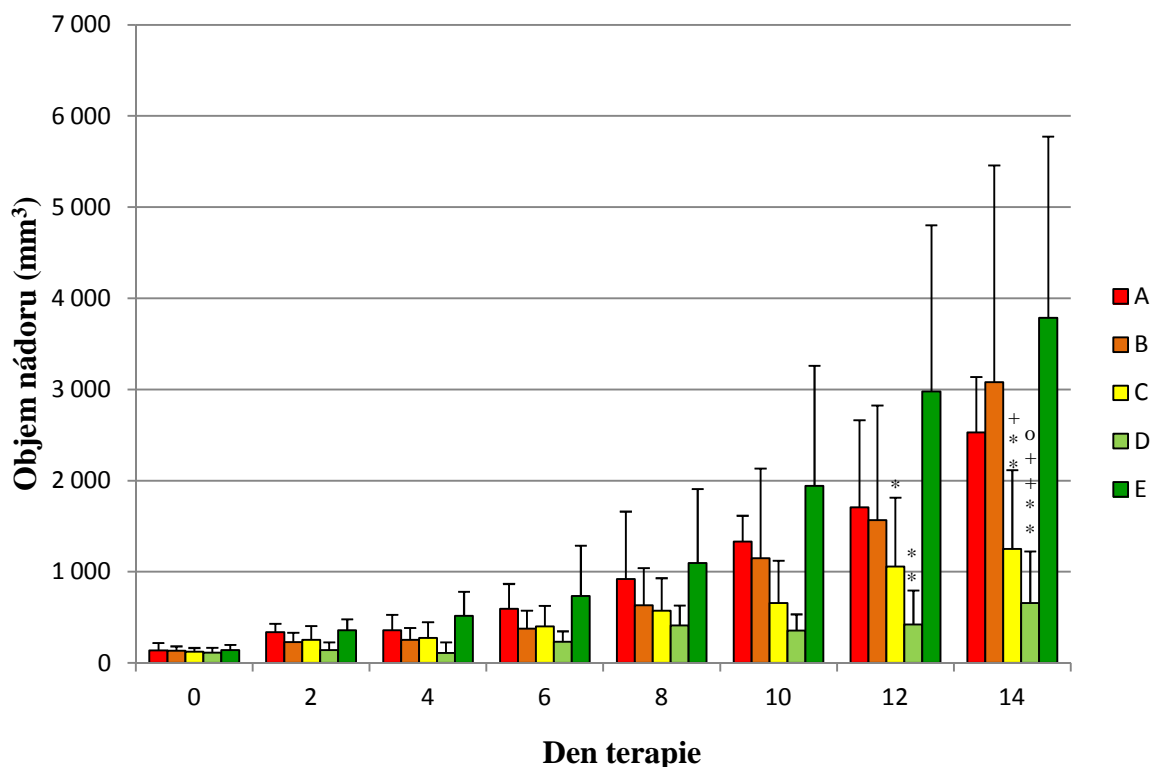
Obr. 11: Vliv mananu-BAM v kombinaci s R848 na dobu přežití myši.

A – 0,2 mM manan-BAM v PBS, B – R848 v PBS (c = 0,5 mg/ml), C – 0,2 mM manan-BAM v PBS obsahujícím R848 (c = 0,5 mg/ml PBS), D – PBS.

#### 5.1.4 Pokus č. 4 – Studium možnosti použití kovalentně kotvených bakterií *Listeria monocytogenes* pro léčbu melanomu B16-F10 a sledování jejich případné synergie s mananem-SMCC

Účelem čtvrtého pokusu bylo zjistit, jaký vliv bude mít přidání kovalentně kotvených bakterií *Listeria monocytogenes* k mananu kotvenému stejným způsobem.

Obrázek 12 znázorňuje vliv terapie založené na kombinaci bakterií *Listeria monocytogenes* kotvených pomocí SMCC s mananem-SMCC (skupina D) na velikost nádorů. Samotné bakterie *Listeria monocytogenes* (skupina A) redukovaly nádorový růst o 28,8%. Kotvením bakterií pomocí SMCC (skupina B) bylo dosaženo průměrné redukce nádorového růstu rovnající se 41,5%. Spojením kovalentně kotvených bakterií s mananem-SMCC (skupina D) bylo dosaženo 76,7% a statisticky významné redukce nádorového růstu, a to nejen v porovnání s myšmi kontrolními, ale i se skupinami A a B.



Obr. 12: Vliv kovalentně kotvených bakterií *Listeria monocytogenes* a jejich kombinace s mananem-SMCC na terapii melanomu B16-F10.

**A** – *Listeria monocytogenes* v PBS (c = 1 miliarda bakterií/ml), **B** – *Listeria monocytogenes*-SMCC v PBS (c = 1 miliarda bakterií/ml), **C** – 0,2 mM manan-SMCC v PBS, **D** – *Listeria monocytogenes*-SMCC v 0,2 mM manan-SMCC v PBS (c = 1 miliarda bakterií/ml směsi), **E** – PBS.

\*  $P \leq 0,05$  v porovnání s kontrolou (E)

\*\*  $P \leq 0,0005$  v porovnání s kontrolou (E)

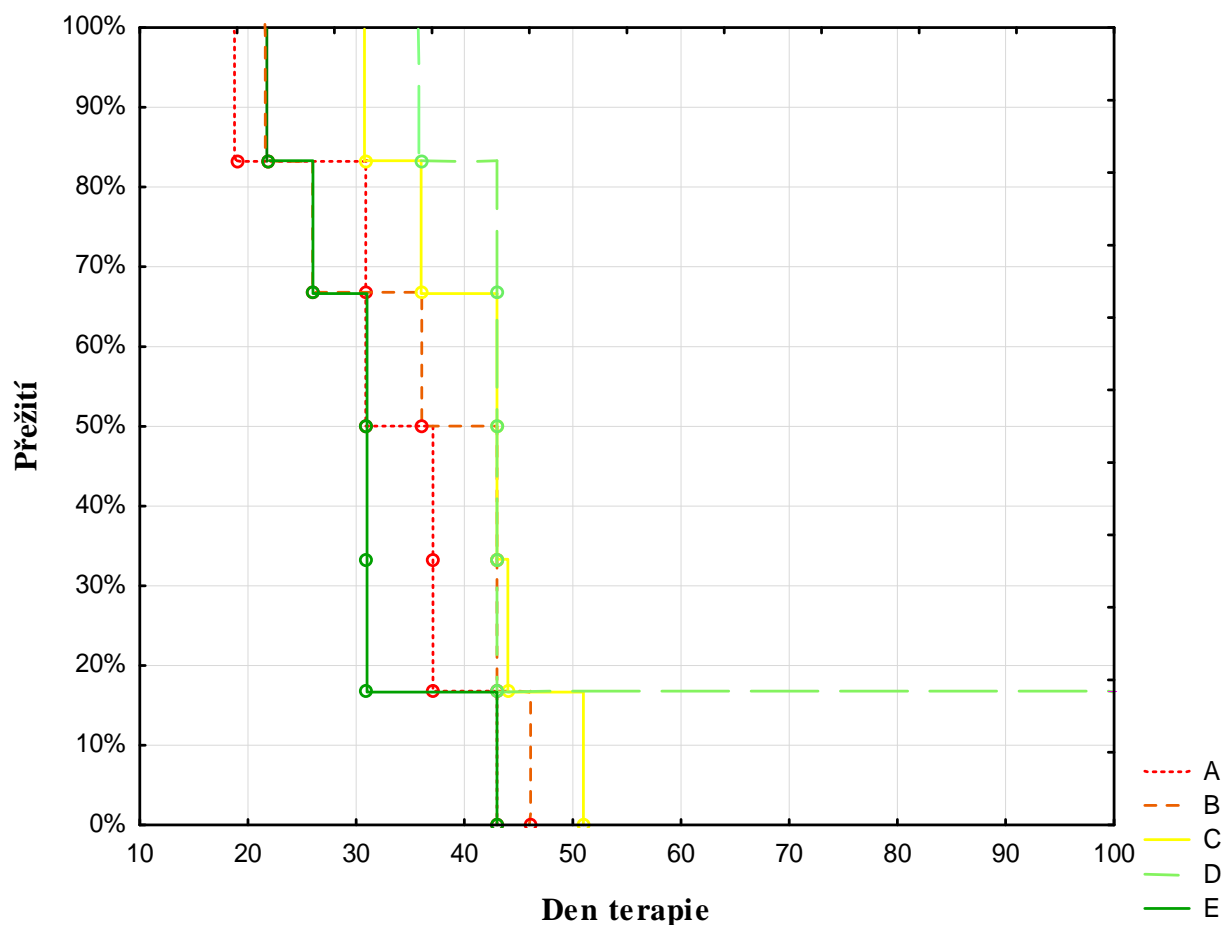
o  $P \leq 0,05$  v porovnání s bakteriemi *Listeria monocytogenes* (A)

+  $P \leq 0,05$  v porovnání s bakteriemi *Listeria monocytogenes*-SMCC (B)

++  $P \leq 0,0005$  v porovnání s bakteriemi *Listeria monocytogenes*-SMCC (B)

Obrázek 13 vypovídá o době přežití myši v jednotlivých skupinách. Plyne z něj, že volné ani kovalentně kotvené bakterie *Listeria monocytogenes* (skupiny A a B) neprodlužují významně délku života myši v porovnání s PBS (skupina E). Myši, jimž byl podáván manan-SMCC (skupina C) žily v průměru o více než 10 dní déle než myši kontrolní. Z myši, jimž byla podávána kombinace bakterií *Listeria monocytogenes* s mananem-SMCC (skupina

D), jedna překročila hranici 100 dní. Celkový průměr přežití této skupiny je však 51,3 dne, což v porovnání s 30,6 dny myši kontrolních není statisticky významné.



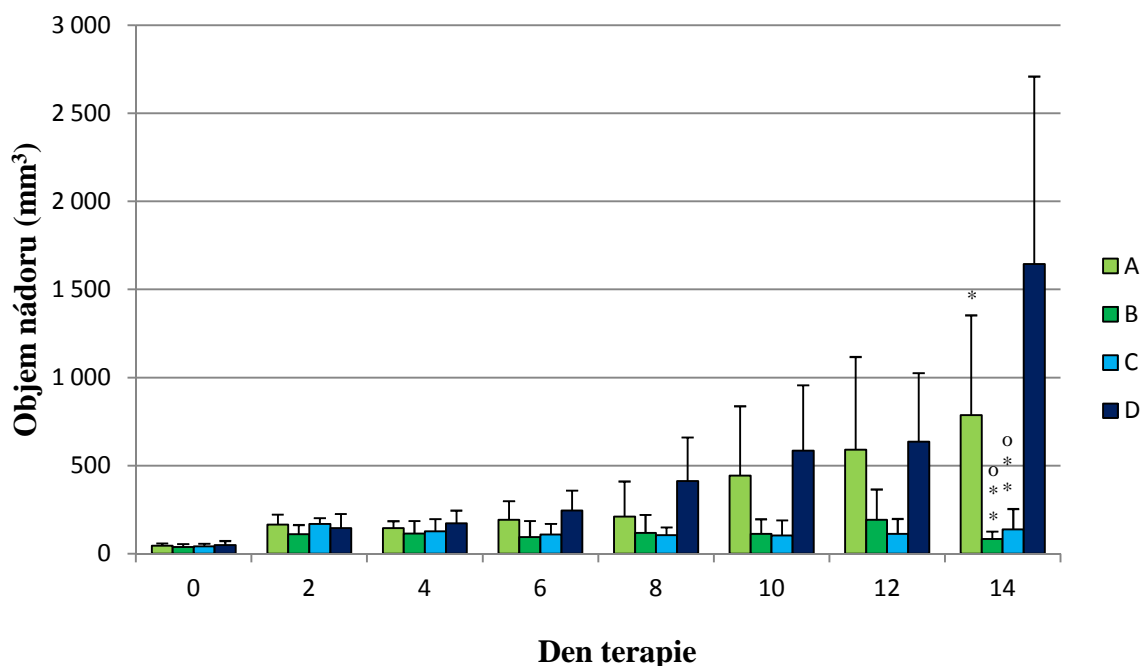
Obr. 13: Vliv kovalentně kotvených bakterií *Listeria monocytogenes* s mananem-SMCC na dobu přežití myši.

**A** – *Listeria monocytogenes* v PBS (c = 1 miliarda bakterií/ml), **B** – *Listeria monocytogenes*-SMCC v PBS (c = 1 miliarda bakterií/ml), **C** – 0,2 mM manan-SMCC v PBS, **D** – *Listeria monocytogenes*-SMCC v 0,2 mM manan-SMCC v PBS (c = 1 miliarda bakterií/ml směsi), **E** – PBS.

### 5.1.5 Pokus č. 5 – Studium vlivu přidání bakterií *Listeria monocytogenes* ke směsi mananu-SMCC a R848.HCl na účinnost terapie maligního melanomu

Pátý experiment byl proveden z důvodu odhalení vlivu přidání bakterií *Listeria monocytogenes* ke směsi látek mananu-SMCC s R848.HCl, jejichž protinádorový účinek byl již v této práci prokázán.

Na Obrázku 14 je znázorněn vliv terapie směsí bakterií *Listeria monocytogenes* s mananem-SMCC a R848.HCl (skupina C) v porovnání se směsí mananu-SMCC a R848.HCl (skupina B) na průměrnou velikost nádorů v prvních 14 dnech experimentu. Vyplývá z něj, že statisticky významnou redukci nádorového růstu vyvolávají obě kombinace léčiv. V případě skupiny C je průměrná redukce nádorového růstu rovna 66,5% a ve skupině B odpovídá 65,7%.



Obr. 14: Vliv aplikace směsí bakterií *Listeria monocytogenes* s mananem-SMCC a R848.HCl v porovnání s mananem-SMCC a R848.HCl na terapii maligního melanomu.

**A** – *Listeria monocytogenes*-SMCC v 0,2 mM manan-SMCC v PBS (c = 1 miliarda bakterií/ml směsi), **B** – 0,2 mM manan-SMCC v PBS + R848.HCl v PBS (c = 0,5 mg/ml PBS), **C** – *Listeria monocytogenes*-SMCC v 0,2 mM manan-SMCC v PBS (c = 1 miliarda bakterií/ml směsi) + R848.HCl v PBS (c = 0,5 mg/ml PBS), **D** – PBS.

