

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**  
**Přírodovědecká fakulta**



**Studium terapie melanomu B16-F10 pomocí**  
**aplikace LPS**

Bakalářská práce

**Simona Glaserová**

Školitel: RNDr. Jan Ženka, CSc.

České Budějovice 2012

Glaserová, S., 2012: Studium terapie melanomu B16-F10 pomocí aplikace LPS.  
[Study of melanoma B16-F10 therapy based on LPS application. Bc. Thesis, in Czech.] – 46 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace: The purpose of this study was to evaluate the influence of lipopolysaccharide on tumour growth and metastases formation. We studied toxicity and the effect of different concentrations of lipopolysaccharide on tumour growth and toxicity in both *in vitro* and *in vivo* experiments.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou 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 bakalářské 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, 25. 4. 2012

.....  
Simona Glaserová

## **Poděkování**

Na tomto místě bych chtěla poděkovat zejména svému školiteli RNDr. Janu Ženkovi, CSc., za vedení diplomové práce, jeho ochotu, trpělivost a cenné rady nejen při zpracování bakalářské práce, dále za množství znalostí, které nám předal v dosavadním průběhu studia a jeho organizaci práce v průběhu našeho bádání. Poděkování patří také kolektivu oddělení imunologie parazitů Parazitologického ústavu AV ČR v Českých Budějovicích za příjemné pracovní zázemí při vytváření této práce. Na závěr bych chtěla poděkovat mé rodině a příteli za trpělivost, pomoc a podporu v průběhu celého studia.

# Obsah

<b>1</b>	<b>ÚVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1	RAKOVINA .....	1
1.1.1	<i>Kancerogeneze.....</i>	<i>1</i>
1.1.1.1	Fáze kancerogeneze .....	1
1.1.1.2	Genetické a epigenetické změny .....	2
1.1.1.3	Exogenní a endogenní karcinogeny .....	2
1.1.1.3.1	Oxidativní stres a chemoprevence .....	4
1.1.2	<i>Charakteristické znaky nádorových buněk.....</i>	<i>4</i>
1.1.2.1	Nesmrtnost .....	4
1.1.2.2	Trvalé růstové signály .....	5
1.1.2.3	Schopnost obejít inhibující signály – tumor supresorové geny .....	5
1.1.2.4	Odolnost vůči apoptóze.....	6
1.1.2.5	Angiogeneze .....	7
1.1.2.6	Metastázování .....	7
1.1.3	<i>Histogeneze nádorů .....</i>	<i>8</i>
1.2	MELANOM.....	10
1.3	IMUNITA .....	11
1.3.1	<i>Získaná imunita.....</i>	<i>11</i>
1.3.2	<i>Vrozená imunita.....</i>	<i>12</i>
1.3.2.1	Způsoby rozpoznávání vrozenou imunitou .....	13
1.3.2.2	Rozdělení PRRs .....	13
1.3.2.2.1	Endocytární (fagocytární) receptory .....	14
1.3.2.2.2	TLR receptory .....	15
1.3.2.2.3	Scavenger receptory.....	15
1.3.2.2.4	NLR receptory .....	15
1.3.3	<i>Nádorová imunologie.....</i>	<i>16</i>
1.3.3.1	Nádorové antigeny .....	16
1.3.3.2	Buňky vrozené imunity .....	16
1.4	MOŽNOSTI NÁDOROVÉ TERAPIE .....	17
1.5	IMUNOTERAPIE.....	18
1.6	TERAPIE POMOCÍ LPS.....	20
1.6.1	<i>Struktura LPS.....</i>	<i>20</i>
1.6.2	<i>Vazba a rozpoznání LPS imunitním systémem.....</i>	<i>22</i>
1.7	LIPID A A JEHO ANALOGY .....	24
<b>2</b>	<b>CÍLE PRÁCE .....</b>	<b>25</b>
<b>3</b>	<b>MATERIÁL A METODY .....</b>	<b>26</b>
3.1	SEZNAM CHEMIKÁLIÍ.....	26
3.2	EXPERIMENTALNI ZVÍŘATA .....	26
3.3	BUNĚČNÉ LINIE .....	26

3.4	PŘÍPRAVA BUNĚK B16-F10 .....	26
3.5	TRANSPLANTACE MELANOMU .....	26
3.6	MĚŘENÍ VELIKOSTI A TEPLŮT NÁDORŮ.....	27
3.7	POČÍTÁNÍ METASTÁZ.....	27
3.8	PŘÍPRAVA BUNĚK MORČECÍCH LEDVIN (PRIMOKULTURA).....	27
3.9	STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ DAT.....	28
3.10	POKUS Č. 1 – STUDIUM RŮZNÝCH KONCENTRACÍ I.T. APLIKOVANÉHO LPS NA RŮST NÁDORŮ MELANOMU B16-F10 IN VIVO .....	28
3.11	POKUS Č. 2 – IN VITRO STUDIUM VLIVU LPS NA BUŇKY MELANOMU B16-F10 A NA BUŇKY PRIMOKULTURY MORČECÍCH LEDVIN .....	28
3.12	POKUS Č. 3 - IN VIVO STUDIUM VLIVU LPS O NECYTOTOXICKÉ KONCENTRACI NA MELANOM B16-F10.....	29
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY.....</b>	<b>30</b>
4.1	POKUS Č. 1 - STUDIUM RŮZNÝCH KONCENTRACÍ I.T. APLIKOVANÉHO LPS NA RŮST NÁDORŮ MELANOMU B16-F10 IN VIVO .....	30
4.2	POKUS Č. 2 - IN VITRO STUDIUM VLIVU LPS NA BUŇKY MELANOMU B16-F10 A NA BUŇKY PRIMOKULTURY MORČECÍCH LEDVIN .....	34
4.3	POKUS Č. 3 - IN VIVO STUDIUM VLIVU LPS O NECYTOTOXICKÉ KONCENTRACI NA MELANOM B16-F10.....	34
<b>5</b>	<b>DISKUZE.....</b>	<b>38</b>
<b>6</b>	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>39</b>
<b>7</b>	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>40</b>

# 1 ÚVOD

## 1.1 Rakovina

Rakovinu můžeme charakterizovat jako onemocnění, ve kterém skupina abnormálních buněk roste nekontrolovaně bez ohledu na normální pravidla buněčného dělení. Normální buňky neustále přijímají signály, které určují, zda se má buňka dělit, diferencovat nebo zahynout. Nádorové buňky si vyvinuly určitou nezávislost na těchto signálech, zapříčiňující jejich nekontrolovatelný růst a proliferaci (Hejmadi 2010). Rakovina má povahu klonálního onemocnění, začínající mutací v jedné buňce, které se rozvine ve vícestupňový proces přidáním dalších mutací, které jsou zděděny potomstvem této buňky v průběhu dělení (Pelengaris a Khan 2006).

Normální buňka se přemění v buňku nádorovou procesem zvaným transformace, vedoucí k nekontrolovatelnému růstu nádorových buněk s následnou tvorbou nádoru nebo novotvaru (Panno 2005). Termín novotvar znamenající nový růst je užíván zaměnitelně s výrazem nádor, který označuje růst rakovinný (Ruddon 2007).

Lze využít některé znaky k odlišení benigního nádoru od maligního: Maligní nádor se vyznačuje schopností napadat a ničit přilehlou tkáň, benigní nádory rostou expanzivně, nenapadají okolní tkáň a jsou obvykle zapouzdřené, mohou však odtlačovat okolní tkáň a stát se život ohrožující v případě, že tlačí na nervy nebo cévy. Dalším znakem maligních nádoru je metastazování lymfatickou nebo krevní cestou do mízních uzlin a do dalších tkání těla. Oproti tomu benigní nádor zůstává v místě svého vzniku a nemetastazuje. Maligní nádor je méně diferencovaný než původní tkáň. U benigního nádoru se objevuje větší podobnost původní tkáni (Ruddon 2007).

### 1.1.1 Kancerogeneze

#### 1.1.1.1 Fáze kancerogeneze

Kancerogeneze je charakterizována rozdílnými fázemi, iniciace (dny), promoce (několik let), progresse (1-5 let) (Ruso 2007). Při tomto procesu se růst, vývoj, identita a proliferace normálních buněk stávají dysregulovanými a život ohrožujícími (Wu a kol. 2011). Fáze iniciace je ireverzibilní, kdy dochází k počátečnímu zásahu chemickými nebo fyzikálními látkami na úrovni DNA. Oproti tomu promoce, v níž hrají roli epigenetické mechanismy je reverzibilní obvykle pomalý proces, který má za následek hromadění

abnormálně dělících se premaligních buněk. Poslední a ireverzibilní fáze kancerogeneze vede k nádorovému růstu se schopností invazivity a metastazování. Pro přechod premaligní buňky na buňku maligní je vyžadována aktivace protoonkogenů a/nebo inaktivace tumor supresorových genů. Mutace ve skupinách těchto genů způsobují změny v klíčových buněčných procesech souvisejících s buněčným růstem a proliferací (Ruso 2007).

#### ***1.1.1.2 Genetické a epigenetické změny***

Fáze kancerogeneze zahrnují jak genetické tak epigenetické události (Boyd a Barrett 1990). Epigenetickými změnami rozumíme modifikace v rámci genomu děděné v průběhu buněčného dělení, bez změny v DNA sekvenci (Feinberg 2004). Lze je rozdělit do tří různých typů: metylace DNA, modifikace histonů a změny v nekódujících molekulách RNA (Sawan a kol. 2008) Genetické změny souvisí se změnami v sekvenci DNA (Sugimura a Ushijima 2000).