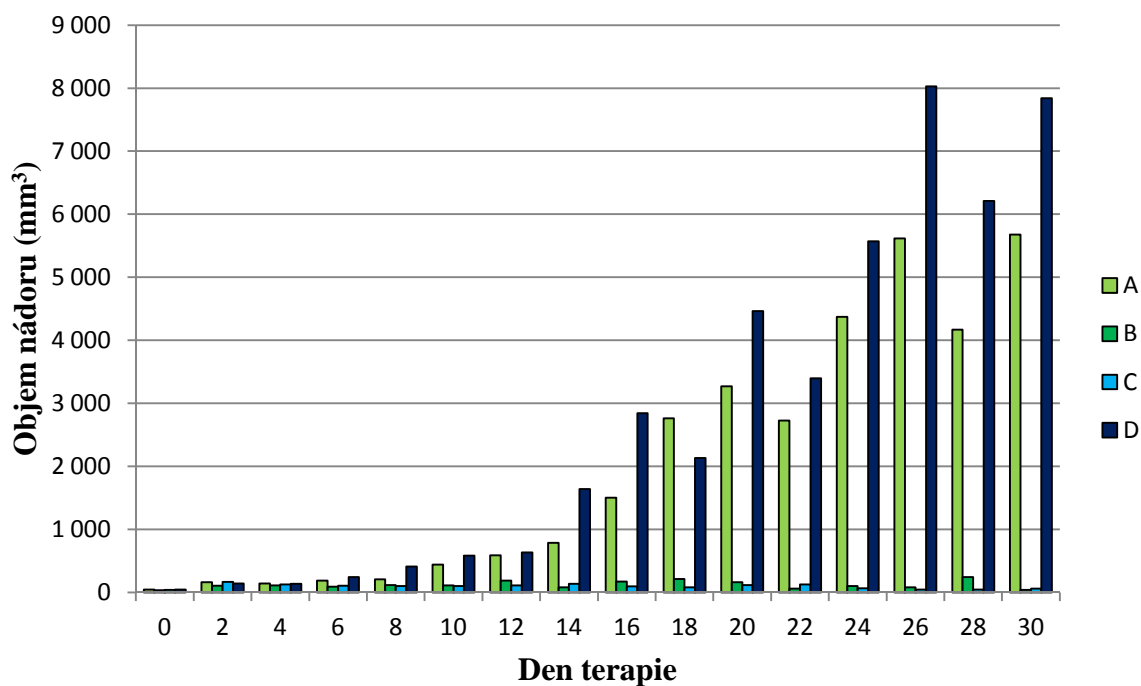
\*  $P \leq 0,005$  v porovnání s kontrolou (D)

\*\*  $P \leq 0,0005$  v porovnání s kontrolou (D)

o  $P \leq 0,05$  v porovnání s bakteriemi *Listeria monocytogenes*-SMCC + manan-SMCC (A)

Obrázek 15 znázorňuje výsledek téhož experimentu, jako je uveden na Obrázku 14, s tím rozdílem, že je postihnout celý třicetidenní průběh experimentu. Graf nám říká, že

objemy nádorů ve skupinách B a C klesaly neustále a byly i o více než 99% menší než nádory myší kontrolních, avšak z důvodu kontinuálních úhynů zejména kontrolních myší (skupina D) nemohla být v tomto případě zjišťována statistická významnost. Dále z Obrázku 15 vyplývá, že směs mananu-SMCC s R848.HCl má srovnatelný účinek s toutéž směsí obohacenou o bakterie *Listeria monocytogenes*. Graf dále naznačuje, že účinek obou terapií je postupný.

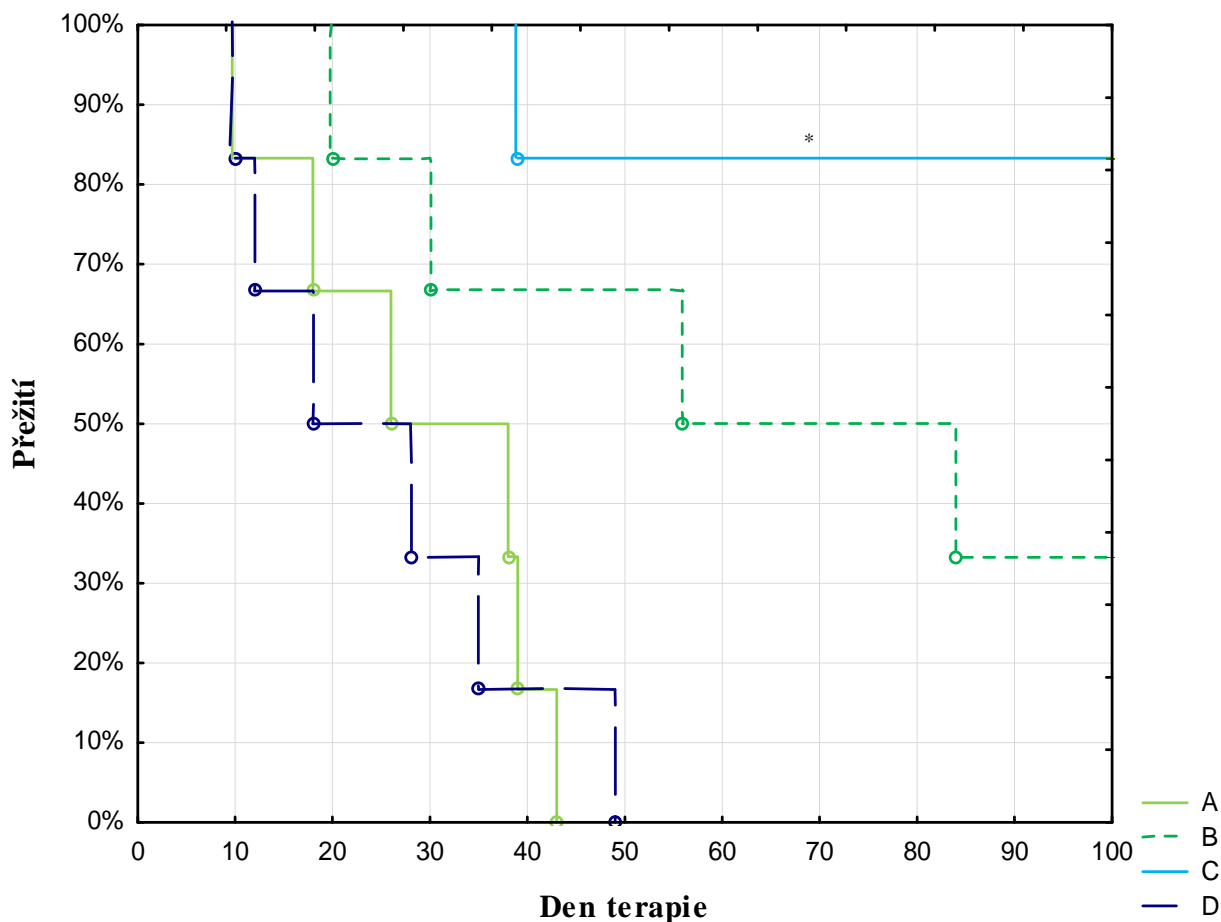


Obr. 15: Dlouhodobý vliv aplikace směsí bakterie *Listeria monocytogenes* s mananem-SMCC a R848.HCl v porovnání s mananem-SMCC a R848.HCl na terapii maligního melanomu.

**A** – *Listeria monocytogenes*-SMCC v 0,2 mM manan-SMCC v PBS (c = 1 miliarda bakterií/ml směsi), **B** – 0,2 mM manan-SMCC v PBS + R848.HCl v PBS (c = 0,5 mg/ml PBS), **C** – *Listeria monocytogenes*-SMCC v 0,2 mM manan-SMCC v PBS (c = 1 miliarda bakterií/ml směsi) + R848.HCl v PBS (c = 0,5 mg/ml PBS), **D** – PBS.

Obrázek 16 je grafem závislosti doby přežití jednotlivých skupin na aplikovaném terapeutiku. Zatímco myši kontrolní (skupina D) žily v průměru jen 25,3 dne od zahájení terapie, z myší, jimž byla podávána směs bakterií *Listeria monocytogenes*-SMCC s mananem-SMCC a R848 (skupina C), přežilo 5 jedinců (83,3%) hranici 100 dní. V porovnání s myšmi kontrolními (skupina D) a myšmi, kterým byla aplikována směs

mananu-SMCC s R848 (skupina B), kde hranici 100 dní překonaly 2 myši (33,3%), je přežití ve skupině C významně delší. Ve statisticky významném prodloužení doby přežití v porovnání s kontrolami je spatřován hlavní význam přidání bakterií *Listeria monocytogenes* ke směsi mananu-SMCC s R848.



Obr. 16: **Vliv aplikace směsí bakterií *Listeria monocytogenes* s mananem-SMCC a R848.HCl v porovnání s mananem-SMCC a R848.HCl na dobu přežívání.**

**A** – *Listeria monocytogenes*-SMCC v 0,2 mM manan-SMCC v PBS (c = 1 miliarda bakterií/ml směsi), **B** – 0,2 mM manan-SMCC v PBS + R848.HCl v PBS (c = 0,5 mg/ml PBS), **C** – *Listeria monocytogenes*-SMCC v 0,2 mM manan-SMCC v PBS (c = 1 miliarda bakterií/ml směsi) + R848.HCl v PBS (c = 0,5 mg/ml PBS), **D** – PBS.

\*  $P \leq 0,01$  v porovnání s kontrolou (D)

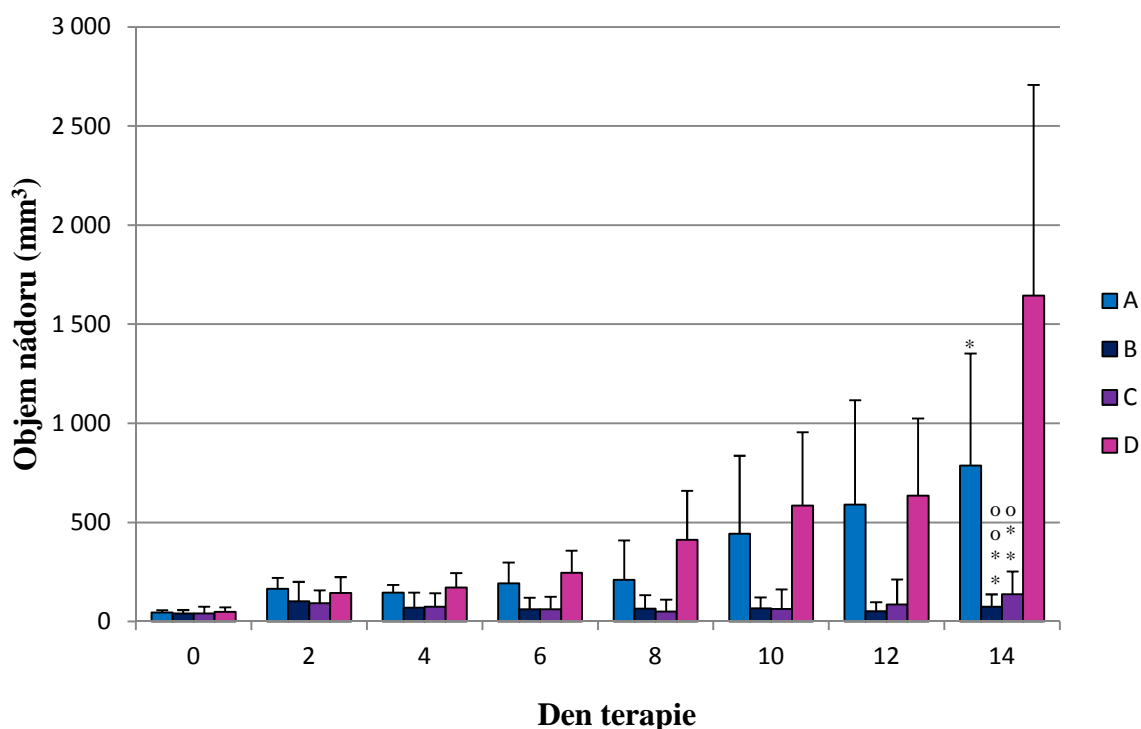
Jelikož 7 myší z tohoto experimentu (2 ze skupiny B a 5 ze skupiny C) přežilo hranici 100 dní, 120. den od zahájení terapie byla provedena retransplantace buněk melanomu B16-F10. Nádor vznikl u obou myší ze skupiny B (100%) a u 1 ze skupiny C (20%).



### 5.1.6 Pokus č. 6 – Studium vlivu přidání bakterií *Listeria monocytogenes* ke směsi látek manan-SMCC, R848.HCl a poly I:C na účinnost imunoterapie maligního melanomu

Šestý experiment byl proveden z důvodu odhalení vlivu přidání bakterií *Listeria monocytogenes* ke směsi látek mananu-SMCC, R848.HCl a poly I:C. V tomto pokusu byl tedy na rozdíl od minulého navíc použit poly I:C, agonista TLR3. Cílem bylo sledování nejen vlivu terapeutika na samotný nádorový růst, ale i na dobu přežití léčených jedinců v porovnání s jedinci kontrolními.

Na Obrázku 17 je znázorněna průměrná velikost nádorů v závislosti na podávané terapeutické látce. Ze srovnání směsí bakterií *Listeria monocytogenes* s mananem-SMCC, R848.HCl a poly I:C (skupina C) se směsí mananu-SMCC, R848.HCl a poly I:C (skupina B) vyplývá, že více než osmdesátiprocentní a takřka totožnou statisticky významnou redukcí nádorového růstu vyvolávají obě kombinace léčiv. V případě skupiny B je redukce nádorového růstu rovna 82,3%, u skupiny C odpovídá přesně 81,1%.



Obr. 17: Vliv aplikace směsí bakterií *Listeria monocytogenes* s mananem-SMCC, R848.HCl a poly I:C v porovnání s mananem-SMCC, R848.HCl a poly I:C na terapii maligního melanomu.

**A** – *Listeria monocytogenes*-SMCC v 0,2 mM manan-SMCC v PBS (c = 1 miliarda bakterií/ml směsi), **B** – 0,2 mM manan-SMCC v PBS + R848.HCl v PBS (c = 0,5 mg/ml PBS) + poly I:C v PBS (c = 0,5 mg/ml PBS), **C** – *Listeria monocytogenes*-SMCC v 0,2 mM manan-SMCC v PBS (c = 1 miliarda bakterií/ml směsi) + R848.HCl v PBS (c = 0,5 mg/ml PBS) + poly I:C v PBS (c = 0,5 mg/ml PBS), **D** – PBS.

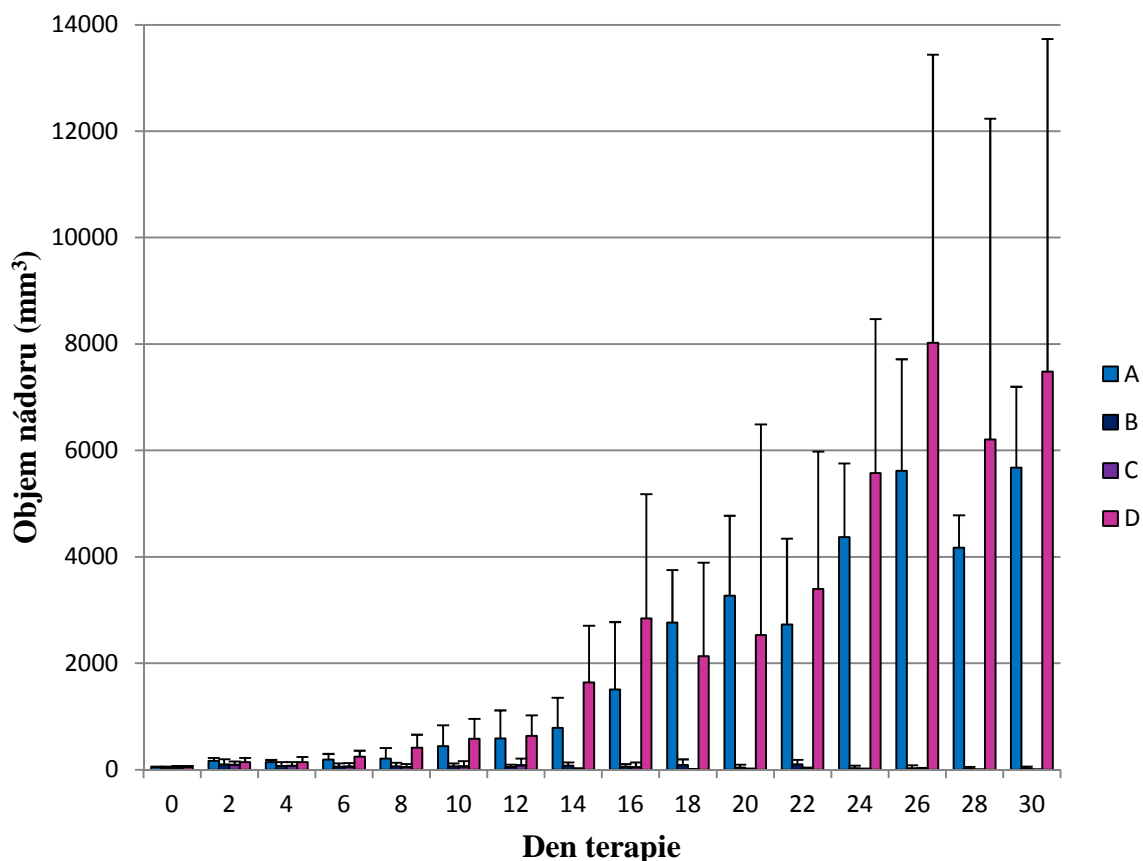
\*  $P \leq 0,005$  v porovnání s kontrolou (D)

\*\*  $\leq 0,0005$  v porovnání s kontrolou (D)

o  $P \leq 0,05$  v porovnání s bakteriemi *Listeria monocytogenes*-SMCC + manan-SMCC (A)

oo  $P \leq 0,01$  v porovnání s bakteriemi *Listeria monocytogenes*-SMCC + manan-SMCC (A)

Obrázek 18 znázorňuje výsledek téhož experimentu, jako je uveden na Obrázku 17, s tím rozdílem, že je postihnut celý třicetidenní průběh experimentu. Graf nám říká, že objemy nádorů ve skupinách B a C klesaly neustále a byly i o více než 99% menší než nádory myší kontrolních, avšak z důvodu kontinuálních úhynů zejména kontrolních myší (skupina D) nemohla být v tomto případě zjišťována statistická významnost. Dále z Obrázku 18 vyplývá, že směs mananu-SMCC s R848 a poly I:C má srovnatelný účinek s toutéž směsí obohacenou o bakterie *Listeria monocytogenes*. Graf dále naznačuje, že účinek obou terapií je postupný.

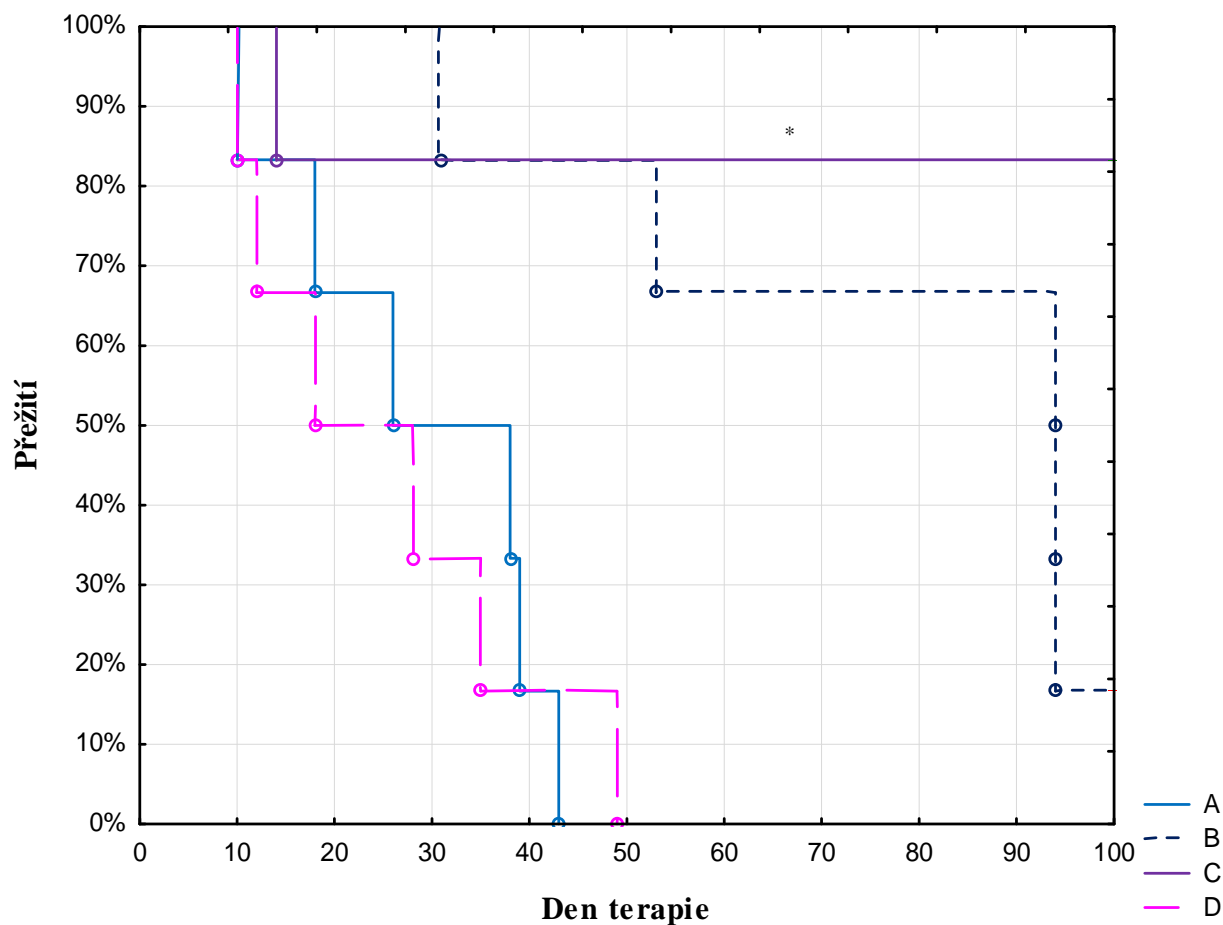


Obr. 18: Dlouhodobý vliv aplikace směsí bakterie *Listeria monocytogenes* s mananem-SMCC, R848.HCl a poly I:C v porovnání s mananem-SMCC, R848.HCl a poly I:C na terapii maligního melanomu.

**A** – *Listeria monocytogenes*-SMCC v 0,2 mM manan-SMCC v PBS (c = 1 miliarda bakterií/ml směsi), **B** – 0,2 mM manan-SMCC v PBS + R848.HCl v PBS (c = 0,5 mg/ml PBS) + poly I:C v PBS (c = 0,5 mg/ml PBS), **C** – *Listeria monocytogenes*-SMCC v 0,2 mM manan-SMCC v PBS (c = 1 miliarda bakterií/ml směsi) + R848.HCl v PBS (c = 0,5 mg/ml PBS), + poly I:C v PBS (c = 0,5 mg/ml PBS), **D** – PBS.

Obrázek 19 je grafem závislosti doby přežití jednotlivých skupin na aplikovaném terapeutiku. Zatímco myši kontrolní (skupina D) žily v průměru jen 25,3 dne od zahájení terapie, z myší, jimž byla podávána směs bakterií *Listeria monocytogenes* s mananem-SMCC, R848 a poly I:C (skupina C), přežilo 5 jedinců (83,3%) hranici 100 dní. V porovnání s kontrolami, ale i myšmi, kterým byla aplikována směs mananu-SMCC s R848 a poly I:C (skupina B), kde hranici 100 dní překonala 1 myš (16,7%), je přežití ve skupině C o mnoho delší. Ve statisticky významném prodloužení doby přežití v porovnání s kontrolami je spatřován hlavní význam přidání bakterií *Listeria monocytogenes* ke směsi mananu-SMCC

s R848 a poly I:C. Ze srovnání s předchozím experimentem vyplývá, že poly I:C již parametry terapie, jimiž jsou redukce nádorového růstu a doba přežití, významněji neovlivňuje.



Obr. 19: Vliv aplikace směsi bakterií *Listeria monocytogenes*-SMCC s mananem-SMCC, R848.HCl a poly I:C v porovnání s mananem-SMCC s R848.HCl a poly I:C na dobu přežívání.

**A** – *Listeria monocytogenes*-SMCC v 0,2 mM manan-SMCC v PBS (c = 1 miliarda bakterií/ml směsi), **B** – 0,2 mM manan-SMCC v PBS + R848.HCl v PBS (c = 0,5 mg/ml PBS) + poly I:C v PBS (c = 0,5 mg/ml PBS), **C** – *Listeria monocytogenes*-SMCC v 0,2 mM manan-SMCC v PBS (c = 1 miliarda bakterií/ml směsi) + R848.HCl v PBS (c = 0,5 mg/ml PBS), + R848.HCl v PBS (c = 0,5 mg/ml PBS) + poly I:C v PBS (c = 0,5 mg/ml PBS), **D** – PBS.

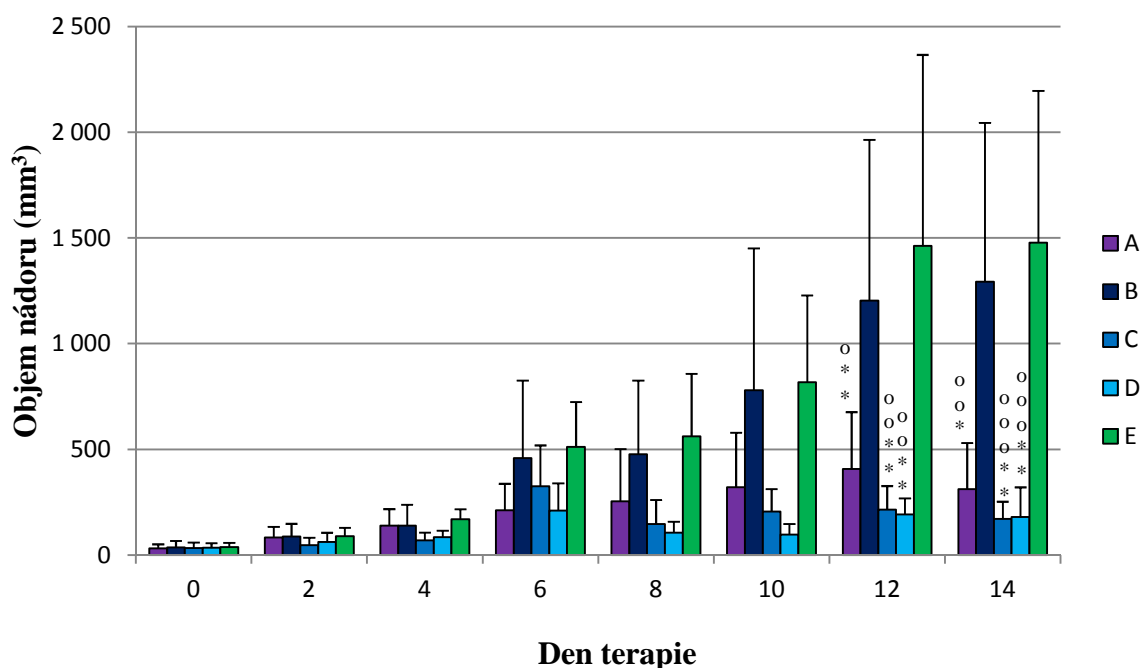
\*  $P \leq 0,005$  v porovnání s kontrolou (D)

Jelikož 6 myší z tohoto experimentu (1 ze skupiny B a 5 ze skupiny C) přežilo hranici 100 dní, 120. den od zahájení terapie byla provedena retransplantace buněk melanomu B16-F10. Nádor nevznikl u žádné z retransplantovaných myší.

### 5.1.7 Pokus č. 7 - Ovlivnění protinádorového účinku směsi mananu-BAM s R848.HCl zablokováním oxidativního vzplanutí neutrofilů pomocí epicatechinu

Účelem sedmého experimentu bylo prokázat, zda mechanismus, jímž neutrofilové zabíjejí nádorové buňky, je oxidativní vzplanutí. K tomuto účelu byl použit inhibitor oxidativního vzplanutí epicatechin.

Obrázek 20 znázorňuje vliv přidání epicatechinu ke směsi mananu-BAM v kombinaci s R848.HCl na průměrnou velikost nádorů. Vyplývá z něj, že kombinací mananu-BAM s R848 (skupina C) bylo dosaženo průměrné redukce nádorového růstu rovnající se 69,6%. Přidáním epicatechinu ke směsi mananu-BAM s R848 (skupina D) však bylo dosaženo velmi podobných výsledků. Průměrná redukce nádorového růstu v tomto případě odpovídala 77,7%. Epicatechin tedy účinnost terapie nesnižoval.



Obr. 20: Vliv přidání epicatechinu ke směsi mananu-BAM s R848.HCl na průměrnou velikost nádorů.

**A** – R848.HCl v PBS ( $c = 0,5 \text{ mg/ml}$ ), **B** –  $0,2 \text{ mM}$  manan-BAM v PBS, **C** –  $0,2 \text{ mM}$  manan-BAM v PBS obsahujícím R848.HCl ( $c = 0,5 \text{ mg/ml}$ ), **D** –  $0,2 \text{ mM}$  manan-BAM v PBS obsahujícím R848.HCl ( $c = 0,5 \text{ mg/ml}$ ) +  $4 \text{ mM}$  epicatechin v PBS, **E** – PBS.