Geny, které hrají významnou roli v rozvoji rakoviny, můžeme rozdělit na onkogeny a tumor supresorové geny. Onkogeny patří mezi regulační geny, jejichž aktivita je abnormálně zvýšena po genetické modifikaci. Pro odlišení této změněné formy přítomné v nádorových buňkách je v normálních buňkách tento gen označován jako protoonkogen, Podílejí se na řadě intracelulárních signálních drah regulujících buněčný růst. Vzhledem k dominantnímu způsobu chování, stačí změna pouze jedné ze dvou alel genu pro vyvolání biologického účinku. Tumor supresorové geny kódují proteiny, které se uplatňují při inhibici buněčného růstu. Jako recesivní geny, obě kopie musí být změněny pro viditelný efekt ( Doucas a Berry 2006).

#### ***1.1.1.3 Exogenní a endogenní karcinogeny***

V případě exogenních karcinogenů můžeme rozlišit chemické, fyzikální nebo biologické faktory. Na rozvoji rakoviny se mohou podílet také endogenní procesy a to jak samotné nebo v reakci na exogenní karcinogeny. Přehled těchto karcinogenů společně s příklady uvádí Tabulka 1 (Schulz 2005).

**Tabulka 1:** Druhy a příklady lidských karcinogenů (Schulz 2005).

<i>Type of carcinogen</i>	<i>Examples</i>
Chemical carcinogens	Nickel, cadmium, arsenic, nitrosamines, trichloroethylene, arylamines, benzopyrene, aflatoxins, reactive oxygen species
Physical carcinogens	UV irradiation (specifically UVB), ionizing radiation
Biological carcinogens	Human papilloma virus (e.g. strain 16), Epstein-Barr-Virus, Hepatitis virus B, Helicobacter pylori, <i>Schistosoma mansoni</i>
Endogenous processes	DNA replication, metabolic reactions generating reactive oxygen species, chronic inflammation

Endogenní procesy způsobující vznik rakoviny (Schulz 2005):

- metabolismus produkuje karcinogenní sloučeniny jako např. nitrosaminy, aromatické aminy, chinony, reaktivní aldehydy, reaktivní formy kyslíku - jsou přítomny ochranné a detoxikační mechanismy avšak ne vždy jsou dokonalé
- poškození buněk a DNA se objevuje spontánně zejména v průběhu buněčné proliferace, existují opravné mechanismy namířené na tyto chyby a mimo jiné poškozené buňky jsou pak odstraňovány procesem apoptózy a jinými mechanismy, ani tento opravný mechanismus však nemusí pracovat bez chyb
- dochází k hromadění poškození buněk a DNA s věkem a také ochranné mechanismy se v průběhu života stávají méně účinné - tyto faktory mohou hrát úlohu při výskytu rakoviny s přibývajícím věkem - do jaké míry však není jasné
- větší riziko karcinogeneze nastává v průběhu specifických fází, jako je proliferace tkání nastávající po poškození. Období s vyšší proliferační aktivitou se objevuje také při fetálním vývoji – výskyt chyb v tomto období může vést ke vzniku rakoviny u dětí nebo podpořit rozvoj rakoviny v pozdějším věku.
- patofyziologické stavy mohou hrát také významnou roli při rozvoji nádoru. Zejména chronický zánět je spojován se zvýšeným rizikem vzniku rakoviny v mnoha orgánech. Podílí se několik faktorů, včetně zvýšené produkce reaktivních forem kyslíku zánětlivými buňkami, produkce proteáz, cytokinů a růstových faktorů buňkami tkáně, které napomáhají růstu a šíření nádorů. Regenerace tkání, zejména pokud se jedná o přestavby v důsledku cirhózy jater nebo cystického onemocnění ledvin je obecně považována za faktor způsobující zvýšené riziko vzniku nádoru.



Dalším faktorem, který se v mnoha případech významně podílí na vzniku rakoviny je životní styl, jako je obezita, nedostatek pohybu, špatná životospráva (Hejmadi 2010).

#### **1.1.1.3.1 Oxidativní stres a chemoprevence**

Oxidativní stres je považován za klíčový modulátor v procesu kancerogeneze. Obecně, nerovnováha mezi volnými radikály a antioxidanty je označována jako oxidativní stres, vyznačující se zvýšenou hladinou reaktivních forem kyslíku (ROS) (Ziech a kol. 2012). Metabolickým procesem jsou vytvářeny nízké hladiny reaktivních forem kyslíku, které jsou ve zvýšené míře produkovány v průběhu fyziologických dějů, jako je zánět nebo imunitní obrana. Zvýšená koncentrace může také nastat během metabolismu některých exogenních sloučenin a za některých patofyziologických stavů (Schulz 2005). ROS jednak působí značné poškození makromolekul (proteiny, lipidy, DNA, atd.) a také narušuje celkovou antioxidační kapacitu buněk. Existuje mnoho zdrojů ROS, lze do nich zahrnout jak endogenní jako např. aktivita makrofágů nebo neutrofilů, tak exogenní zdroje zahrnující tabák, cigaretový kouř, UV záření chlorované sloučeniny, polychlorované bifenylly (PCB), těkavé organické sloučeniny (benzen) a jiné. Chronická expozice jak endogenním tak exogenním zdrojům ROS má za následek poškození intracelulárních antioxidačních obranných mechanismů (Ziech a kol. 2012).

Podstatou chemoprevence nádorových onemocnění je využití přírodních, syntetických nebo biologických látek ke zvrácení nebo prevenci rozvoje nádoru (Ziech a kol. 2012) Jako chemopreventivní agens bylo označena řada sloučenin různých chemických tříd, jako vitamíny, minerály, přirozeně se vyskytující fotochemikálie a syntetické sloučeniny (Smith a kol. 2005). Dobrá chemopreventivní látka by měla být schopná zasahovat do jedné nebo více fází vícestupňového procesu karcinogeneze (Ruso 2007).

### **1.1.2 Charakteristické znaky nádorových buněk**

#### **1.1.2.1 Nesmrtelnost**

Je známo, že normální savčí buňky mají omezený počet buněčných dělení, na druhé straně rakovinné buňky mají schopnost dělit se neomezeně. Jako příklad lze uvést He-La buňky, původně kultivované z adenokarcinomu děložního čípku pacientky Henrietty Lacks v roce 1951, tyto buňky nadále rostou a množí se ve stovkách laboratoří po celém světě. První, kdo dokázal, že buňky z hlodavčích a lidských embryí mají omezený počet buněčných dělení (replikační potenciál) byl Leonard Hayflick. Většina normálních lidských buněk má schopnost 60 – 70 zdvojení. Mechanismu zodpovědný za řízení konečného počtu dělení leží

na konci lidských chromozomů - telomer. Význam telomer souvisí s replikací DNA. Po každé replikaci DNA, krátké sekvence (50-100 bází) telomer jsou ztraceny z konce každého chromozomu, které jsou tak kratší a kratší. Rakovinné buňky neztrácejí páry bází, zachovávají délky telomer a to hlavně díky aktivaci enzymu, zvaném telomeráza. Telomeráza přidá nekódující hexanukleotidové sekvence na konec každé telomery, tím udržuje požadovanou délku nad kritickou hranicí a umožňuje neomezenou replikaci (Hanahan a Weinberg 2000).

### ***1.1.2.2 Trvalé růstové signály***

Chování buněk je závislé na růstových signálech okolí (mitogenní), které spouští buněčné dělení. Tyto růstové faktory se váží na membránové glykoproteinové receptory, které vysílají signály přes řadu intracelulárních signálů, které podporují nebo inhibují expresi specifických genů. Pokud tyto růstové signály chybí, normální buňka změní aktivní dělení na klidový stav. Nádorové buňky vytvářejí mutantní formy proteinů (onkogenní proteiny), které napodobují normální růstové signály (protoonkogenní proteiny). Důsledkem transformace protoonkogenů na onkogeny je, že se nádorové buňky stanou nezávislé na vnějších růstových signálech.

Tři způsoby, jakým nádorové buňky získávají autonomii v produkci růstových signálů:

- změny v extracelulárních růstových signálech
- změny v transcelulárních mediátorech těchto signálů (receptory)
- změny v intracelulárních signálech, stimulujících proliferaci (Hanahan a Weinberg 2000).

### ***1.1.2.3 Schopnost obejít inhibující signály – tumor supresorové geny***

Inhibující signály působí dvěma způsoby:

- přinucením aktivně se dělící buňky k odchodu do klidové fáze (G0) buněčného cyklu, může sloužit jako dočasné opatření, než dojde ke změně v proliferační kapacitě např. změnou mikroprostředí
- přivedením buněk do trvalého post- mitotického stavu v důsledku diferenciaci

Nádorové buňky mohou obejít tyto inhibující signály regulující jejich růst a proliferaci. Mutace v genech, které za normálních okolností inhibují buněčné dělení, se

mohou projevit zvýšeným buněčným dělením. Tumor supresorové geny vytvářejí velkou skupinu genů, kódující proteiny, jejichž normální funkcí je kontrolovat buněčné dělení. Mutace v těchto genech má za následek ztrátu funkce, obvykle je třeba, aby došlo ke změně v obou kopiích (alelách) genu, aby mohlo dojít k vytvoření nádoru.

Příkladem tumor supresorového proteinu je p53, byl označen jako "strážce genomu", díky jeho neobyčejně rozhodující roli v buněčném cyklu. Téměř 50% všech karcinomů obsahuje mutace v p53. Mutace nebo ztráta funkce tohoto nezbytného proteinu se projevují pokračujícím buněčným dělením navzdory poškození DNA (Hejmadi 2010).

#### ***1.1.2.4 Odolnost vůči apoptóze***

Je typický znakem většiny, ne-li všech nádorů. Tkáňová homeostázou je označována rovnováha mezi buněčným dělením a buněčnou smrtí, kde je počet buněk v příslušné tkáni poměrně konstantní. V případě narušení rovnováhy, dojde k tomu, že se buňky dělí rychleji, než mohou umírat, což se může projevit rozvojem rakoviny, nebo naopak umírají rychleji, než se mohou dělit s následkem atrofie tkáně.