\*  $P \leq 0,001$  v porovnání s kontrolou (E)

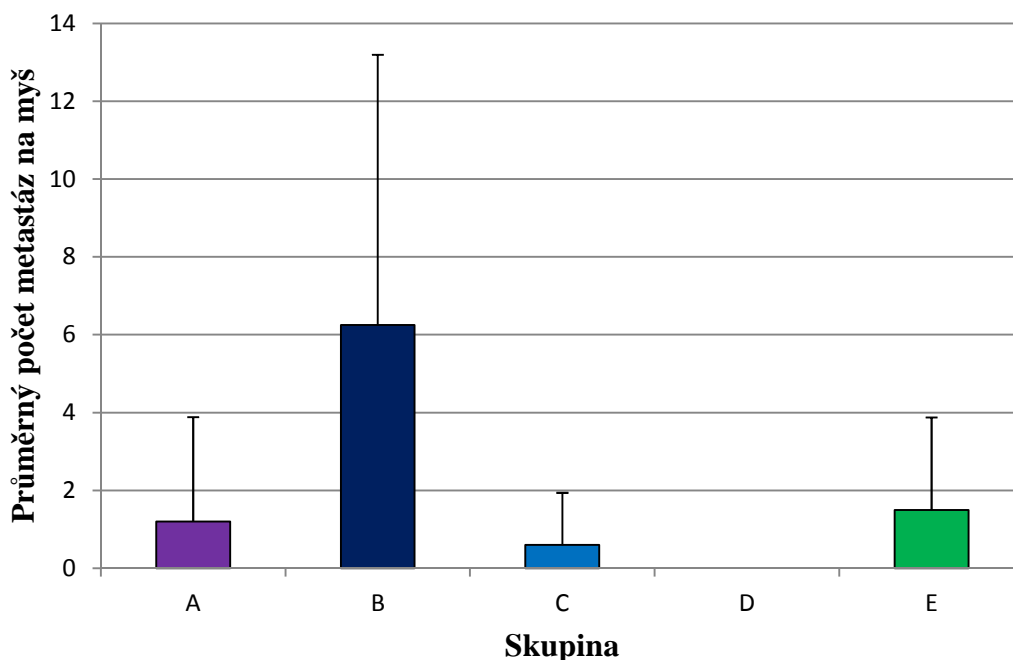
\*\*  $P \leq 0,0005$  v porovnání s kontrolou (E)

o  $P \leq 0,05$  v porovnání s mananem-BAM v PBS (B)

oo  $P \leq 0,005$  v porovnání s mananem-BAM v PBS (B)

ooo  $P \leq 0,0005$  v porovnání s mananem-BAM v PBS (B)

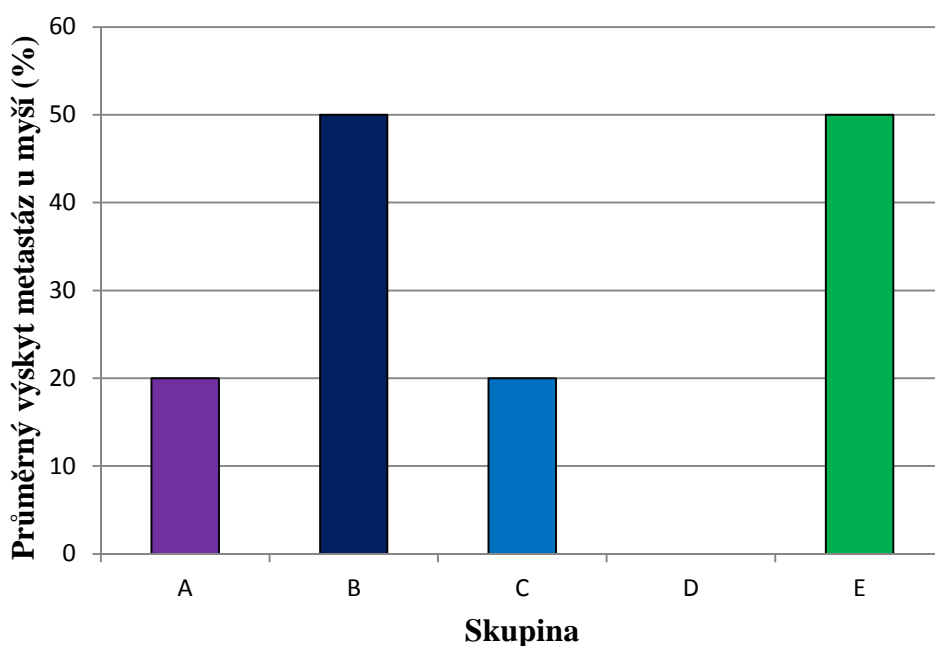
Obrázek 21 vyjadřuje intenzitu metastazování vyjádřenou průměrným počtem metastáz na myš v jednotlivých skupinách. Vyplývá z něj, že nejvíce metastáz, konkrétně průměrných 6,25, bylo objeveno u skupiny B, jíž byl podáván samotný manan-BAM. V porovnání s myši kontrolními (skupina E) došlo k velkému nárůstu intenzity metastazování. Myši léčené samotným R848 (skupina A) měly v průměru 1,2 metastázy na myš. U skupiny C léčené kombinací mananu-BAM s R848 bylo objeveno v průměru 0,6 metastázy na myš. Přidáním epicatechinu ke směsi mananu-BAM s R848 (skupina D) však bylo dosaženo kompletní absence výskytu metastáz.



Obr. 21: Vliv léčby pomocí směsi mananu-BAM s R848.HCl a epicatechinem na intenzitu metastazování v jednotlivých skupinách.

**A** – R848.HCl v PBS ( $c = 0,5 \text{ mg/ml}$ ), **B** –  $0,2 \text{ mM}$  manan-BAM v PBS, **C** –  $0,2 \text{ mM}$  manan-BAM v PBS obsahujícím R848.HCl ( $c = 0,5 \text{ mg/ml}$ ), **D** –  $0,2 \text{ mM}$  manan-BAM v PBS obsahujícím R848.HCl ( $c = 0,5 \text{ mg/ml}$ ) +  $4 \text{ mM}$  epicatechin v PBS, **E** – PBS.

Obrázek 22 znázorňuje prevalenci metastáz u myši v jednotlivých skupinách. Plyne z něho, že metastázy se vyskytovaly s největší četností rovnající se polovině případů ve skupinách B a E. Myši, jimž byl podáván samotný R848 (skupina A) a myši léčené kombinací mananu-BAM s R848 (skupina C) měly metastázy ve 20% případů. Přidáním epicatechinu ke směsi mananu-BAM s R848 (skupina D) bylo dosaženo kompletní absence výskytu metastáz.



Obr. 22: Prevalence metastáz u myši v jednotlivých skupinách.

**A** – R848.HCl v PBS ( $c = 0,5 \text{ mg/ml}$ ), **B** –  $0,2 \text{ mM}$  manan-BAM v PBS, **C** –  $0,2 \text{ mM}$  manan-BAM v PBS obsahujícím R848.HCl ( $c = 0,5 \text{ mg/ml}$ ), **D** –  $0,2 \text{ mM}$  manan-BAM v PBS obsahujícím R848.HCl ( $c = 0,5 \text{ mg/ml}$ ) +  $4 \text{ mM}$  epicatechin v PBS, **E** – PBS.

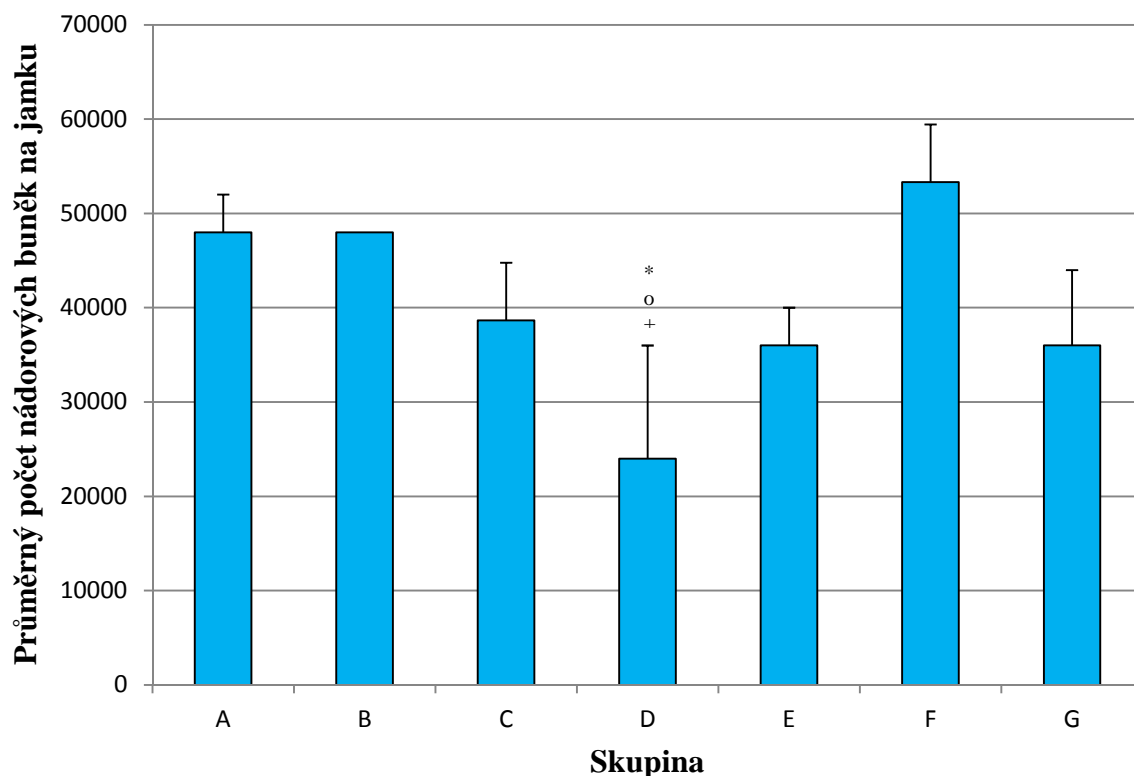
## 5.2 Experimenty in vitro

### 5.2.1 Pokus č. 1 – Vliv epicatechinu, inhibitoru oxidativního vzplanutí, na cytotoxický účinek primovaných neutrofilů na buňky B16-F10 s ukotveným mananem

Cílem tohoto experimentu bylo zjistit, jakým způsobem bude ovlivněn cytotoxický účinek primovaných neutrofilů na nádorové buňky s mananem kotveným pomocí BAM přidáním epicatechinu, inhibitoru oxidativního vzplanutí. Dále bylo důležité zjistit, zda samotný epicatechin nepůsobí na nádorové buňky cytotoxicky.

Obrázek 23 je grafem závislosti cytotoxického účinku podávané terapeutické směsi na buňky melanomu B16-F10. Účinky všech terapeutik jsou porovnávány se samotnými nádorovými buňkami (skupina A). Z grafu vyplývá, že samotný manan-BAM (skupina B) nemá na melanomové buňky žádný cytotoxický účinek. Samotné primované neutrofilie (skupina C) způsobily destrukci 19% nádorových buněk a směs volného mananu s primovanými neutrofilie (skupina E) zničila čtvrtinu nádorových buněk. Padesátiprocentní, a tudíž největší cytotoxický účinek na nádorové buňky byl zaznamenán u skupiny D, tedy tam, kde primované neutrofilie působily na nádorové buňky s kotveným mananem. Samotný epicatechin (skupina F) nepůsobí na buňky B16-F10 cytotoxicky. Přidáním epicatechinu ke směsi odpovídající skupině D, tedy nádorovým buňkám s vázaným mananem a primovanými neutrofilie, dojde k tomu, že se cytotoxický účinek neutrofilů sníží na polovinu (skupina G). Z tohoto experimentu lze usuzovat na částečnou spoluúčast oxidativního vzplanutí při neutrofilním ataku na nádorové buňky s vázaným mananem.





Obr. 23: **Cytotoxický účinek primovaných neutrofilů na nádorové buňky s mananem vázaným pomocí BAM a ovlivnění této cytotoxicity použitím epicatechinu.**

**A** – B16-F10, **B** – B16-F10 + manan-BAM, **C** – B16-F10 + primované neutrofilý, **D** – B16-F10 + manan-BAM + primované neutrofilý, **E** – B16-F10 + volný manan + primované neutrofilý, **F** – B16-F10 + 0,1 mM epicatechin v PBS, **G** – B16-F10 + manan-BAM + primované neutrofilý + 0,1 mM epicatechin v PBS.

\*  $P \leq 0,01$  v porovnání s B16-F10 (A)

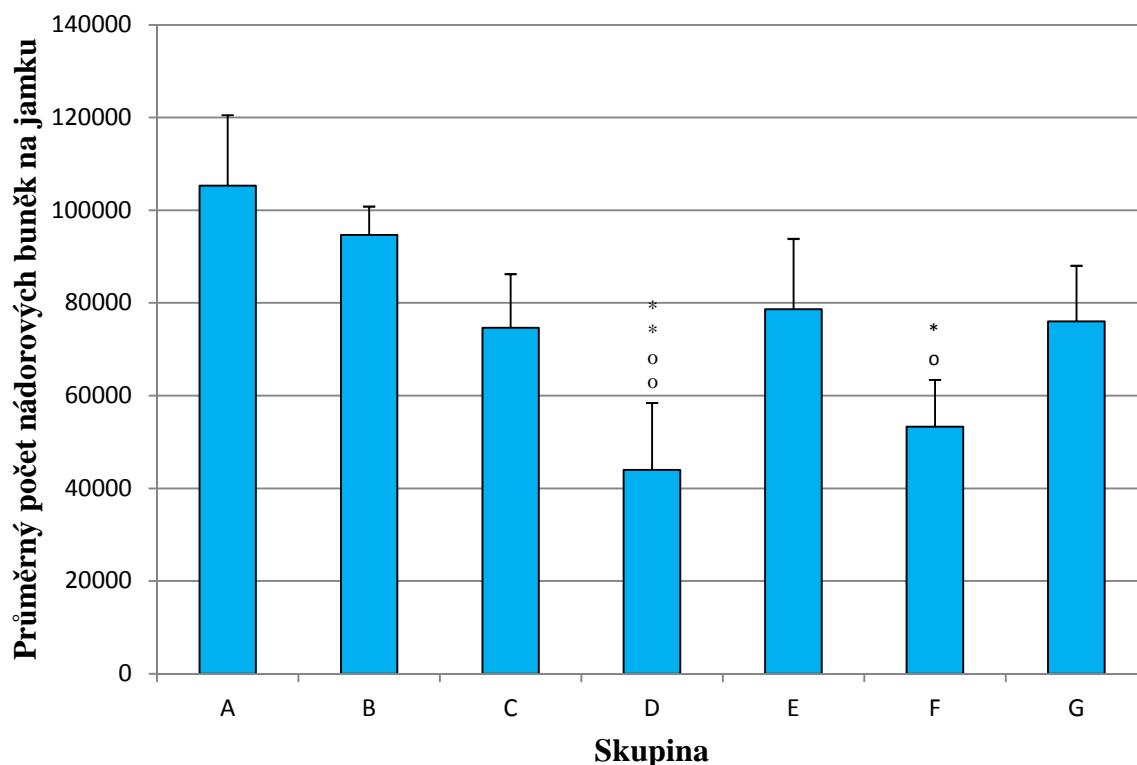
o  $P \leq 0,01$  v porovnání s B16-F10 + manan-BAM (B)

+  $P \leq 0,005$  v porovnání s B16-F10 + 0,1mM epicatechin (F)

### 5.2.2 Pokus č. 2 – Vliv epicatechinu na cytotoxické působení primovaných neutrofilů na nádorové buňky s ukotveným mananem při použití dvojnásobného množství neutrofilů a nádorových buněk

Jelikož je počítání v Bürkerově komůrce nepřesné, byl proveden tentýž experiment, tentokrát však byly použity suspenze nádorových buněk i primovaných neutrofilů o dvojnásobné koncentraci. Účelem bylo potvrzení či vyvrácení výsledků prvního cytotoxického testu.