Indukci apoptózy můžeme zjednodušeně rozdělit na dvě způsoby:

- ztráta pozitivních signálů – nedostatek růstových faktorů může vyvolat apoptózu
- indukce negativními signály – vazba některých vnějších molekul (ligandů) jako jsou smrtící ligandy, mohou aktivovat intracelulární apoptotickou dráhu. Stejně tak vnější signály z buněk mohou také aktivovat apoptózu.

Vnější apoptotické signály jsou zprostředkovány receptory na povrchu buněk, které vážou signály pro přežití nebo apoptózu, například TNF faktor se váže na TNF receptory, nebo Fas ligandy se váží na Fas receptory na buněčné membráně.

Vnitřní signály, vyvolávající apoptózu se sbíhají do mitochondrie. Cytosolové proteiny pak způsobují buď zduření organel, nebo v nich dělají díry, umožňující uvolnění apoptotických efektorových proteinů do cytosolu.

Nádorové buňky jsou schopné obejít apoptózu mnoha způsoby. Nejznámějším příkladem je mutace p53 tumor supresorového genu, vedoucí ke ztrátě proapoptotických regulátorů (Hejmadi 2010).

### **1.1.2.5 Angiogeneze**

Vzhledem k tomu, že k přežití a růstu buněk a tkání je nutný dostatek kyslíku a živin, nachází se většina buněk do 100 $\mu$ m od kapilár. Endotelové buňky, které vystylají kapiláry za normálních podmínek, nerostou a nedělí se, avšak určité podmínky, jako je menstruační cyklus nebo hojení ran mohou spustit dělení endotelových buněk a růst nových kapilár - angiogeneze (neovaskularizace) Nádory mohou také vyvolat angiogenezi, představující klíčový krok přeměny malého, neškodného shluku mutantních buněk (in situ tumor) do velkého maligního růstu, schopného šířit se do dalších míst. Angiogeneze také představuje rovnováhu mezi pozitivními a negativními signály, které stimulují nebo blokují tento proces (Hejmadi 2010).

### **1.1.2.6 Metastázování**

Solidní tumory mohou za optimálních podmínek napadat sousední tkáň nebo se mohou šířit oběhovým systémem a usadit se ve vzdálených místech těla, právě tyto takzvané sekundární nádory – metastázy- jsou zodpovědné za téměř 90% úmrtí. Prostřednictvím metastáz je nádorům umožněno přežít a růst v novém prostředí, kde nejsou omezeny prostorem a živinami.

Fáze metastázování:

- lokální invaze - malý in situ tumor proniká přes bazální membránu.
- intravazace – nádorové buňky pronikají přes stěnu kapilár nebo lymfatických cév do oběhového systému.
- transport – nádorové buňky se šíří krevní nebo lymfatickou cestou, dokud se nepřichytí na pevné podpůrné tkáni. V této fázi může být zničena nebo ztracena většina nádorových buněk následkem nepřátelských podmínek.
- extravazace – krok podobný intravazaci, kdy se buňky přesunou do tkání, kde se usadí. Rozdíl je tedy ve směru pohybu, kdy buňky protlačí stěnu kapilár do tkáňového mikroprostředí.
- tvorba mikrometastáz – nádorové buňky reaktivují buněčnou proliferaci a tvoří malý tumor, který se buď vyvíjí v lumen kapilár, nebo skrze cévní stěnu.

- kolonizace - v důsledku nového prostředí, které nemusí poskytnout nezbytné faktory potřebné k růstu, je tato fáze nejsložitější. Většina nádorových buněk umírá nebo přežívá ve formě mikrometastáz (jsou hůře detekovatelné) (Hejmadi 2010).

### 1.1.3 Histogeneze nádorů

V rámci praxe se nádory posuzují podle jejich histologického (mikroskopického)vzhledu. V mnoha případech je stanovení tkáně nebo buňky, ze které nádory vycházejí poměrně obtížné (Mačák a Mačáková 2004).

Histogeneticky dělíme nádory na:

- Mezenchymové - nádory pojivových tkání, tukové tkáně, svaloviny, cév, krvetvorných tkání
  - Benigní
    - Fibrom - výskyt všude, kde se objevuje vazivo, někdy se objevují další složky, např. cévy, pak útvar nese název angiofibrom
    - Lipom - odvozen z tukové tkáně
    - Osteom - z kostní tkáně
    - Myom - ze svaloviny
  - Maligní – obecný název je sarkom, protože vyzrálější nádory se podobají normální mezenchymové tkáni, vypadá podle toho jejich název. Jedna část názvu je tvořena tkání, která je nejvíce podobná nádoru, druhou část je tvořena příponou sarkom:
    - Liposarkom,
    - Osteosarkom
    - Fibrosarkom
- Nádory krvetvorné tkáně - z buněk tvořící krevní elementy, tedy nádory kostní dřeně a lymfatických uzlin (lymfomy)
  - Leukémie - postihují celý krvetvorný systém
  - Lymfomy
- Epitelové - vyrůstají z povrchového nebo žlázoového epitelu

- Benigní
  - Adenom - žláznový epitel
  - Papilom - krycí epitel
- Maligní - obecný název je karcinom
  - Adenokarcinom - nádory žláz nebo nádory žlázám podobného vzhledu
- Neuroektodermové - řadíme sem kromě nádorů mozku a míchy také nádory periferního nervového systému a melanom
  - Benigní
    - Meningiom - z obalů mozku
    - Neurinom - ze Schwannových buněk periferních nervů
    - Feochromocytom- z dřene nadledvin
  - Maligní
    - Melanom - z nezralých melanoblastů
    - Meduloblastom - nádor CNS
- Smíšené nádory - skládající se ze dvou nebo více odlišných struktur
  - Benigní mezenchymové nádory - obě tkáně mezenchymové původu – fibrolipom, angioliipom
  - Benigní epitelové a mezenchymové nádory - v jednom nádoru přítomné epitelové a mezenchymové struktury - fibroadenom
- Teratom - nádor vyrůstající ze zárodečných buněk vaječníku nebo varlete
  - Nezralý maligní teratom – přítomny nezralé tkáně
- Nádory trofoblastu - patologické léze placenty, zahrnující nádorové i nenádorové léze, charakterizované proliferací trofoblastu, vzniklého v důsledku těhotenství.
  - mola hydatidóza
  - mola proliferans
  - choriokarcinon – maligní nádor z buněk trofoblastu (Mačák a Mačáková 2004).

## 1.2 Melanom

Třetí nejčastější rakovina kůže, mající původ v buňkách melanocytů. Během vývoje se prekurzory melanocytů přesouvají z neurální lišty do bazální vrstvy kůže. Posláním melanocytů je syntéza pigmentu melaninu z tyrosinu. Enzym nezbytný k biosyntéze melaninu označujeme jako tyrozinázu. Dendritickými procesy dojde k přenosu a následnému uložení nerozpustného pigmentu do keratinocytů. Do vrchních vrstev kůže se melanin dostane dělením keratinocytů, kde absorpcí viditelného a UV světla chrání buňky kůže (Schulz 2005).

I malé nádory mají tendenci metastazovat, zapříčiňující tak nepříznivé prognózy. Melanomy tak představují 90% úmrtí spojených s kožními nádory (Garbe a kol. 2010).

Vrstvy kůže lze rozdělit do tří vrstev. Vnitřní vrstva, hypodermis, obsahující 50% procent tělesného tuku zajišťující tepelnou izolaci. Střední vrstva, dermis, skládající se z krevních a lymfatických cév, vlasových folikul, žláz, nervů a sítí kolagenových a elastických vláken odpovědných za elasticitu kůže. Vnější vrstva, epidermis, avaskulární vrstevnatý epitel, tvořená hlavně keratinocyty (Chatelain a kol. 2011) Rozlišujeme dvě fáze v rámci růstu melanomu, horizontálně-radiální, během níž se léze roste v epidermis a vertikální fáze, při které buňky pronikají do dermis (Patwardhan a kol. 2003).

Klinicky a histologicky lze určit 4 podtypy melanomů (Mačák 2002):

- Povrchově se šířící melanom (SSM)

Obvykle charakterizován plochou, pomalu rostoucí, asymetrickou lézí s různobarevnou pigmentací, která se zvětšuje radiálním způsobem, pokud dojde k dermální invazi, klinicky se projeví přítomností vyvýšené oblasti. Obvykle se tímto typem melanomu setkáváme u mladších pacientů než u NM a LMN. Objevuje se na místech, které jsou přerušovaně vystavované slunečnímu záření jako trup, záda a končetiny (Scolyer a kol. 2011).

- Nodulární melanom (NM)

Objevují se u nepatrně starších pacientů než SSM na jakémkoliv místě, obvykle představuje rychle rostoucí uzel, může docházet ke vředovatění a krvácení (Scolyer a kol. 2011). Útvar, který se vyklenuje na povrch, někdy s polyplóidním vzhledem. Typický je vertikální růst a šíření pod bazální membránu epidermis. V dermis se

objevují ložiska nádorové infiltrace. Horizontální šíření v malém rozsahu. Tento melanom spojován s horší prognózou (Mačák 2002).

- **Lentigo maligna melanom (LMM)**

Je spojován s místy chronicky vystavovaných slunečnímu záření jako hlava, krk, nebo oblasti předloktí. Je charakterizovaný velkou nestejně pigmentovanou makulou s nepravidelnými okraji u starších pacientů, s oblastmi, které mohou být vyvýšené v případě dermální invaze (Scolyer a kol. 2011).

- **Akrální lentiginózní melanom**

Postihuje akrální oblasti, jako jsou dlaně, plosky nohou a subunguální oblasti. Představuje pomalu rostoucí, nestejně pigmentované makuly podobné LMN (Scolyer a kol. 2011).

### **1.2.1 Melanom B16-F10**

Existují celkem čtyři druhy maligního melanomu, odvozeného od myši C57BL/6. Jedná se o typy B16-F10, B16-F0, B16-F1 a B16-BL. Naše experimenty byly založeny na modelu melanomu B16-F10, který je silně invazivní a metastazuje do plic (Nakamura a kol. 2002).

## **1.3 Imunita**

Imunitní systém slouží jako ochrana před invazí patogenů a transformovanými buňkami, přičemž na obraně se podílí hlavní složky vrozené (nespecifické) a získané (specifické) imunity (Maruyama a kol. 2011).

### **1.3.1 Získaná imunita**

Buněčné složky získané imunity jsou tvořeny B a T- lymfocyty, evoluční vývoj lze datovat do doby vývoje obratlovců asi před 400 milióny let. Mezi typické vlastnosti adaptivní imunity patří paměť a flexibilita, která je zajišťována unikátním způsobem rozpoznání antigenů T a B- lymfocyty. T a B- lymfocyty v důsledku genetické rekombinace vytvářejí nové a unikátní antigenní receptory schopné rozpoznat téměř každý antigen. Pod pojmem imunologická paměť se rozumí schopnost T a B- lymfocytů, které po setkání s antigenem přetrvávají dlouhou dobu v organismu, vytvářet v případě reinfekce rychlou a specifickou odpověď. T- lymfocyty pak rozpoznávají antigenní peptidy pouze prezentované na povrchu na povrchu buněk vázané na proteiny HLA I. A II. Třídy. CD4+ pomocné



lymfocyty můžeme rozdělit na Th1-, Th2-, and T-regulační (Treg)lymfocyty. Th1 produkují cytokiny, včetně interferonu IFN- $\gamma$  and TNF- $\beta$ , působí na aktivaci makrofágů a stimulují cytotoxické T-lymfocyty, podílejí se tím tak na navození buněčné imunity. Stejně tak Th2 lymfocyty produkují Th2 cytokiny, mezi které patří IL-4, IL-5, and IL-13, stimulují B-lymfocyty k produkci protilátek a vyvolávají humorální imunitní odpověď. Treg lymfocyty jsou nedávno rozpoznanou rodinou lymfocytů, jejich funkce spočívá v potlačení reakcí ostatních T-lymfocytů, hrají významnou roli v regulaci vlastní tolerance, ale mohou také zasahovat do nádorové imunity (Clark a Kupper 2005).

### 1.3.2 Vrozená imunita

Anatomické a fyziologické bariéry zajišťují první linii obrany. Tyto bariéry jsou zajišťovány intaktní kůží, mukociliární clearancí, nízkým žaludečním pH, bakteriolytickými lysozomy v slzách a jinými sekrety. Tyto mechanismy obrany zesiluje vrozená imunita, která je představována jak buňkami hematopoetického, tak nehematopoetického původu, tvořené kůží a epiteliálními buňkami lemujícími dýchací, gastrointestinální a urogenitální trakt. Hematopoetické buňky zapojené do imunitních reakcí vrozené imunity řadíme makrofágy, dendritické buňky, žírné buňky, neutrofile, eozinofily, NK buňky, NKT buňky. Součástí vrozené imunity je i humorální složka obsahující proteiny komplementu, LPS vázající protein, C-reaktivní protein a jiné pentraxiny (Turvey a Broide 2010). Srovnání základních rysů vrozené a získané imunity je uvedeno v tabulce 2.

**Tabulka 2:** Porovnání typických znaků vrozené a získané imunity (Turvey a Broide 2010).

	Innate immune system	Adaptive immune system
Cellular elements	Hematopoietic cells: macrophages, dendritic cells, mast cells, neutrophils, eosinophils, NK cells, and NK T cells Nonhematopoietic cells: epithelial cells (eg, skin, airways, and gastrointestinal tract)	Hematopoietic cells: T and B lymphocytes
Humoral elements	Large arsenal of components: complement proteins, LPS binding protein, C-reactive protein and other acute-phase reactants, antimicrobial peptides, and mannose-binding lectin	Immunoglobulins secreted by B cells
Receptor characteristics	Invariant, germline encoded All cells of a class express identical receptors (ie, nonclonal).	Generated by random somatic gene segment rearrangement All cells of a class express a single type of receptor with unique specificity (ie, clonal).
Ligands recognized	Conserved microbial components Common metabolic or biologic consequences of infection (eg, uric acid, K <sup>+</sup> efflux, and MHC class I downregulation)	Specific details or epitopes of macromolecules (eg, proteins, peptides, and carbohydrates)
Types of receptors	Activating: TLR, NLR, and complement Inhibitory: killer cell immunoglobulin-like receptors	B-cell receptor and T-cell receptor
Response time	Immediate	Delayed by hours to days
Immunologic memory	None: responses are the same with each exposure. Nonanticipatory immunity	Responsiveness enhanced by repeated antigen exposure. Anticipatory immunity
Risk of autoreactivity	Low: self-tolerant receptors are selected during evolution.	High: random gene rearrangement generates autoreactive receptors requiring the presence of multiple tolerance mechanisms.

### **1.3.2.1 Způsoby rozpoznávání vrozenou imunitou**

Vrozený imunitní systém rozeznává mikroorganismy třemi způsoby:

- Receptory kódované v zárodečných buňkách rozpoznávají konzervované molekulární struktury, které jsou exprimovány celou řadou mikroorganismů, Charles Janeway použil název pattern recognition receptors (PRR) k popsání těchto receptorů a pathogen associated molecular patterns (PAMPs) označil struktury rozpoznávané těmito receptory.
- Zaznamenává nebezpečí ve formě damage-associated molecular patterns (DAMPs), představované molekulami, které jsou uvolňovány lýzou buněk a poškozenými tkáněmi v souvislosti s infekcí nebo zánětem.
- Odhaluje chybějící molekuly, které jsou exprimovány normální zdravou buňkou ale nejsou přítomné u infikovaných buněk nebo mikroorganismů (Turvey a Broide 2010).

Bakterilní PAMPs představují složky bakteriální buněčné stěny (např. lipopolysacharid a peptidoglykan), flagelin a DNA nebo RNA, struktury, které jsou typické pro bakterie, na druhé straně virové PAMPs zahrnují nukleové kyseliny a to jak dvouřetězcové tak jednořetězcové non-capped RNA. Mykotické PAMPs jsou charakteristické expresí vysoké úrovně zymosanu- agonisty TLR2. DAMPs zvané také jako alarminy zahrnují různé bílkoviny, jako jsou proteiny tepelného šoku, kalgranuliny a sérový amyloid A, ale také nebílkovinné molekuly jako například kyselina močová, ATP, ROS (reactive oxygen species) a heparin sulfát (Hansen a kol. 2011).

### **1.3.2.2 Rozdělení PRRs**

PRRs můžeme rozdělit do třech rodin podle jejich funkce (Jeannin a kol. 2008):

- Endocytární receptory – hrají úlohu ve vazbě, pohlcení a následné likvidaci mikroorganismů fagocyty, bez přenosu intracelulárního signálu. Tyto receptory jsou schopné rozpoznat sacharidy jako například manózové receptory a glukonové receptory. Scavenger receptory rozpoznávají a odstraňují záporně nabitě makromolekuly a zajišťují odstranění apoptotických buněk (Wang a Chandawarkar 2010).
- Signální receptory - exprimovány na povrchu buněk nebo intracelulárně, v reakci na různé mikrobiální produkty jako proteiny, glykany, lipoproteiny a nukleové kyseliny se podílejí se na buněčné aktivaci. Tato skupina je představována:

- Toll-like receptory (TLR)
  - Nukleotidy - vázající oligomerizační doména -( NOD)- like receptory (NLR)
  - RIG-I retinovou kyselinou indukovaný gen I- (RIG)- like receptory
- Opsoniny – napomáhají rozpoznávání a odstranění jejich ligandů fagocyty, některé se podílejí na aktivaci dráhy komplementu (Jeannin a kol. 2008). Základní rozdělení a charakteristiku PRR uvádí tabulka 3.

**Tabulka 3:** Klasifikace pattern recognition receptorů (Jeannin a kol. 2008).

Function		Ligands
Endocytic receptors	glycosylphosphatidylinositol (gpi)-linked receptor Scavenger receptors (SR)	LPS oxLDL Microbes
	C-type lectin receptors (CLR)	Microbes Microbial moieties
Signaling receptors	Toll-like receptors (TLR) NOD-like receptors (NLR) RIG1-like helicases (RLH)	Microbial moieties Bacterial lipoproteins Nucleic acids
Bridging molecules	Collectins	Sugars
	Ficolins	Glycoproteins
	Pentraxins (PTX)	Microbes Microbial moieties

#### 1.3.2.2.1 Endocytární (fagocytární) receptory

Bylo prokázáno, že na fagocytóze se podílí celá řada receptorů, přičemž byly objeveny modelové systémy pro zkoumání interakcí těchto receptorů s TLRs (Underhill a Gantner 2004).

- Dectin-1 – lektin C- typu, který rozpoznává  $\beta$  – glukan v buněčných stěnách hub a zprostředkovává fagocytózu částic obsahujících  $\beta$  – glukan.
- Manózový receptor- další z lektinových receptorů schopný zprostředkovat fagocytózu.
- Formylpeptidové receptory – rozpoznávají pro bakterie (i mitochondrie) peptidy, začínající formylmethioninem.
- Fc- receptory- nejvíce prostudovaný fagocytární receptor, který se váže na Fc oblast protilátek.
- CR3 receptor, zprostředkovává fagocytózu iC3b opsonizovaných mikroorganismů.