Obrázek 24 je grafem závislosti cytotoxického účinku podávané terapeutické směsi na počtu buněk melanomu B16-F10. Účinky všech terapeutik jsou porovnávány se samotnými nádorovými buňkami (skupina A). Z grafu vyplývá, že samotný manan-BAM (skupina B) zničil 10% nádorových buněk. Samotné primované neutrofilie (skupina C) způsobily destrukci 29% nádorových buněk. Osmapadesátiprocentní, a tudíž největší cytotoxický účinek byl zaznamenán u skupiny D, kde primované neutrofilie působily na nádorové buňky s kotveným mananem. Směs volného mananu s primovanými neutrofilie (skupina E) zničila čtvrtinu nádorových buněk. Samotný epicatechin (skupina F) v tomto případě působil na nádorové buňky cytotoxicky – zničil jich téměř 50%. Přidáním epicatechinu ke směsi ze skupiny D (skupina G) dosáhneme snížení cytotoxicity na necelých 28%, tedy 52,2% inhibice cytotoxicity. Výsledky sice nejsou v rozporu s předchozím pokusem, ale vysoký přímý cytotoxický účinek epicatechinu na nádorové buňky (skupina F) znemožňuje další interpretaci. Z tohoto důvodu bylo v dalším experimentu použito původní uspořádání.



Obr. 24: Cytotoxický účinek dvojnásobného množství primovaných neutrofilů na dvojnásobek nádorových buněk s vázaným mananem a ovlivnění této cytotoxicity použitím epicatechinu.

A – B16-F10, B – B16-F10 + manan-BAM, C – B16-F10 + primované neutrofilie, D – B16-F10 + manan-BAM + primované neutrofilie, E – B16-F10 + volný manan + primované

neutrofilů, **F** – B16-F10 + 0,1 mM epicatechin v PBS, **G** – B16-F10 + manan-BAM + primované neutrofilů + 0,1 mM epicatechin v PBS.

\*  $P \leq 0,005$  v porovnání s B16-F10 (A)

\*\*  $P \leq 0,001$  v porovnání s B16-F10 (A)

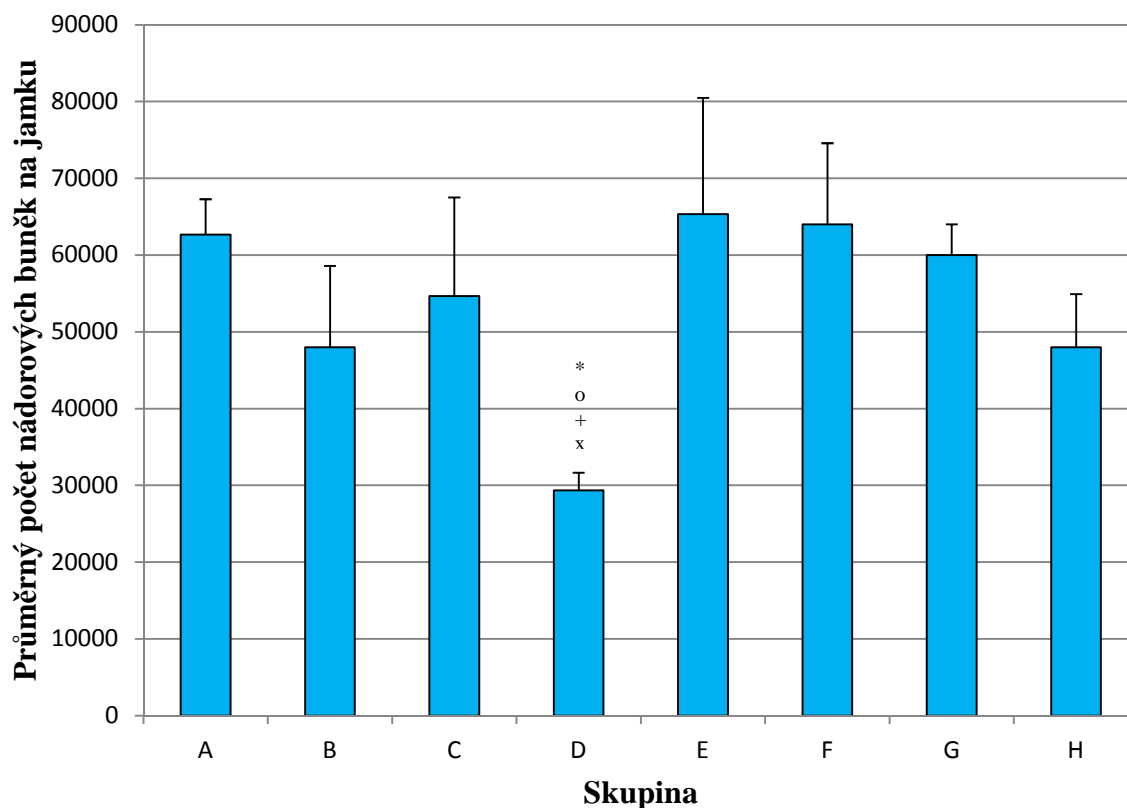
o  $P \leq 0,05$  v porovnání s B16-F10 + manan-BAM (B)

oo  $P \leq 0,005$  v porovnání s B16-F10 + manan-BAM (B)

### **5.2.3 Pokus č. 3 - Studium vlivu různých koncentrací epicatechinu na cytotoxické působení primovaných neutrofilů na nádorové buňky s ukotveným mananem.**

Třetí cytotoxický test byl proveden za účelem optimalizace dávky epicatechinu pro účinnou inhibici oxidativního vzplanutí neutrofilů a určení míry inhibice cytotoxicity použitím poloviční a dvojnásobné koncentrace epicatechinu v porovnání s pokusem 5.2.1.

Obrázek 25 je grafem závislosti cytotoxického účinku podávané terapeutické směsi na počtu buněk melanomu B16-F10. Účinky všech terapeutik jsou porovnávány se samotnými nádorovými buňkami (skupina A). Z grafu plyne, že manan-BAM (skupina B) redukoval počet nádorových buněk o více než 23% a samotné primované neutrofilů (skupina C) zničily necelých 13% melanomových buněk. Primované neutrofilů, které působily na nádorové buňky s mananem ukotveným pomocí BAM (skupina D) bylo dosaženo největšího cytotoxického efektu, který byl roven 53,2%. Použitím 0,05 mM epicatechinu v PBS (skupina E) nebylo dosaženo žádného cytotoxického efektu. Totéž platí i pro skupinu F, v níž na nádorové buňky s ukotveným mananem působily primované neutrofilů zkombinované s 0,05 mM epicatechinem v PBS. 0,2 mM epicatechin v PBS (skupina G) zničil 4,3% nádorových buněk. Kombinací epicatechinu o téže koncentraci s primovanými neutrofilů působícími na nádorové buňky s navázaným mananem došlo k inhibici cytotoxicity odpovídající 56%.



Obr. 25: Cytotoxický účinek primovaných neutrofilů na nádorové buňky s navázaným mananem a jeho ovlivnění epicatechinem o poloviční a dvojnásobné koncentraci.

A – B16-F10, B – B16-F10 + manan-BAM, C – B16-F10 + primované neutrofilly, D – B16-F10 + manan-BAM + primované neutrofilly, E – B16-F10 + 0,05 mM epicatechin v PBS, F – B16-F10 + manan-BAM + primované neutrofilly + 0,05 mM epicatechin v PBS, G – B16-F10 + 0,2 mM epicatechin v PBS, H - B16-F10 + manan-BAM + primované neutrofilly + 0,2 mM epicatechin v PBS.

\*  $P \leq 0,01$  v porovnání s B16-F10 (A)

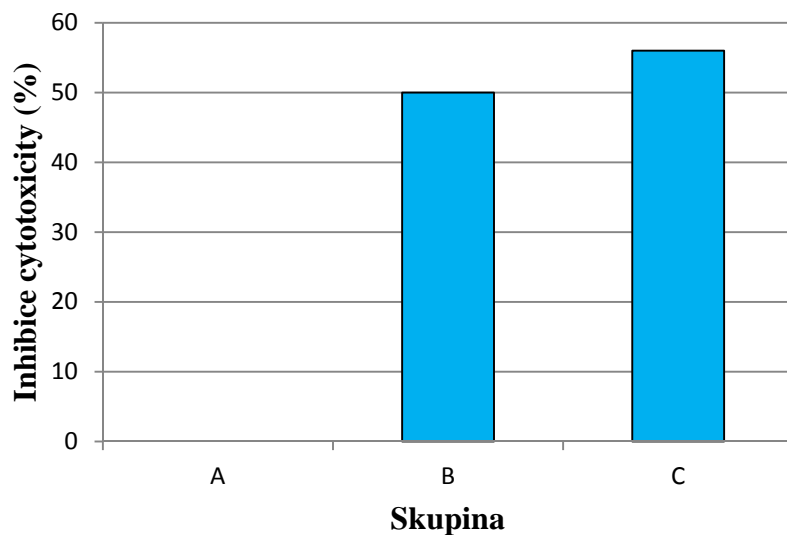
o  $P \leq 0,005$  v porovnání s B16-F10 + 0,05 mM epicatechin v PBS (E)

+  $P \leq 0,01$  v porovnání s B16-F10 + manan-BAM + primované neutrofilly + 0,05 mM epicatechin v PBS (F)

x  $P \leq 0,05$  v porovnání s B16-F10 + 0,2 mM epicatechin v PBS (G)

Obrázek 26 je souhrnným grafem experimentů 5.2.1 a 5.2.3. Říká nám, kolikaprocentní inhibice cytotoxicity primovaných neutrofilů na nádorové buňky s navázaným mananem bylo dosaženo přidáním epicatechinu o různých koncentracích. Vyplývá z něj, že 0,05 mM epicatechin v PBS nezpůsobil žádnou inhibici cytotoxického

účinku primovaných neutrofilů na nádorové buňky s vázaným mananem. U 0,1 mM epicatechinu v PBS byla inhibice cytotoxicity rovna 50% a 0,2 mM epicatechin v PBS inhiboval cytotoxicitu primovaných neutrofilů na nádorové buňky s vázaným mananem o 56%.



Obr. 26: **Inhibice cytotoxicity primovaných neutrofilů na nádorové buňky s vázaným mananem v závislosti na koncentraci epicatechinu.**

**A** - B16-F10 + manan-BAM + primované neutrofilily + 0,05 mM epicatechin v PBS, **B** – B16-F10 + manan-BAM + primované neutrofilily + 0,1 mM epicatechin v PBS, **C** - B16-F10 + manan-BAM + primované neutrofilily + 0,2 mM epicatechin v PBS.

## 6. Diskuse

Tato práce navazuje na řadu jiných diplomových prací provedených na Katedře medicínské biologie a zaměřených na nádorovou imunoterapii s využitím vrozené imunity. Klade si za cíl přispět k řešení otázek souvisejících s návrhem účinné nádorové imunoterapie použitelné v humánní medicíně a k objasnění probíhajících mechanismů.

**První pokus** byl proveden v návaznosti na experimenty kolegyně Čunátové (Čunátová 2012) Vácové (Vácová 2013) a Caisové (Caisová 2014). Předmětem jejich studia byl vliv použití agonistů formylpeptidových receptorů na průběh imunoterapie maligního melanomu. Ze všech zmiňovaných prací lze vyvodit závěry, které byly shrnuty v publikaci Janotové a kolektivu (Janotová a kol. 2014). Prvním z nich je fakt, že k vyvolání protinádorové imunitní odpovědi použitím f-MLF motivů je nutné tyto sloučeniny buď na nádorové buňky navázat, nebo ukotvit do jejich membrány. Toto zjištění odpovídá dřívějším poznatkům Underhilla a Gantnera (Underhill a Gantner 2004), podle nichž je k aktivaci všech fagocytárních receptorů, mezi něž jsou FPR řazeny, vyžadována přítomnost jejich agonistů ve vázané formě a pro silnou imunitní odpověď je vhodná současná přítomnost agonistů signálních receptorů. Za druhé se práce shodují v tom, že mohutného zesílení imunitní odpovědi vyvolané agonisty FPR bylo dosaženo kombinací těchto ligandů s LPS. Jedním z důvodů synergického působení obou látek může být i fakt, že aplikací LPS dochází ke stimulaci exprese makrofágových a neutrofilních FPR1 (Mandal a kol. 2005).

Pro účely tohoto experimentu byl syntetizován peptid f-MLFG<sub>5</sub>K<sub>8</sub>(K(STE))(K(STE))-NH<sub>2</sub>. Tento pokus probíhal souběžně s experimentem Husníkové (Husníková 2014) a jeho cílem bylo získání odpovědí na tři otázky.

Prvním předmětem zájmu byl nový způsob kotvení f-MLF motivu do membrány nádorových buněk. V již zmiňovaných dřívějších experimentech byl ke kotvení používán diolelylfosfatidylethanolamin (dále DOPE) nebo BAM. Společným znakem obou těchto sloučenin jsou hydrofobní olejové skupiny, jedna v případě BAM a dvě v případě DOPE, vyznačující se schopností ukotvit se do cytoplasmatické membrány. Z důvodu chemické podobnosti kyseliny olejové s kyselinou stearovou a faktu, že obecně jsou pro kotvení lepší dva hydrofobní řetězce než jeden, se vhodným způsobem kotvení f-MLF motivu do membrány nádorových buněk zdály být alifatické řetězce kyseliny stearové, dva v případě peptidu f-MLFG<sub>5</sub>K<sub>8</sub>(K(STE))(K(STE))-NH<sub>2</sub>. Tento způsob kotvení terapeutik však selhal. Pravděpodobným vysvětlením se zdá být možnost dimerizace molekul f-

MLFG<sub>5</sub>K<sub>8</sub>(K(STE))(K(STE))-NH<sub>2</sub>, konkrétně jejich alifatických řetězců, znemožňující ukotvení terapeutické látky do membrány nádorových buněk. Dalším neméně pravděpodobným důvodem neúspěchu by mohla být možnost, že molekuly zaujaly v prostoru nevhodnou konformaci, čímž jim byl buď znemožněn přístup k FPR, či možnost ukotvení se do membrány nádorových buněk.

Druhým předmětem studia v tomto pokusu bylo srovnání vlivu LPS s vlivem LTA (TLR2 agonista) na průběh terapie maligního melanomu, tedy zjištění, do jaké míry je LTA vhodná jako náhrada LPS. Bylo prokázáno, že LTA není dostatečnou náhradou LPS, a tudíž bylo od jejího dalšího testování v následujících experimentech opuštěno.

Třetí otázkou bylo sledování případného synergického působení peptidu f-MLFG<sub>5</sub>K<sub>8</sub>(K(STE))(K(STE))-NH<sub>2</sub> s LPS, který byl rovněž nahrazen LTA. Synergické působení nebylo pozorováno nejen u směsi f-MLF peptidu s LTA, ale ani u jeho kombinace s LPS. Tato kombinace dokonce účinek LPS zeslabovala. Důvodem by mohla být případná interakce alifatických řetězců kyseliny stearové v peptidu f-MLFG<sub>5</sub>K<sub>8</sub>(K(STE))(K(STE))-NH<sub>2</sub> se šesti aminokyselinovými řetězci LPS, mající za následek zablokování prozánětlivého působení LPS. Celkově se tedy ukazuje, že použití kotvených ligandů vyžaduje nejen řešení otázek jejich interakce s buňkami, ale i jejich vzájemné interakce.