#### **1.3.2.2.2 TLR receptory**

Z PRRs byly nejdříve charakterizovány TLRs a jsou také rozsáhle studovány jak u obratlovců tak bezobratlých (Rajendran a kol. 2012). TLRs představují transmembránové proteiny, lokalizované na buněčném povrchu nebo v edosomu/fagosomu. Obsahují několik extracelulárních leucin bohatých opakování (LRRs), které se podílejí na přímém nebo nepřímém rozpoznání patogenu a intracelulární signální transdukční doménu, takzvaná TIR(Toll/Interleukin-1 Receptor) doména (Dostert a kol. 2008). TLR signalizace může čtyřmi možnými způsoby ovlivnit fagocytózu: TLR může sloužit přímo jako fagocytární receptor, TLR signalizace může regulovat účinnost tvorby fagozomu, TLR signalizace může ovlivňovat maturaci nově vzniklých fagozomů nebo TLR zprostředkované transkripční odpovědi mohou mít vliv na geny podílejících se na všech krocích fagocytózy (Underhill a Gantner 2004).

Toll-like receptory rozpoznávají PAMPs receptory přímo nebo ve spolupráci s dalšími molekulami a vyvolávají prozánětlivé reakce a spouštějí likvidační pochody. Oproti tomu scavenger receptory (SR), manózoové receptory (MR), glukonové receptory (bGR) rozeznávají ligandy na povrchu organismů přímo a v důsledku toho tak dochází k okamžitému pohlcení částic (Mukhopadhyay a Gordon 2004).

#### **1.3.2.2.3 Scavenger receptory**

Scavenger receptory se exprimují na myeloidních buňkách (makrofágy a dendritické buňky) a na některých endoteliálních buňkách. Jejich důležitá role spočívá v odklizení modifikovaných molekul a apoptotických buněk. Váží a internalizují mikroorganismy a jejich produkty, včetně grampozitivních bakterií (lipoteichová kyselina), gramnegativních bakterií (lipopolysacharid), intracelulárních bakterií a CpG DNA. SR se podílejí na metabolismu lipidů a váží modifikované lipoproteiny o nízké hustotě (Peiser a kol. 2002).

#### **1.3.2.2.4 NLR receptory**

Výzkum NLRs byl zaměřen především na NOD1 a NOD2 (Fukata a kol. 2009). NOD 1 je všudypřítomně exprimován, oproti tomu exprese NOD2 je omezena na monocyty, mikrofágy, dendritické buňky a střevní Panethovy buňky. Ukázalo se, že jak NOD1, tak NOD2 vyvolávají NF- $\kappa$ B aktivaci na TLR nezávislým způsobem, přičemž další analýzy prokázaly jejich schopnost rozpoznat různé strukturální motivy odvozené z PGN, složky buněčné stěny bakterií (Shaw a kol. 2008). Množství NLR molekul je schopno tvořit

inflammazomy, multiproteinové komplexy, které jsou schopné aktivovat enzym kaspázu-1 vedoucí k uvolnění interleukinu-1 (IL-1), IL-18, IL-33 (Cassel a kol. 2009).

### **1.3.3 Nádorová imunologie**

Nádorová imunologie je založena na předpokladu, že je imunitní systém schopen rozlišit normální buňky od nádorových. V roce 1957 Burnet vytvořil hypotézu nádorového dohledu (imun-surveillance), která odrážela tuto myšlenku, v které předpokládal, že imunitní systém by měl být schopen chránit nás před rozvojem nádoru rozpoznáním a následnou eliminací nádorových buněk (Chamuleau a kol. 2006).

#### **1.3.3.1 Nádorové antigeny**

Množství nádorových antigenů bylo identifikováno pomocí T-buněk a pacientů s nádorovým onemocněním (Durrant a Scholefield 2003). Je možné využít několik markerů k identifikaci nádoru a následně také ke specifickému ataku nádorových buněk (Whelan a kol. 2003). Rozlišujeme dvě kategorie nádorových antigenů: (Hořejší a Bartůňková 2009).

Antigeny specifické pro nádory (TSA) zahrnuje poměrně malou skupinu antigenů, jejíž příkladem jsou nádorové testikulární antigeny (cancer/testis antigen CTA), Tato skupina antigenů je nepřítomná v normální tkáni ale je exprimována buňkami nádorovými. Fungují jako specifické markery onemocnění, řadíme mezi ně MAGE (melanoma antigen gene) antigeny přítomné u melanomu (Whelan a kol. 2003).

Antigeny asociované s nádory (TAA) představují obvykle diferenciacní antigeny exprimované normálními buňkami, jsou ve zvýšené míře exprimovány buňkami nádorovými. (Whelan a kol. 2003)

TAA rozpoznávají T-lymfocyty tvoří heterogenní skupinu, můžeme je rozdělit do třech kategorií. Do první řadíme antigeny specifické pro každý jednotlivý nádor, obvykle odvozené z mutovaných proteinů. Druhou skupinu tvoří antigeny exprimované především v souvislosti s malignitami, ale sdíleny i ostatními nádory, zahrnují obvykle transkripčně aktivované geny, které nejsou normálně exprimovány, dříve známé jako embryonální antigeny. Poslední skupinu vytvářejí antigeny odvozené z tkáně původu nádoru (Bremers a Parmiani 2000).

#### **1.3.3.2 Buňky vrozené imunity**

V prvním kroku, NK- buňky, které představují složku rychlé odpovědi vrozené imunity, uvolňují protizánětlivé cytokiny jako interferon  $\gamma$  vedoucích ke kaskádě

rozpuštěných faktorů, včetně chemokinů což má za následek aktivaci makrofágů a antigen prezentujících buněk (APCs). Makrofágy jsou schopné ničit nádorové buňky přímo uvolněním lysozomálních enzymů, reaktivních forem kyslíku a oxidu dusnatého. Dendritické buňky shromažďují nádorové fragmenty a proteiny a migrují do drenující lymfatické uzliny, kde prezentují tyto proteiny antigen- specifickým CD4 a CD8 T- lymfocytů, představující zahájení adaptivní imunity (Yee 2006).

NK- buňky- využívají několik efektorových mechanismů jako perforiny, smrtící ligandy a produkci  $INF\ \gamma$ . Funkce NK buněk je v nádorovém mikroprostředí regulována prostřednictvím inhibičních a aktivačních receptorů, cytokinů (např. IL-2, IL-15) a kostimulačními molekulami jako CD 80, CD86,CD40,CD70 a ICOS.

NKT- buňky – představují specializovaný typ T- buněk, exprimující invariantní T- buněčný receptor  $\alpha$ , ten je charakteristický pro glykolipidové antigeny, jehož prezentace je uskutečňována v kontextu CD1d,molekuly podobné HLA třídy I., exprimované na antigen prezentujících buňkách a u některých nádorů. Destrukce nádoru zprostředkována NKT- buňkami zahrnuje produkci  $INF\ \gamma$ , která přispívá k aktivitě a cytotoxicitě NK buněk a CD8+T-lymfocytů

$\gamma\delta$ -T lymfocyty – slouží jako hlavní časný zdroj  $INF\ \gamma$  a mohou zprostředkovat přímou cytotoxicitu na nádorové buňky (Jinushi a Dranoff 2007).

Makrofágy a neutrofilny – jsou nejdůležitější podmnožinou fagocytů a mohou být aktivovány přímo prostřednictvím stresových molekul z nádorových buněk, přes TLR- signalizaci vedoucí k produkci reaktivních forem kyslíku a dusíku a prozánětlivých cytokinů (Garg a kol. 2010).

## 1.4 Možnosti nádorové terapie

Chirurgická léčba představuje nejstarší způsob léčení rakoviny. Cílem operace je odstranění primárního nádoru a určení stádia onemocnění odstraněním lymfatických uzlin drenující oblast nádoru. Chirurgická léčba se bude i nadále měnit. Moderní technologie umožňují provádět chirurgické operace pomocí malých řezů s použitím endoskopických technik. Robotické chirurgie a operace prováděné na dálku pomocí robotiky a telemetrický přenos jsou proveditelné (Knowles a Selby 2005).

Radioterapie využívá ionizující záření k ničení nádorů a nádorových buněk. Tato terapie je založená na vysokoenergetických elektromagnetických paprscích nebo subatomárních částicích, které poškozují DNA v nádorových buňkách, buňka tak ztrácí schopnost dělit se a umírá. Cílením paprsku na určité části těla nebo případně přímo na nádor

je možno dosáhnout hlavního cíle, zničit nádorové buňky bez poškození buněk normálních. Radioterapií lze tak zajistit větší přesnost a méně vedlejších účinků než při chemoterapii (Panno 2005).

Léčba s pomocí chemoterapie spočívá v podávání cytostatik, které mají výrazné vedlejší účinky pro pacienty v rámci léčby zhoubného onemocnění. Místem, kde působí většina cytostatik je buněčná DNA a procesy s ní související (Knowles a Selby 2005). Cytostatika působí na aktivně dělící buňky a proto, každá tkáň skládající se z proliferujících buněk je také zasažena, zejména pak kostní dřeň, trávicí trakt, varlata, vaječníky a vlasový folikul. Vzhledem k postiženým tkáním je chemoterapie provázána množstvím nežádoucích účinků: únava, nevolnost a zvracení, ztráta vlasů, anémie, sekundární infekce a špatná srážlivost krve (Panno 2005). Léčba podle časového vztahu k chirurgickému zákroku může být rozdělena na adjuvantní, kdy je léčba zahájena krátce po operaci, kdy nebyli zjištěny žádné pozůstatky nemoci s cílem zvýšit šance na vyléčení. (považováno za doplněk operace). Naopak chemoterapie podávaná před operací je označována jako neoadjuvantní, její úlohou je zmenšit primární nádor aby následná operace byla lépe proveditelná, méně poškozující a učinit některé neoperovatelné nádory operovatelnými a stejně jako u adjuvantní léčby včasná léčba mikrometastáz (Knowles a Selby 2005).