Co se týče výskytu metastáz, jejich eliminace s největší pravděpodobností souvisí s podáním LPS či LTA. Peptid f-MLFG<sub>5</sub>K<sub>8</sub>(K(STE))(K(STE))-NH<sub>2</sub> nemá na jejich prevalenci žádný vliv.

**Druhý pokus**, mající charakter předběžného screeningu, vychází z pokusů kolegyně Bruzlové (Bruzlová 2012), Maierové (Maierová 2013) a Waldmannové (Waldmannová 2014) a byl proveden za účelem poskytnutí odpovědi na otázku, zda by LPS ve směsi s mananem-BAM mohl být nahrazen R848, agonistou lidského TLR7 a 8. Experiment jde ruku v ruce se snahou celého našeho týmu, jehož cílem je najít vhodné náhrady LPS, jež by byly na rozdíl od něj použitelné v humánní medicíně.

Kolegyně dospěly k závěru, že i manan, jenž je agonistou MBL patřícího do skupiny sekretovaných PRRs, musí být do membrány nádorových buněk ukotven, aby došlo k aktivaci komplementu vedoucí k degradaci jím označené buňky. Toto zjištění je opět v souladu s poznatky o vhodnosti kotvení ligandů a jejich synergii (Underhill a Gantner 2004). Dále z jejich prací plyne, že mohutného synergického působení bylo dosaženo kombinací mananu-BAM s LPS. Oba tyto závěry byly shrnuty v práci Janotové a kolektivu

(Janotová a kol. 2014). Pramení z nich i má snaha o použití R848 místo LPS v kombinaci s mananem-BAM a určení míry vhodnosti tohoto použití.

Z výsledku jasně plyne, že největší průměrné redukce nádorového růstu rovnající se 88% bylo dosaženo kombinací mananu-BAM s LPS. Z porovnání s průměrnou redukcí nádorového růstu způsobenou směsí mananu-BAM s R848 a rovnající se 69,5% se R848 jeví jako účinná a dále použitelná náhrada LPS v této směsi. Z důvodu, že se jednalo o předběžný pokus, léčené skupiny neobsahovaly dostatečné množství experimentálních zvířat, aby bylo dosaženo statistické významnosti. Pozitivní výsledek však byl motivací pro provedení podobného experimentu na větším souboru experimentálních zvířat.

**Třetí experiment** plynule navazuje na druhý. Větší množství experimentálních zvířat ve skupinách mění jeho charakter z předběžného na plnohodnotný. Důvodem jeho provedení je potvrzení či vyvrácení výsledku předchozího screeningu, jímž je vhodnost použití R848 jako náhrady LPS ve směsi s mananem-BAM.

Z grafu s průměrnými objemy nádorů je patrné, že největší a statisticky významná redukce nádorového růstu byla v souladu s předpoklady pozorována u skupiny léčené kombinací mananu-BAM s R848. Činila 62,7%, což je méně v porovnání s redukcí nádorového růstu vyvolanou kombinací mananu-BAM s LPS, které ve svých pokusech dosáhla Maierová (Maierová 2013) a Janotová a kolektiv (Janotová a kol. 2014). Ani vliv R848 v kombinaci s mananem-BAM na prodloužení doby přežití experimentálních zvířat nebyl statisticky významný, což se ani z daleka nevyrovná výsledkům Maierové (Maierová 2013) dosáhnoucí uzdravení 80% myši léčených kombinací mananu-BAM s LPS. Ze všech doposud testovaných náhrad LPS však právě R848 vykazoval nejlepší výsledky, a proto byl používán i v dalších experimentech.

Účelem **čtvrtého pokusu** bylo otestovat vhodnost použití kovalentně kotvených bakterií *Listeria monocytogenes* pro léčbu melanomu B16-F10. Bakterie měly nahrazovat LPS v jeho kombinaci s kovalentně kotveným mananem. Předmětem zájmu byla též případná synergie obou terapeutických látek.

Experiment vychází z dávné snahy o použití bakterií v terapii nádorových onemocnění pramenící již v 19. století (Coley 1891). Použitím proslulého Coleyho toxinu obsahujícího směs kultur bakterií *Streptococcus pyogenes* a *Serratia marcescens* bylo dosaženo skvělých výsledků v imunoterapii inoperabilních typů sarkomu (Coley 1891, McCarthy 2006). Ačkoliv vhodnost a účinnost použití Coleyho toxinu byla předmětem



mnoha sporů vedoucích k zákazu jeho dalšího používání, zdá se, že bakterie jsou všeobecně vhodnými komplexními soubory ligandů signálních i fagocytárních receptorů i antigenů, takže by se dalo předpokládat, že jejich použitím dojde k mohutné aktivaci mechanismů imunitního systému. *Listeria monocytogenes* byla vybrána, protože je řazena mezi grampozitivní bakterie, a tudíž její stěna neobsahuje LPS (Farber a Peterkin 1991). Interakce bakteriálních ligandů s TLR2 vede k sekreci prozánětlivých cytokinů, jako například TNF a IL-12, a chemokinů, což vyústí v aktivaci buněk imunitního systému (Torres a kol. 2004). Bakterie v Coleyho toxinu byly použity ve volné formě, otázka je však nasnadě – nebylo by výhodnější je nějakým způsobem ukotvit? Experimenty mých kolegyň poukazují na vhodnost ukotvení nejen ligandů fagocytárních, ale i signálních receptorů, a proto byly bakterie *Listeria monocytogenes* testovány ve volné i vázané formě. Dalším předmětem zájmu byla možnost synergického působení bakterií *Listeria monocytogenes* s mananem-SMCC, jehož výrazný a významný protinádorový účinek v kombinaci s LPS ve své práci popsala Maierová (Maierová 2013).

Z výsledků jasně plyne, že volná *Listeria monocytogenes* nepůsobí významnou redukci nádorového růstu. Totéž bylo překvapivě pozorováno i u kovalentně kotvených bakterií. Nejpravděpodobnějším vysvětlením pozorovaného jevu se zdá možnost, že samotné bakterie nejsou dostatečným stimulem pro imunitní systém, jenž tak nemůže nádorové buňky destruovat. Zde se nabízí porovnání s bakteriemi *Mycobacterium tuberculosis*, které byly rovněž testovány jako náhrada LPS v jeho kombinaci s mananem-SMCC. Z tohoto srovnání vyplývá, že ukotví-li se tyto bakterie do membrány nádorových buněk, dojde na rozdíl od kovalentně kotvených bakterií *Listeria monocytogenes* ke statisticky významné redukci nádorového růstu (Ženka, ústní sdělení, Jačková, in prep.). K tomu dochází asi proto, že *Mycobacterium tuberculosis* je samo o sobě nejen signálním, ale i fagocytárním ligandem (agonista komplementového receptoru 3), a tak způsobuje dostatečnou stimulaci imunitního systému.

Zkombinováním kovalentně kotvených bakterií s mananem ukotveným stejným způsobem bylo dosaženo výrazné a statisticky významné průměrné redukce nádorového růstu odpovídající 76,7%. Tento výsledek jde opět ruku v ruce s poznatkami o vhodnosti kotvení ligandů a jejich synergii (Underhill a Gantner 2004). Aplikace tohoto terapeutika vyústila ve vyléčení jednoho experimentálního zvířete (16,7%), ale nezpůsobovala statisticky významné prodloužení doby přežití.

**Pátý experiment** vychází z výsledků předcházejících dvou pokusů. Jak již bylo řečeno, směs vázaného mananu s R848 statisticky významně redukuje nádorový růst a totéž bylo prokázáno i o kombinaci kovalentně kotveného mananu s bakteriemi *Listeria monocytogenes* kotvenými tímto způsobem. Účelem tohoto experimentu bylo prokázat, jaký vliv na imunoterapii melanomu B16-F10 bude mít přidání kovalentně kotvených bakterií *Listeria monocytogenes* ke směsi mananu-SMCC s R848.HCl. K použití hydrochloridu namísto bazického R848 bylo přistoupeno z důvodu jeho snazší rozpustnosti v PBS a lepší účinnosti, kterou ve své práci popisuje Glaserová (Glaserová, in prep.).

Výsledný graf průměrných objemů nádorů ukazuje na srovnatelné účinky obou způsobů terapie, tedy prvním založeném na kombinaci mananu-SMCC s R848.HCl a druhém, v němž jsou ke směsi navíc přidány bakterie *Listeria monocytogenes*. Lze tedy říci, že samotný R848 je dostatečným impulzem pro vyvolání zánětlivé reakce. Přidáním dalšího signálu, bakterií *Listeria monocytogenes*, nebylo už dosaženo lepšího účinku než v případě samotného R848. Z toho plyne, že co se týče průměrné redukce nádorového růstu, nemá přidání kovalentně kotvených bakterií *Listeria monocytogenes* ke směsi mananu-SMCC s R848.HCl už smysl.

Srovnatelný efekt obou způsobů terapie byl pozorován i v třicetidenním režimu sledování. Byl však zaznamenán zajímavý jev, který odlišuje vliv použití R848 od LPS na průběh terapie. V tomto experimentu byl účinek terapie oběma studovanými způsoby postupný, nádory se kontinuálně zmenšovaly. K uzdravení experimentálních zvířat došlo až po ukončení terapie, kdežto pokud byl pro imunoterapii používán LPS v kombinaci s jakýmkoli jinými ligandy a došlo k uzdravení zvířete, muselo se tak stát v průběhu prvního pulzu terapie, tedy v rozmezí od zahájení experimentu do jeho druhého až čtvrtého dne, později už nikdy k uzdravení zvířete nedošlo (Janotová a kol. 2014, Maierová 2013 atd.). Tento jev může být spojován s již popsanou tolerancí LPS, jež byla navozena jeho opakovanou aplikací (Lehner a kol. 2001, Biswas a Lopez-Collazo 2009). Faktem však je, že zmiňovaná tolerance byla popsána i vůči R848 (Poovassery a kol. 2009). Experimentálně však bylo v našem týmu zjištěno, že aplikací R848 v pulzním režimu s pětidenními pauzami v podávání léčiv dojde ke zrušení tolerance, což odpovídá i literárním údajům (Bourquin a kol. 2011). U terapeutik založených na použití LPS byla jejich pulzní aplikace rovněž účinnější než pravidelná, avšak nevedla k úplnému vyléčení většího množství experimentálních zvířat. Z tohoto důvodu se pětidenní přestávka zdá být nedostatečná pro zrušení tolerance LPS.

Význam přidání bakterií *Listeria monocytogenes* k terapeutické směsi sestávající z mananu-SMCC a R848.HCl byl spatřen až v ovlivnění doby přežití léčených jedinců. Ve skupině, jíž bylo podáváno terapeutikum s bakteriemi, došlo ke statisticky významnému prodloužení doby přežití a uzdravení pěti ze šesti myší, což činí 83,3%. V případě skupiny léčené touže kombinací terapeutických látek vyjma bakterií přežily hranici sta dní jen dvě experimentální zvířata, což nebylo v porovnání s kontrolními jedinci statisticky významné. S největší pravděpodobností tomu tak bylo z toho důvodu, že R848 je agonistou TLR 7 a 8 u člověka a TLR 7 u myší (Miller a kol. 2008), kdežto bakterie *Listeria monocytogenes* nabídly imunitnímu systému komplexnější a širší škálu ligandů. Důsledkem bylo dosažení lepší signalizace imunitnímu systému. Dalším pravděpodobným předpokladem je možnost zapojení získané imunity tvorbou protilátek. Bakterie totiž vyvolávají silné záněty, dochází k prezentaci jejich antigenů makrofágům, dendritickým buňkám a neutrofilům. Následně vznikají protilátky a dochází k imunizaci hostitele.

Retransplantace nádorových buněk proběhnuvší stý dvacátý den experimentu bude z důvodu úzké souvislosti a propojenosti výsledků diskutována společně s výsledky následujícího experimentu.

**Šestý experiment** byl proveden v návaznosti na pátý. Zkoumá vliv přidání kovalentně kotvených bakterií *Listeria monocytogenes* ke směsi mananu kotveného tímtéž způsobem s R848.HCl a poly I:C, jejíž protinádorový účinek ve své práci testovala kolegyně Glaserová (Glaserová, in prep.).

Co se týče vlivu terapie na průměrnou redukci nádorového růstu ve čtrnácti i třicetidenním režimu, závěr týkající se vlivu přidání bakterií ke zmiňované terapeutické směsi i pravděpodobné vysvětlení pozorovaného jevu jsou totožné s předešlým experimentem.

Budeme-li hovořit o době přežití, přidání bakterií *Listeria monocytogenes* k terapeutické směsi ji opět ovlivnilo pozitivním způsobem a bylo dosaženo statistické významnosti. V tomto případě hranici sta dní přežilo pět ze šesti (83,3%) zvířat léčených bakteriemi v kombinaci s mananem-SMCC, R848.HCl a poly I:C a jedno ze šesti, jímž byla aplikována tatáž směs vyjma bakterií. Pravděpodobné vysvětlení je opět ve shodě se závěry předcházejícího experimentu.

Jelikož bylo dosaženo úctyhodného a ojedinělého výsledku, jímž je uzdravení sedmi myší z minulého a šesti myší ze současného pokusu, byly jim stý dvacátý den terapie opětovně transplantovány buňky melanomu B16-F10. Z předešlého pokusu se uzdravilo 5

experimentálních zvířat léčených směsí bakterií *Listeria monocytogenes* s mananem-SMCC a R848.HCl a 2 zvířata, jímž byla podávána tatáž směs bez bakterií. Po retransplantaci se nádory vyvinuly u jedné z pěti v případě první skupiny a dvou ze dvou uzdravených zvířat z druhé skupiny. V tomto experimentu, kde byl zkoumán vliv přidání kovalentně kotvených bakterií *Listeria monocytogenes* ke směsi mananu-SMCC s R848.HCl a poly I:C, však nevznikl nádor ani u jednoho z vyléčených zvířat. Zdá se, že právě poly I:C, jehož přidání do terapeutické směsi je zkoumáno a podrobně diskutováno v práci kolegyně Glaserové (Glaserová, in prep.), je zodpovědno za odolnost vůči recidivám. Obdobných výsledků ve svých experimentech dosáhla i kolegyně Jačková (Jačková, in prep.).

Účelem **sedmého experimentu** byla in vivo analýza terapeutického efektu směsi mananu-BAM a R848.HCl a pokus o inhibiční určení podílu oxidativního vzplanutí pomocí inhibice těchto procesů epicatechinem. V protikladu s očekáváními bylo zjištěno, že přidáním epicatechinu nedojde ke snížení pětáosmdesátiprocentního protinádorového účinku terapeutické směsi, ba naopak, redukce nádorového růstu je ještě o málo výraznější. S největší pravděpodobností došlo k tomu, že nízkomolekulární a dobře rozpustný epicatechin rychle difundoval z místa účinku a v řádu minut se vyplavil z místa nádoru, tudíž nebyl jeho efekt pozorován. Jelikož inhibiční studie úlohy oxidativního vzplanutí u tohoto druhu terapie se ukázala jako nepoužitelná, rozhodli jsme se otázku role oxidativního vzplanutí při interakci neutrofilů s melanomovými buňkami s navázaným mananem studovat in vitro.

**Poslední tři experimenty** budou z důvodu úzkých souvislostí diskutovány společně. Jejich výchozím bodem je práce kolegyně Kovářové (Kovářová, in prep.), která popisuje cytotoxický účinek primovaných neutrofilů na nádorové buňky s navázaným mananem. Z jejích výsledků vyplývá, že tento cytotoxický vliv vede k likvidaci přibližně jedné poloviny nádorových buněk během dvou hodin.

Účelem cytotoxických testů provedených v této práci bylo přispět k objasnění mechanismů, jimiž dochází k neutrofilnímu ataku na nádorové buňky. Zablokováním oxidativního vzplanutí pomocí epicatechinu bylo zjišťováno, do jaké míry je právě oxidativní vzplanutí neutrofilní smrtící zbraní použitou v boji s nádorovými buňkami.

Z výsledného grafu prvního cytotoxického testu lze vyčíst, že primované neutrofilny zničily 50% nádorových buněk s vázaným mananem a přidání epicatechinu vedlo k 50% inhibici této cytotoxicity.

Pro druhý cytotoxický test byly pro zpřesnění měření použity dvojnásobné koncentrace nádorových buněk a primovaných neutrofilů. Výsledky experimentu odpovídají výsledkům předešlého cytotoxického testu, tedy primované neutrofilly destrukovaly 58% buněk melanomu B16-F10 s navázaným mananem a přidáním epicatechinu došlo k 52,2% inhibici této cytotoxicity. Velký cytotoxický účinek samotného epicatechinu však znemožňuje interpretaci tohoto experimentu, a proto bylo ve třetím cytotoxickém testu přistoupeno k návratu k výchozím koncentracím nádorových buněk a primovaných neutrofilů.

Třetí cytotoxický test určuje vliv poloviční a dvojnásobné koncentrace epicatechinu na cytotoxický účinek primovaných neutrofilů na nádorové buňky s navázaným mananem. Vyplývá z něj, že 0,05 mM koncentrace epicatechinu není pro účinnou inhibici dostatečná. Dále bylo zjištěno, že 0,2 mM epicatechin způsobuje 56% inhibici cytotoxicity.

Závěrem lze tedy říci, že 0,05 mM koncentrace epicatechinu je pro účinnou inhibici cytotoxicity primovaných neutrofilů vůči nádorovým buňkám s vázaným mananem nedostatečná, avšak s rostoucí koncentrací epicatechinu se jeho inhibiční aktivita zvětšuje.

Tato práce přispěla k vyřešení několika otázek, jež byly v našem týmu kladeny. Nelze ji brát jako práci samostatnou, v mnohém navazuje na práce předešlé, v mnohém je doplňuje. V neposlední řadě poskytuje celou řadu další inspirace, která bude motivací pro další členy našeho týmu.

## 7. Souhrn

- Použitím fagocytárního motivu f-MLFG<sub>5</sub>K<sub>8</sub>(K(STE))(K(STE))-NH<sub>2</sub> nebylo dosaženo očekávaného protinádorového účinku. Kýžený efekt nebyl zaznamenán ani u jeho kombinace s LTA a LPS, zástupců agonistů Toll-like receptorů.
- Předběžný screening i následné detailnější testování potvrdily vhodnost použití R848 v synergické kombinaci s mananem kotveným na nádorové buňky pro nádorovou imunoterapii s možností použití v humánní medicíně.
- Přidání bakterií *Listeria monocytogenes* k terapeutické směsi R848 s kotveným mananem vede k statisticky významnému prodloužení doby přežití experimentálních zvířat. Bylo dosaženo 83,3% vyléčení a získání odolnosti proti recidivám.
- Z cytotoxických testů vyplývá, že přidání epicatechinu o vhodné koncentraci k primovaným neutrofilům a nádorovým buňkám s kotveným mananem dojde ke snížení cytotoxického účinku neutrofilů vůči buňkám melanomovým. Tento jev, svědčící o významu oxidativního vzplanutí neutrofilů v zabíjení nádorových buněk, však nebyl pozorován při pokusech in vivo.

## 8. Seznam zkratek

- **ADCC** – buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách (z anglického antibody dependent cellular cytotoxicity)
- **APC** – antigen prezentující buňka (z anglického antigen presenting cell)
- **BAM** – biokompatibilní membránová kotva (z anglického biocompatible anchor for cell membrane)
- **CRP** – C-reaktivní protein
- **DOPE** – diolelylfosfatidylethanolamin
- **EDTA** – kyselina etylendiamintetraoctová
- **FCS** – fetální bovinní sérum (z anglického fetal calf serum)
- **f-MLF** – formyl-methionyl-leucyl-fenylalanin
- **FPRs** – formylpeptidové receptory
- **GM – CSF** – faktor stimulující vznik kolonií granulocytů a makrofágů – (z anglického granulocyte macrophage colony stimulating factor)
- **Ig** – imunoglobulin
- **IL** – interleukin
- **INF** – interferon
- **LPS** – lipopolysacharid
- **LTA** – lipoteichoová kyselina
- **MAb** – monoklonální protilátka
- **MBL** – lektin vázající manosu (manan)
- **MHC** – hlavní histokompatibilní komplex
- **NK buňky** – přirození zabíječi (z anglického natural killers)
- **NLRs** – NOD-like receptory
- **PAMPs** – molekulové vzory spojené s patogeny (z anglického pathogen associated molecular patterns)
- **PBS** – sterilní pufrovaný fyziologický roztok
- **poly I:C** - polyinosinická-polycytidylická kyselina
- **PRRs** – receptory rozpoznávající molekulové vzory (z anglického pattern recognition receptors)
- **R848** – resiquimod
- **SMCC** – sukcinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyklohexan-1-karboxylát
- **TCEP** – tris(2-karboxyethyl)fosfin

- **TLRs** – Toll-like receptory
- **TNF** – faktor nádorové nekrózy (z anglického tumor necrosis factor)



## 9. Seznam použité literatury

- Abercrombie, M., Ambrose, E. J. (1962) The surface properties of cancer cells: a review. *Cancer Research* 22:525–548.
- Akira, S., Uematsu, S., Takeuchi, O. (2006) Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124(4):783-801.
- Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R., Flavell, R. A. (2001) Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 413(6857):732-738.
- Appelberg, R. (2007) Neutrophils and intracellular pathogens: beyond phagocytosis killing. *Trends in Microbiology* 15(2)87-92.
- Barton, G. M., Medzhitov, R. (2003) Toll-like receptor signaling pathways. *Science* 300(5625):1524-1525.
- Becker, E. L., Forouhar, F. A., Grunnet, M. L., Boulay, F., Tardif, M., Bormann, B. J., Sodja, D., Ye, R. D., Woska, J. R., Murphy, P. M. (1998) Broad immunocytochemical localization of the formylpeptide receptor in human organs, tissues, and cells. *Cell and Tissue Research* 292(1):129-135.
- Belardelli, F., Ferrantini, M., Proietti, E., Kirkwood, J. M. (2002) Interferon-alpha in tumor immunity and immunotherapy. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 13(2): 119-134.
- Bianchi, M. E. (2007) DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *Journal of Leukocyte Biology* 81(1):1-5.
- Bieniarz, C., Husain, M., Barnes, G., King, C. A., Welch, C. J. (1996) Extended length heterobifunctional coupling agents for protein conjugations. *Bioconjugate Chemistry* 7(1):88-95.
- Biswas, S. K., Lopez-Collazo, E. (2009) Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends in Immunology* 30(10):475-587.

- Black, S., Kushner, I., Samols, D. (2004) C-reactive protein. *The Journal of Biological Chemistry* 279(47):48487-48490.
- Bourquin, C., Hotz, C., Noerenberg, D., Voelkl, A., Heidegger, S., Roetzer, L. C., Storch, B., Sandholzer, N., Wurzenberger, C., Anz, D., Endres, S. (2011) Systemic cancer therapy with a molecule agonist of Toll-like receptor 7 can be improved by circumventing TLR tolerance. *Cancer Research* 71(15):5123-5133.
- Bowen, S. F., Brady, H., Jones, V. L. (1964) Malignant melanoma of eye occurring in two successive generations. *Archives of Ophthalmology* 71(6):805-806.
- Bruzlová, P. (2012) Ověření možnosti terapie nádorových onemocnění pomocí instalace mananu na povrch nádorových. České Budějovice, bakalářská práce PŘF JU. 38 s.
- Burnet, M. (1957) Cancer – a biological approach. *British Medical Journal* 1(5023):779-786.
- Caisová, V. (2014) Použití agonistů FPR receptorů pro terapii nádorových onemocnění. České Budějovice, diplomová práce PŘF JU. 74 s.
- Cattaneo, F., Parisi, M., Ammendola, R. (2013) Distinct signaling cascades elicited by different formyl peptide receptor 2 (FPR2) agonists. *International Journal of Molecular Sciences* 14(4):7193-7230.
- Chambers, A. F., Groom, A. C., MacDonald, I. C. (2002) Metastasis: Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nature Reviews Cancer* 2(8):563–572.
- Chen, G., Shaw, M. H., Kim, Y. G., Nunez, G. (2008) NOD-like receptors: role in innate immunity and inflammatory disease. *Annual Review of Pathology Mechanisms of Disease* 4:365-398.
- Christiansen, J., Rajasekaran, A. K. (2004) Biological impediments to monoclonal antibody-based cancer immunotherapy. *Molecular Cancer Therapeutics* 3(11):1493-1501.

- Clark, W. H., From, L., Bernardino, E. A., Mihm, M. C. (1969) The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Research* 29:705-726.
- Clos, T. W. D. (2000) Function of C-reactive protein. *Annals of Medicine* 32(4):274-278.
- Coley, W. B. (1891) II. Contribution to the knowledge of sarcoma. *Annals of Surgery* 14(3):199-220.
- Crombie, I. K. (1981) Distribution of malignant melanoma on the body surface. *British Journal of Cancer* 43(6):842-849.
- Cui, Z., Willingham, M. C., Hicks, A. M., Alexander-Miller, M. A., Hawkins, T. G. A., Miller, M. S., Weir, H. M., Du, W., DeLong, C. J. (2003) Spontaneous regression of advanced cancer: Identification of a unique genetically determined, age-dependent trait in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100(11):6682-6687.
- Čunátová, Š. (2012) Ověření možnosti terapie nádorových onemocnění pomocí kotvení formylmethioninu na povrch nádorových buněk. České Budějovice, bakalářská práce PřF JU. 38 s.
- Damsky, W. E., Bosenberg, M. (2010) Mouse melanoma models and cell lines. *Pigment Cell & Melanoma Research* 23(6):853-859.
- Dockrell, D. H., Kinghorn, G. R. (2001) Imiquimod and resiquimod as novel immunomodulators. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 48:751-755.
- Dufton, N., Perretti, M. (2010) therapeutic anti-inflammatory potential of formyl-peptide receptor agonists. *Pharmacology & Therapeutics* 127(2):175-188.
- Engleman, E. G. (2003) Dendritic cell-based cancer immunotherapy. *Seminars in Oncology* 30(8): 23-29.
- Farber, J. M., Peterkin, P. I. (1991) *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiological Reviews* 55:476-511.

- Ferrantini, M., Capone, I., Belardelli, F. (2007) Interferon-alpha and cancer: mechanisms of action and new perspectives of clinical use. *Biochimie* 89(6-7):884-893.
- Fidler, I. J. (1975) Biological behavior of malignant melanoma cells correlated to their survival in vivo. *Cancer Research* 35(1):218-224.
- Fu, H., Karlsson, J., Bylund, J., Movitz, C., Karlsson, A., Dahlgren, C. (2006) Ligand recognition and activation of formyl peptide receptors in neutrophils. *Journal of Leukocyte Biology* 79(2):247-256.
- Fortier, M. E., Kent, S., Ashdown, H., Poole, S., Boksa, P., Luheshi, G. (2004) The viral mimic, polyinosinic:polycytidylic acid, induces fever in rats via an interleukin-1-dependent mechanism. *American Journal of Physiology* 287(4):R759-R766.
- Fortis, C., Foppoli, M., Gianotti, L., Citterio, G., Consogno, G., Gentilini, O., Braga, M. (1996) Increased interleukin-10 serum levels in patients with solid tumours. *Cancer Letters* 104(1):1-5.
- Gadjeva, M., Thiel, S., Jensenius, J. C. (2001) The mannan-binding lectin pathway of the innate immune response. *Current Opinion in Immunology* 13(1):74-78.
- Garbe, C., Eigentler, T. K., Keilholz, U., Kirkwood, J. M. (2011) Systematic review of medical treatment in melanoma: current status and future prospects. *Oncologist* 16(1):5-24.
- Geissmann, F., Manz, M. G., Jung, S., Sieweke, M. H., Merad, M., Ley, K. (2010) Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* 327(5966):656-661.
- Gorden, K. B., Gorski, K. S., Gibson, S. J., Kedl, R. M., Kieper, W. C., Qiu, X., Tomai, M. A., Alkan, S. S., Vasilakos, J. P. (2005) Synthetic TLR agonists reveal functional differences between human TLR7 and TLR8. *Journal of Immunology* 174(3):1259-1268.
- Hajdu, S. I. (2011) A note from history: landmarks in history of cancer, part 2. *Cancer* 117(12):2811-2820.

- Hanahan, D., Weinberg, R. A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100(1): 57–70.
- Hanahan, D., Weinberg, R. A. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144(5):646–674.
- Hart, I. R. (1979) The selection and characterization of an invasive variant of the B16 melanoma. *The American Journal of Pathology* 97(3):587-600.
- Hayashi, R., Miyazaki, M., Osada, S., Kawasaki, H., Fujita, I., Hamasaki, Y., Kodama, H. (2013) A formyl peptide substituted with a conformationally constrained phenylalanine residue evokes a selective immune response in human neutrophils. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 21(3):668-675.
- Hayashi, T., Nakamura, T., Takaoka, A. (2011) Pattern recognition receptors. *Japanese Journal of Clinical Immunology* 34(5):329-345.
- Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Akira, S., Lipford, G., Wagner, H., Bauer, S. (2004) Species-specific recognition of single-stranded RNA via Toll-like receptor 7 and 8. *Science* 303(5663):1526-1529.
- Herberman, R. B., Nunn, M. E., Lavrin, D. H. (1975) Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic acid allogeneic tumors. I. Distribution of reactivity and specificity. *International Journal of Cancer* 16(2):216-229.
- Hoffmann, J. A., Kafatos, F. C., Janeway, C. A., Ezekowitz, R. A. B. (1999) Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 284(5418):1313-1318.
- Hoshino, K., Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Ogawa, T., Takeda, Y., Takeda, K., Akira, S. (1999) Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4) - deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the *Lps* gene product. *The Journal of Immunology* 162(7):3749-3752.
- Husníková, H. (2014) Náhrada LPS v imunoterapii nádorových onemocnění založené na kombinaci agonistů TLR a fagocytárních receptorů a možnosti jejich intraperitoneální aplikace. České Budějovice, diplomová práce PřF JU. 83 s.