## 1.5 Imunoterapie

Imunoterapie je zřejmě nejelegantnější způsob léčby rakoviny využívající prostředky, které jsou tělu vlastní k léčbě rakoviny (Schulz 2005). Buňky exprimují proteiny na membránách buněk, které umožňují, že je obranný systém dokáže rozpoznat. Ve snaze zaměřit nádorové buňky molekulární biologové a imunologové se snaží rozpoznat cíle (nádorové antigeny) a hledají způsob jejich prezentace imunitnímu systému pacientů k stimulaci pomocných a cytotoxických T-lymfocytů, NK buněk a protilátek. Imunoterapie má schopnost napadat pouze rakovinové buňky, přičemž nepoškozuje normální buňky (Durrant a Scholefield 2003). Můžeme rozlišit aktivní imunoterapii, která se snaží vyvolat dlouhodobé preventivní nebo léčebné odpovědi na stanovený TAA. Na druhé straně pasivní imunoterapie zajišťuje antigen specifickou imunitní odpověď pomocí podání velkého množství efektorových molekul, jako jsou protilátky nebo cytotoxické T buňky (Sengupta a kol. 2010).

V průběhu vývoje imunoterapie se objevilo mnoho přístupů. Nejvíce úsilí bylo vloženo do buněčné imunoterapie, můžeme zde rozdělit tři přístupy (Bremers a Parmiani 2000):

- Nejstarší přístup označován jako aktivní nespecifická imunostimulace klade za cíl podpořit základní funkce imunitního systému bez změny cíle nebo samostatných efektorových buněk (např. podání cytokinů jako IL-2, interleukinů  $\alpha$  nebo  $\gamma$ ) jak naznačil Coley při svých pokusech, kdy zaznamenal regrese solidních tumorů po injekci bakteriálních toxinů.
- Vakcinace nebo aktivace specifické imunoterapie, která se snaží aktivovat imunitní systém optimalizací prezentace antigenu (např. syntetické peptidy, vakcinace)
- Adoptivní imunoterapie využívá infúzi efektorových buněk, které byly stimulovány k boji proti nádoru a expandovány in vitro, protinádorové cytotoxické lymfocyty (CTL)

Jak jsem zmínila výše, léčba pomocí imunoterapie začala, když se Coley pokusil léčit nádory užitím bakteriálních extraktů s cílem zesílit imunitní odpověď (Bremers a kol. 2000). Vycházel z léčby pacientů se sarkomem atenuovanými kmeny bakterií *Streptococcus pyogenes* a *Serratia marcescens* naznačující, že navození silné imunitní odpovědi by mohlo být přínosem v boji proti rakovině (Whelan a kol. 2003). Ačkoliv účinné složky Coleyho toxinů nebyly dobře charakterizovány, imunomodulační aktivita je přiřazována mikrobiálním látkám včetně lipopolysacharidu (LPS), lipoteichoové kyseliny a bakteriální DNA (Cho a kol. 2006). Jako hlavní látka Coleyho toxinu byl označen LPS, izolované LPS v kultuře se však ukázalo jako neefektivní látka a tak bylo stanoveno, že efekt byl zprostředkovaný mechanismem závislým na hostiteli, později bylo jako účinný prostředek s protinádorovými vlastnostmi stanoven TNF (Lundin a Checkoway 2009). Další studie pomocí rekombinantních TNF však neukázaly stejnou protinádorovou účinnost Coleyho toxinů. Mimo jiné bylo prokázáno, že v nepřítomnosti T-buněk endotoxin vyvolá pouze přechodné nekrózy nádorů ale ne trvalé regrese, proto nemůže být sám zodpovědný za protinádorovou aktivitu endotoxinu. Identifikace a produkce TNF poskytla další vlnu cytokinů. Většina z těchto cytokinů neprokázala podobné protinádorové účinky endotoxinu, kromě jednoho – interleukinu IL-12 (Tsung a Norton 2006).

Nyní je známo, že protinádorové účinky Coleyho toxinů jsou přiřazované IL-12. IL-12 zvyšuje funkci již existujících nádorově specifických T-lymfocytů indukovat nádorové odmítnutí. Je to způsobené tím, že IL-12 receptory jsou přednostně exprimované na aktivovaných T-lymfocytech, což vysvětluje účinnost IL-12 terapie v případě pokročilých nádorů (Sengupta a kol. 2010).

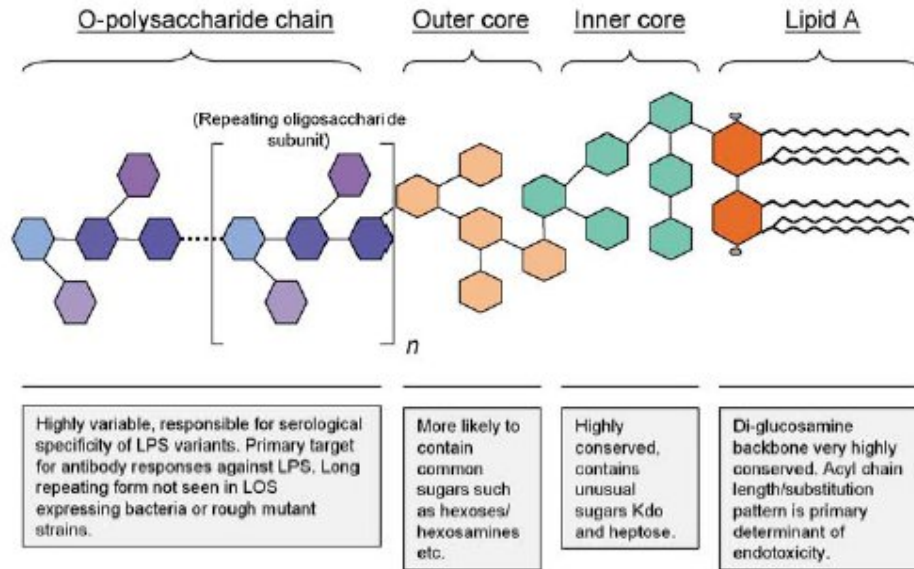


## 1.6 Terapie pomocí LPS

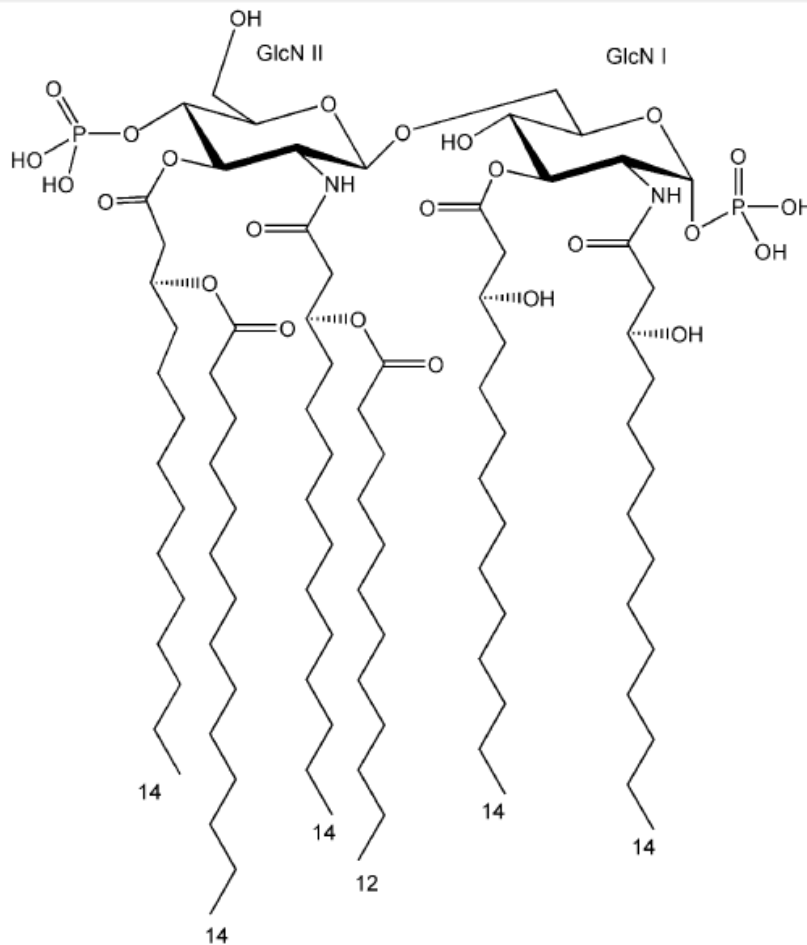
U gram negativních bakterií rozeznáváme dvě odlišné membrány: vnitřní a vnější membrána. Významnou složkou vnější membrány tvoří lipopolysacharid (LPS), který je u mnoha bakterií toxický. Objev endotoxinu koncem 19. Století souvisel s prokázáním, že teplem usmrcené bakterie cholery byly samy o sobě toxické spíše než toxicita způsobená uvolněním složek z živých organismů. Vylučované toxiny se staly známé jako exotoxiny a toxické látky bakterií jako endotoxiny (Wang a Quinn 2010).

### 1.6.1 Struktura LPS

Lipopolysacharid (viz. Obr. 1) je podle struktury rozdělen na tři kovalentně vázané odlišné část: O- antigenní polysacharid, oligosacharidové jádro a glykolipid nazvaný Lipid A (Jeannin 2009). O-řetězec je zodpovědný za antigenní vlastnosti lipopolysacharidu, avšak protinádorové vlastnosti lipopolysacharidu jsou nesený Lipidem A (Reisser a kol. 2002). Lipid A je vysoce hydrofobní a endotoxicky aktivní část molekuly, skládající se ze dvou glukosaminových jednotek nesoucí dvě fosforylované skupiny (pozice 1 a 4'), k této struktuře jsou připojeny až 4 acylové řetězce, tyto řetězce mohou být substituovány dalšími mastnými kyselinami a poskytnout tak molekulám LPS až sedm acylových substituentů (viz. Obr. 2). Lipid A je kovalentně vázaný k oblasti tvořící jádro, kterou je pak možné rozdělit na vnitřní a vnější jádro. Vnitřní jádro je bližší lipidu A, a je složeno z velkého podílu neobvyklých cukrů jako je 3-deoxy-D-mano-2-oktulosonová kyselina (Kdo) nebo L-glycero-D-manno-heptózu(Hep). Kdo můžeme nalézt téměř ve všech LPS, je vázaná alfa vazbou na karbohydrátovou část Lipidu A a představuje část nezbytnou pro životaschopnost bakterie. Také přítomnost negativně nabitého substituentu (např. fosfátu, obvykle na pozici 4) se ukazuje nepostradatelnou. Vnější jádro obsahuje obvykle jednoduché hexózy jako glukózu, galaktózu, N-acetyl glukosamin, N-acetyl-galaktosamin a je obvykle více variabilní než vnitřní jádro. Na vnější jádro je pak vázaný polymer opakujících se sacharidových podjednotek, nazvaných O-polysacharid nebo O- řetězec, obsahující jeden až osm glykosylových zbytků. Jako nejzevnější část molekuly LPS, je O-polysacharid hlavním antigenem pro protilátkovou odpověď hostitele, kvůli specifičnosti této odpovědi je O-řetězec často označován jako O-antigen (Erridge a kol. 2002).



**Obr. 1:** Obecná struktura lipopolysacharidu (Erridge a kol. 2002).



**Obr. 2:** Chemická struktura lipidu A u *E. coli* (Molinaro a kol. 2009).

Divoké druhy bakterií obecně syntetizují dvě formy LPS, S-formu a R- formu. R-forma se vyznačuje nepřítomností O-specifického řetězce a skládá se tak pouze z oligosacharidového jádra a lipidu A. Bylo objeveno, že k aktivaci TLR4 S formou jsou potřebné pomocné proteiny (CD14, LBP), zatímco R-forma LPS aktivuje TLR4/MD-2 přímo.

Tyto zjištění mají za následek, že R- formy aktivují širší spektrum TLR4/MD-2- pozitivních buněk a s větší účinností než S- forma LPS (Freudenberg a kol. 2008).

### **1.6.2 Vazba a rozpoznání LPS imunitním systémem**

Na aktivaci imunitního systému bakteriálním endotoxinem se podílí mnoho jak rozpustných tak membránově vázaných proteinů. Jeden z důležitých membránově vázaných proteinů je mCD14, který je připojený k membráně pomocí GPI-kotvy, mCD14 není schopný přenášet signál přes buněčnou membránu, díky nepřítomnosti transmembránové domény, místo toho se pravděpodobně uplatňuje ve vazbě a přenosu LPS nebo lipidu A k jiným proteinům a tak usnadňuje doručení LPS nebo lipidu A hostitelské buňce a zvyšuje buněčnou aktivaci. Další z podstatných proteinů je LPS-vázací protein, protein akutní fáze, jeho kladný náboj umožňuje vázat negativně nabitě molekuly jako endotoxin. LBP zprostředkovává transport endotoxinu na buněčnou membránu ale také se vmezeřuje do buněčné membrány (Jeannin 2009).

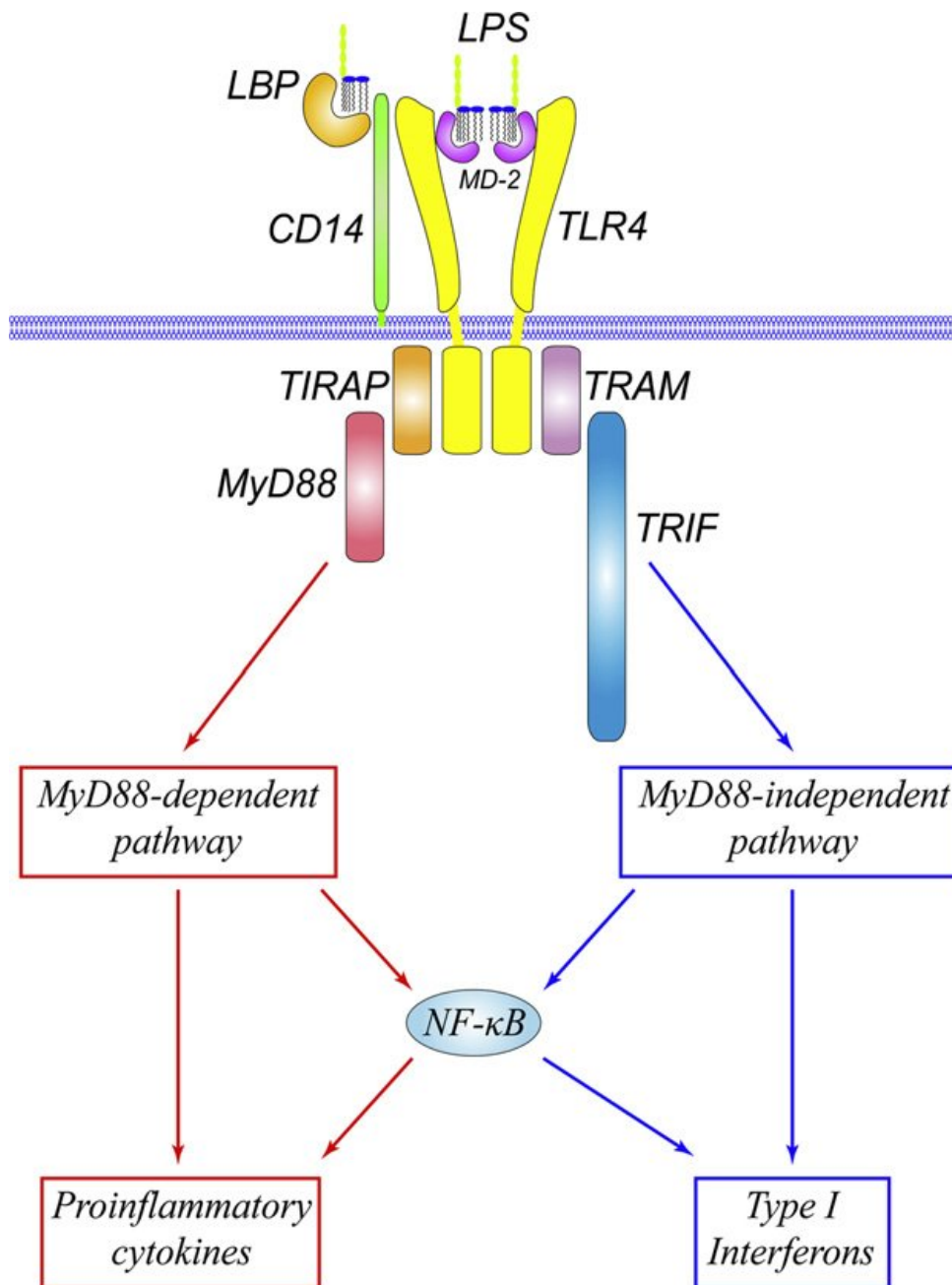
Nejprve dojde k navázání enterobakteriálního LPS na lipopolysacharid-vázací protein (LBP), který poté přenáší monomer LPS z bakteriální stěny na membránově vázaný CD14 na monocitech a myeloidních buňkách (Fujihara a kol. 2003).

LPS-CD14 komplex zahájí intracelulární signalizaci interakcí s transmembránovým proteinem TLR-4, který aktivuje NF- $\kappa$ B transkripční faktor, vedoucí k produkci a sekreci prozánětlivých cytokinů (Rosenfeld a kol. 2006).

Na rozdíl od jiných Toll- like receptorů, aktivace TLR4 probíhá složitým mechanismem, za pomoci pomocných proteinů (LBP, CD14) a koreceptoru (MD-2), ve skutečnosti je to právě MD-2, schopný rozpoznat a vázat endotoxin, ne TLR4. MD-2 je rozpustný protein jehož hydrofobní kapsa představuje vazebné místo pro acylové řetězce lipidu A. Do hydrofobní kapsy se váže pouze 5 acylových řetězců, z 6 přítomných u lipidu A. 6 řetězec vyčnívá z kapsy a interaguje s hydrofobními zbytky na TLR4. Takové interakce jsou zásadní pro MD-2/TLR4 heterodimerizaci a jsou tak tedy nezbytným předpokladem aktivace TL4 signální kaskády. Endotoxin/MD-2/TLR4 heterodimer je schopný, na rozdíl od jiných TLR signálních komplexů aktivovat dva intracelulární adaptorové proteiny

( MyD88/TIRA a TRIF/TRAM) může tak aktivovat dvě paralelní signální dráhy a aktivovat transkripci jak protizánětlivých cytokinů jako interferonů I typu (Oblak a Jerala 2011).

MyD-88 závislá dráha má za následek tvorbu zánětlivých cytokinů jako je tumor nekrotizující faktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1(IL-1), interleukin IL-6, přičemž TRIF- závislá dráha vede k tvorbě interferonu  $\beta$  (IFN-  $\beta$ ) a oxidu dusičného (Lewicky a kol. 2011). Schéma vazby LPS a TLR4 signalizace uvádí obrázek 3.



**Obr. 3:** Vazba LPS a aktivace signálních drah (Lu a kol. 2008).

Přestože sekrece cytokinů je pro rozvoj lokální zánětlivé odpovědi klíčová, nevyvážená nadprodukce cytokinů může vést v mnoha případech k septickému šoku charakterizovaným endoteliálním poškozením, ztrátou cévního tonu, koagulopatií a multiorgánovým selháním často s následkem smrti ( Rosenfeld a kol. 2006).