- Iwasaki, T., Ishibashi, J., Tanaka, H., Sato, M., Asaoka, A., Taylor, DM., Yamakawa, M. (2009) Selective cancer cell cytotoxicity of enantiomeric 9-mer peptides derived from beetle defensins depends on negatively charged phosphatidylserine on the cell surface. *Peptides* 30(4):660-668.
- Janeway, C. A., Medzhitov, R. (2002) Innate immune recognition. *Annual Reviews of Immunology* 20:197-216.
- Janotová, T., Jalovecká, M., Auerová, M., Švecová, I., Bruzlová, P., Maierová, V., Kumžáková, Z., Čunátová, Š., Vlčková, Z., Caisová, V., Rozsypalová, P., Lukáčová, K., Vácová, N., Wachtlová, M., Salát, J., Lieskovská, J., Kopecký, J., Ženka, J. (2014) The use of anchored agonists of Phagocytic receptors for cancer immunotherapy: B16-F10 murine melanoma model. *PLOS ONE* 9(1):1-14.
- Kato, K., Umezawa, K., Funerilu, D. P., Miyake, M., Nagamune, T. (2003) Immobilized culture of nonadherent cells on an oleyl poly(ethylene glycol) ether-modified surface. *Biotechniques* 35(5):1014-1018.
- Kato, K., Itoh, C., Yasukouchi, T., Nagamune, T. (2004) Rapid protein anchoring into the membranes of mammalian cells using oleyl chain and poly(ethylene glycol) derivatives. *Biotechnology Progress* 20(3):897-904.
- Kilpatrick, D. C. (2002) Mannan-binding lectin: clinical significance and applications. *Biochimica et Biophysica Acta* 1572(2-3):401-413.
- Kim, U., Baumler, A., Carruthers, C., Bielat, K. (1975) Immunological escape mechanisms in spontaneously metastasizing mammary tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 72(3):1012-1016.
- Kirkwood, J. (2002) Cancer immunotherapy: the interferon- $\alpha$  experience. *Seminars in Oncology* 29(3):18-26.
- Kocák, I., Kocáková, I., Špelda, S. (2013) Cílená léčba metastatického melanomu vemurafenibem. *Onkologie, Olomouc: Solen* 7(3):140-143.

- Krausz, M. M., Ariel, I., Behar, A. J. (1978) Primary malignant melanoma of the small intestine and the APUD cell concept. *Journal of Surgical Oncology* 10(4):283-288.
- Kumar, H., Kawai, T., Akira, S. (2011) Pathogen recognition by the innate immune system. *International Reviews of Immunology* 30(1):16-34.
- Le, Y., Murphy, P. M., Wang, J. M. (2002) Formyl-peptide receptors revisited. *Trends in Immunology* 23(11):541-548.
- Lee, W. L., Harrison, R. E., Grinstein, S. (2003) Phagocytosis by neutrophils. *Microbes and Infection* 5:1299-1306.
- Lehner, M. D., Morath, S., Michelsen, K. S., Schumann, R. R., Hartung, T. (2001) Induction of cross-tolerance by lipopolysaccharide and highly purified lipoteichoic acid via different Toll-like receptors independent of paracrine mediators. *The Journal of Immunology* 166(8):5161-5167.
- Liu, Y., Janeway, C. A. (1991) Microbial induction of co-stimulatory activity for CD4 T-cell growth. *International Immunology* 3(4):323-332.
- Liu, Y., Zheng, G. (2012) Cancer and innate immune system interactions: translational potentials for cancer immunotherapy. *Journal of Immunotherapy* 35(4): 299-308.
- Looney, W. B., Ritenour, E. R., Hopkins, H. A. (1980) Changes in Growth Rate of an Experimental Solid Tumor Following Increasing Doses of Cyclophosphamide. *The Journal of Cancer Research* 40:2179-2183.
- Lukešová, Š., Kopecký, O., Dvořák, J., Špriňar, Z., Hlávková, D. (2006) Interferon alfa v léčbě metastazujícího renálního karcinomu. *Interní medicína pro praxi* 10:432-438.
- Maierová, V. (2013) Protinádorová imunoterapie založená na instalaci manózy na povrch nádorových buněk. České Budějovice, diplomová práce PŘF JU. 71 s.

- Mandal, P., Novotny, M., Hamilton, T. A. (2005) Lipopolysaccharide induces formyl peptide receptor 1 gene expression in macrophages and neutrophils via transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *The American Association of Immunologists* 175:6085-6091.
- Marks, R. (2000) Epidemiology of melanoma. *Clinical and Experimental Dermatology* 25(6):459-463.
- Mayer-Scholl, A., Averhoff, P., Zychlinsky, A. (2004) How do neutrophils and pathogens interact? *Current Opinion in Microbiology* 7(1):62-66.
- McCarthy, E. F. (2006) The toxins of William B. Coley and the treatment of bone and soft-tissue sarcomas. *The Iowa Orthopaedic Journal* 26:154-158.
- McKenzie, I. F., Apostolopoulos, V., Plebanski, M., Pietersz, G. A., Loveland, B. E. (2003) Aspects of cancer immunotherapy. *Immunology and Cell Biology* 81(1):79-85.
- Medzhitov, R., Janeway, C. A. (1997) Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 91(3):295-298.
- Medzhitov, R., Janeway, C. A. (1998) Innate immune recognition and control of adaptive immune responses. *Seminars in Immunology* 10(5):351-353.
- Melero, I., Hervas-Stubbs, S., Glennie, M., Pardoll, D. M., Chen, L. (2007) Immunostimulatory monoclonal antibodies for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer* 7:95-106.
- Miller, R. L., Meng, T. C., Tomai, M. A. (2008) The antiviral activity of Toll-like receptor 7 and 7/8 agonists. *Drug News & Perspectives* 21(2):69.
- Mills, K. H. G. (2011) Toll-like receptors – sensors of microbial molecules and danger signals. *Nature Reviews Immunology* 11:807-822.
- Moresco, E. M. Y., LaVine, D., Beutler, B. (2011) Toll-like receptors. *Current Biology* 21(13):R488-R493.



- Mushegian, A., Medzhitov, R. (2001) Evolutionary perspective on innate immune recognition. *Journal of Cell Biology* 155(5):705-710.
- Muzio, M., Mantovani, A. (2000) Toll-like receptors. *Microbes and Infection* 2(3):251-255.
- Nakamura, K., Yoshikawa, N., Yamaguchi, Y., Kagota, S., Shinozuka, K., Kunitomo, M. (2002) Characterization of mouse melanoma cell lines by their mortal malignancy using an experimental metastatic model. *Life Sciences* 70(7):791-798.
- Naradin, A., Abastado, J. P. (2008) Macrophages and cancer. *Frontiers in Bioscience* 13:3493-3505.
- O'Connell, J., Bennett, M. W., O'Sullivan, G. C., O'Callaghan, J. O., Collins, J. K., Shanahan, F. (1999) Expression of Fas (CD95/APO-1) ligand by human breast cancers: significance for tumor immune privilege. *Clinical and Vaccine Immunology* 6(4):457-463.
- Pan, Z. K., Ikonomidis, G., Lazenby, A., Pardoll, D., Paterson, Y. (1995) A recombinant *Listeria monocytogenes* vaccine expressing a model tumour antigen protects mice against lethal tumour cell challenge and causes regression of established tumours. *Nature Medicine* 1:471-477.
- Peiser, L., Mukhopadhyay, S., Gordon, S. (2002) Scavenger receptors in innate immunity. *Current Opinion in Immunology* 14(1):123-128.
- Petersen, S. V., Thiel, S., Jensenius, J. C. (2001) The mannan-binding lectin pathway of complement activation: biology and disease association. *Molecular Immunology* 38(2-3):133-149.
- Pietra, G., Manzini, C., Rivara, S., Vitale, M., Cantoni, C., Petretto, A., Balsamo, M., Conte, R., Benelli, R., Minghelli, S., Solari, N., Gualco, M., Queirolo, P., Moretta, L., Mingari, M. C. (2012) Melanoma cells inhibit natural killer cell function by modulating the expression of activating receptors and cytolytic activity. *The Journal of Cancer Research* 72(6):1407-1415.

- Poovassery, J. S., Vanden Bush, T. J., Bishop, G. A. (2009) Antigen receptor signals rescue B cells from TLR tolerance. *The Journal of Immunology* 183(5):2974-2983.
- Qin, Z., Richter, G., Schüler, T., Ibe, S., Cao, X., Blankenstein, T. (1998) B cells inhibit induction of T cell-dependent tumor immunity. *Nature Medicine* 4:627-630.
- Rabiet, M. J., Macari, L., Dahlgren, C., Boulay, F. (2011) N-formyl peptide receptor 3 (FPR3) departs from the homologous FPR/ALX receptor with regard to the major processes governing chemoattractant receptor regulation, expression at the cell surface, and phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry* 286(30):26718 – 26731.
- Raetz, C. R. H., Whitfield, C. (2002) Lipopolysaccharide endotoxins. *Annual Review of Biochemistry* 71:635-700.
- Rejthar, A., Vojtěšek, B. (2002) *Obecná patologie nádorového růstu*. Praha: Grada Publishing. 206 s.
- Renan, M. J. (1993) How many mutations are required for tumorigenesis? Implications from human cancer data. *Molecular Carcinogenesis* 7(3):139–146.
- Rosenfeld, Y., Papo, N., Shai, Y. (2006) Endotoxin (lipopolysaccharide) neutralization by innate immunity host-defense peptides. *The Journal of Biological Chemistry* 281:1636-1643.
- Schuler, G. (2010) Dendritic cells in cancer immunotherapy. *European Journal of Immunology* 40(8):2123-2130.
- Schuler, G., Schuler-Thurner B., Steinman, R. M. (2003) The use of dendritic cells in cancer immunotherapy. *Current Opinion in Immunology* 15(2):138-147.
- Schwandner, R., Dziarski, R., Wesche, H., Rothe, M., Kirschning, C. J. (1999) Peptidoglycan- and lipoteichoic acid- induced cell activation is mediated by Toll-like receptor 2. *The Journal of Biological Chemistry* 274:17406-17409.
- Sell, S. (2004) Stem cell origin of cancer and differentiation therapy. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 51(1):1-28.

- Seyfried, T., Huysentruyt, L. C. (2013) On the origin of cancer metastasis. *Critical Reviews in oncogenesis* 18(1-2):43–73.
- Sheriff, S., Chang, C. Y., Ezekowitz, R. A. (1996) Human mannose-binding protein carbohydrate recognition domain trimerizes through a triple alpha-helical coiled-coil. *Nature Structural & Molecular Biology* 1(11):789-794.
- Smyth, M. J., Dunn, G. P., Schreiber, R. D. (2006) Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. *Advances in Immunology* 90:1-50.
- Sørensen, C. M., Hansen, T. K., Steffensen, R., Jensenius, J. C., Thiel, S. (2006) Hormonal regulation of mannan-binding lectin synthesis in hepatocytes. *Clinical & Experimental Immunology* 145(1):173-182.
- Stahl, P. D., Ezekowitz, R. A. B. (1998) The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defence. *Current Opinion in Immunology* 10(1):50-55.
- Steeg, P. S., Theodorescu, D. (2008) Metastasis: a therapeutic target for cancer. *Nature Clinical Practice Oncology* 5(4):206-219.
- Stratton, M. R., Campbell, P. J., Futreal, A. (2009) The cancer genome. *Nature* 458:719–724.
- Tada, H., Nemoto, E., Shimauchi, H., Watanabe, T., Mikami, T., Matsumoto, T., Ohno, N., Tamura, H., Shibata, K., Akashi, S., Miyake, K., Sugawara, S., Takada, H. (2002) *Saccharomyces cerevisiae*- and *Candida albicans*- derived mannan induced production of tumor necrosis factor alpha by human monocytes in a CD14- and Toll-like receptor4-dependent manner. *Microbiology and Immunology* 46(7):503-512.
- Takeuchi, O., Akira, S. (2010) Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140(6):805-820.

- Torosantucci, A., Bromuro, C., Chiani, P., De Bernardis, F., Berti, F., Galli, C., Norelli, F., Bellucci, C., Polonelli, L., Constantino, P., Rappuoli, R., Cassone, A (2005) A novel glycol-conjugate vaccine against fungal pathogens. *Journal of Experimental medicine* 202(5):597-606.
- Torres, D., Barrier, M., Bihl, F., Quesniaux V. J., Maillet, I., Akira, S., Ryffel, B., Erard, F. (2004) Toll-like receptor 2 is required for optimal control of *Listeria monocytogenes* infection. *Infection and Immunology* 72(4):2131-2139.
- Trincheri, G. (1989) Biology of natural killer cells. *Advances in Immunology* 47:187-376.
- Tuong, W., Cheng, L. S., Armstrong, A. W. (2012) Melanoma: epidemiology, diagnosis, treatment and outcomes 30(1):113-124.
- Turner, M. W. (1996) Mannose-binding lectin: the pluripotent molecule of the innate immune system. *Immunology Today* 17(11):532-540.
- Turvey, S. E., Phil, D., Broide, D. H. (2010) Innate immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 125(2):S24-S32.
- Uematsu, S., Akira, S. (2006) Toll-like receptors and innate immunity. *Journal of Molecular Medicine* 84:712-725.
- Underhill, D. M., Gantner, B. (2004) Integration of Toll-like receptors and phagocytic signaling for tailor immunity. *Microbes and Infection* 6:1368–1374.
- Vácová, N. (2013) Studium možnosti použití formylmethioninových peptidů v protinádorové terapii. České Budějovice, bakalářská práce PřF JU. 54 s.
- Waldmannová, E. (2014) Terapie nádorových onemocnění pomocí kotvených agonistů fagocytárních receptorů. Studium mechanismů pomocí imunodeficientních myší. České Budějovice, diplomová práce PřF JU. 81 s.
- Wallecha, A., Maciag, P. C., Rivera, S., Paterson, Y., Shahabi, V. (2009) Construction and characterization of an attenuated *Listeria monocytogenes* strain for clinical use in cancer immunotherapy. *Clinical and Vaccine Immunology* 16(1):96-103.

- Weiner, L. M., Dhodapkar, M. V., Ferrone, S. (2009) Monoclonal antibodies for cancer immunotherapy. *The Lancet* 373(9668):1033-1040.
- Weiner, L. M., Surana, R., Wang, S. (2010) Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. *Nature Reviews Immunology* 10:317-327.
- Wu, P., Hoglebe, P., Grainer, D. W. (2006) DNA and protein microarray printing on silicon nitride waveguide surfaces. *Biosensors and Bioelectronics* 21(7):1252-1263.
- Yamaguchi, S., Gray, J. D., Hashimoto, S., Horwitz, D. A. (2001) A role for TGF- $\beta$  in the generation and expansion of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells from human peripheral blood. *Journal of Immunology* 166(12):7282-7289.
- Zarembek, K. A., Godowski, P. J. (2002) Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *The Journal of Immunology* 168(2):554-561.
- Zhou, Y., Guo, M., Wang, X., Li, J., Wang, Y., Ye, L., Dai, M., Zhou, L., Persidsky, Y., Ho, W. (2013) TLR3 activation efficiency by high or low molecular mass poly I:C. *Journal of Innate Immunity* 19(2):184-192.