Studie ukázaly, že některé antimikrobiální peptidy (AMPs) jsou schopné neutralizovat LPS-indukované endotoxické účinky. Tyto peptidy představují důležité složky obranných mechanismů vrozené imunity všech druhů života, jsou produkovány ve velkém množství v místě infekce nebo zánětu a působí rychlou likvidaci mikroorganismů. Několik AMP brání LPS- závislé indukci cytokinů v makrofágách a blokují sepsi na zvířecích modelech (Rosenfeld 2006).

## **1.7 Lipid A a jeho analogy**

Lipopolysacharidová tolerance zahrnuje jak časnou tak pozdní toleranci, zprostředkovanou anti-LPS protilátkami. Vzhledem k tomu, že molekuly lipidu A nejsou imunogenní, pozdní tolerance na tyto molekuly není. Po injekci analogu lipidu A nastává přechodné období snížené odpovědi *in vivo*, v němž druhá injekce lipidu A navozuje menší zánětlivou reakci. Lipidem A indukovaná tolerance poskytuje také ochranu před toxicitou LPS (Jeannin 2009).

Pikomolární hladiny Lipidu A jsou schopné aktivovat makrofágy k produkci mediátorů zánětu jako TNF- $\alpha$  a IL-1 $\beta$ , Lipid A mimoto aktivuje produkci kostimulačních molekul potřebných k navození adaptivní imunity. Strukturní znaky lipidu A *E.coli*, především jeho dvě fosfátové a acyloxyacylové skupiny, jsou potřebné k úplné aktivaci TLR4/MD2 v lidských buňkách. Částečná aktivace TLR4/MD2 některými analogy lipidu A vede produkci pozměněných cytokinů, které si zachovávají pozitivní adjuvantní účinek endotoxinu, ale minimalizují toxicitu. Některé analogy lipidu A (obsahující méně acylových řetězců) jsou potenciální TLR4/MD2 antagonisté s potenciálním využitím v rámci lidských léčiv (Raetz a kol. 2007).

## **2 Cíle práce**

Cílem této práce je studium vlivu LPS na melanom B16-F10 a to jak v rámci in vivo experimentů tak experimentů in vitro.

## **3 Materiál a metody**

### **3.1 Seznam chemikálií**

- LPS z E.coli 011.B4 (Sigma - Aldrich )
- RPMI 1640 (Sigma Aldrich)
- Fetal Calf Serum (Sigma Aldrich)

### **3.2 Experimentální zvířata**

Při pokusech byly používány samice myši kmene C57BL/6N, pocházející z chovu Charles River Laboratories. Stáří myši bylo 8 týdnů a jejich váha se pohybovala v rozmezí 18-20g. Myši byly chovány za standardních podmínek s fotoperiodou 12/12, s volným přístupem k potravě a vodě ve zvěřinci Parazitologického ústavu Biologického centra Akademie věd České Republiky v Českých Budějovicích.

### **3.3 Buněčné linie**

K pokusům byla použita buněčná linie melanomu- B16/F10, která byla získána darem od profesorky Říhové, ÚMG Praha. Kultivace probíhala v RPMI 1640 s 10% FCS, glutaminem, merkaptoetanolem a antibiotiky v termostatu při 37°C.

### **3.4 Příprava buněk B16-F10**

Po kultivaci bylo z buněk slito médium, buňky byly dále třikrát za sebou promyty sterilním PBS, po posledním promytí byla provedena trypsinizace (0,02% trypsin a 0,02% EDTA v PBS). Následně bylo přidáno médium (RPMI 1640 s 10% FCS) ve kterém byly buňky s použitím Pasteurovy pipety rozvolněny. V dalším kroku následovala centrifugace po dobu 10 min při 150g po které byly buňky rozsuspendovány v RPMI 1640 bez séra za opětovného použití Pasteurovy pipety. S pomocí trypanové modři byly buňky spočítány v Bürkerově komůrce, v konečné fázi byla jejich koncentrace upravena na 4mil/1ml RPMI.

### **3.5 Transplantace melanomu**

Před samotnou aplikací byly myši oholeny na pravé a levé zadní části zad. Pravá část sloužila k aplikaci léčivých látek, levá strana byla používána jako kontrola teploty

v porovnání s teplotou nádoru. Do oholeného místa pak bylo myším injikováno s.c. (pod kůží) 400 00 buněk B16-F10 v 0,1 ml RPMI 1640 bez séra.

### **3.6 Měření velikosti a teplot nádorů**

Při léčbě byl průběžně sledován růst nádoru měřením největšího a nejmenšího rozměru nádoru pomocí kaliperu. Ze získaných hodnot byly následně vypočítány objemy jednotlivých nádorů (Inaba a kol. 1986). K výpočtu byl používán vzorec  $V = \pi/6 AB^2$ , kde A je největší rozměr nádoru a B odpovídá nejmenšímu rozměru nádoru.

Měření teplot nádorů spolu s kontrolním místem na levém boku bylo prováděno obden, přičemž v den započetí terapie byla teplota měřena v intervalech 0,6,12,24 hodin, následně pak obden. Teploty byly měřeny speciálním bezdotykovým teploměrem IR Rodent Thermometer 153 IRB (Bioseb).

### **3.7 Počítání metastáz**

Před vlastním počítáním byly plíce po určitou dobu zakonzervovány ve čtyřprocentním roztoku formaldehydu. Plíce byly prohlíženy s použitím binolupy, u plíc obsahující metastatická ložiska (černé tečky) bylo spočítáno jejich celkové množství (Větvíčka a kol. 2007).

### **3.8 Příprava buněk morčecích ledvin (primokultura)**

Z morčecí ledviny byly odstraněny ledvinové pánvičky a kalichy. Zbývající tkáň byla rozstříhána a promyta PBS. Tkáň byla pak umístěna do 300 ml Erlenmayerovy baňky. Následně byl přidán 0,25% roztok trypsinu v PBS, 20 ml/g tkáně. Po 5 minutovém míchání na elektromagnetické míchačce při pokojové teplotě byla tekutina slita, vyhozena a byla přidána další dávka trypsinu a následovalo dvacetiminutové míchání.

Supernatant byl slit do nádoby s vychlazeným telecím sérem. Přidali jsme další trypsin a znovu pokračovali v natravování tkáně. Proces jsme opakovali, dokud výtěžek buněk nezačal výrazně klesat.

Získaná suspenze buněk byla centrifugována 150 g 5 minut. Sediment byl rozsuspendován v RPMI 1640 obsahujícím 5% FCS, glutamin a antibiotika. Následovala filtrace přes sterilní gázu, centrifugace a rozsuspendování v RPMI 1640 obsahujícím 10% FCS, glutamin a antibiotika.



### **3.9 Statistické zpracování dat**

Získaná data byla zpracována v programu MS Excel. V případě vyhodnocení přežití byl používán program MedCalc.

### **3.10 Pokus č. 1 – Studium různých koncentrací i.t. aplikovaného LPS na růst nádorů melanomu B16-F10 in vivo**

K tomuto pokusu bylo použito 24 samic kmene C57BL/6, které byly dvanáctý den po transplantaci melanomových buněk rozděleny do 4 skupin, kde v každé skupině bylo 6 myší. Látky byly podávány obden: 0(začátek terapie), 2, 4, 6, 8, 10. Před aplikací léčivé látky byla vždy u myší změřena teplota a velikost nádoru, 12, 14, 16 den byla provedena všechna tato měření bez aplikace léčivé látky.

Schéma pokusu bylo následující:

- A) 6 i.t. aplikací po 50 mikrolitrech roztoku 10mg LPS/ml PBS
- B) 6 i.t. aplikací po 50 mikrolitrech roztoku 6 mg LPS/ml PBS
- C) 6 i.t. aplikací po 50 mikrolitrech roztoku 1mg LPS/ml PBS
- D) 6 i.t. aplikací po 50 mikrolitrech PBS

Šestnáctý den terapie byly myši zabity, následně jim byly vypitvány plíce a uloženy k zakonzervování do doby počítání metastáz.

### **3.11 Pokus č. 2 – In vitro studium vlivu LPS na buňky melanomu B16-F10 a na buňky primokultury morčecích ledvin**

Na 96 jamkovou desku bylo napipetováno do 16 jamek po 200 mikrolitrech suspenze melanomových buněk B16-F10 o koncentraci 100 000 buněk/ml RPMI s 10% FCS (tedy 20 000 buněk/jamku).

Do dalších 16 buněk bylo napipetováno rovněž po 200 mikrolitrech suspenze buněk morčecích ledvin o koncentraci 100 000 buněk/ml RPMI s 10% FCS (tedy 20 000 buněk/jamku).

Po 24 hodinách byla media opatrně stažena a do jamek bylo napipetováno po 100 mikrolitrech roztoků LPS v RPMI s 10% FCS. Koncentrace LPS byla 0,0625 mg LPS/ml – 4 mg LPS/ML, vše ve dvou paralelních vzorcích a vše do jamek s oběma typy buněk.

Po dalších 24 hodinách byly buňky sklizeny trypsinizací a jejich počet a vitalita byla zjištěna přidáním trypanové modři a spočítáním v Bürkerově komůrce.

### **3.12 Pokus č. 3 - In vivo studium vlivu LPS o necytotoxické koncentraci na melanom B16-F10**

Pro tento pokus bylo použito 10 samic kmene C57BL/6. Dvanáctý den po transplantaci byly myši rozděleny do skupin. Každá skupina obsahovala 5 myší. Obden od započetí terapie (0), poté ve dnech 2, 4, 6, 8, 10 byla změřena teplota, velikost nádoru a následně proběhla aplikace látky, která byla prováděna následujícím způsobem:

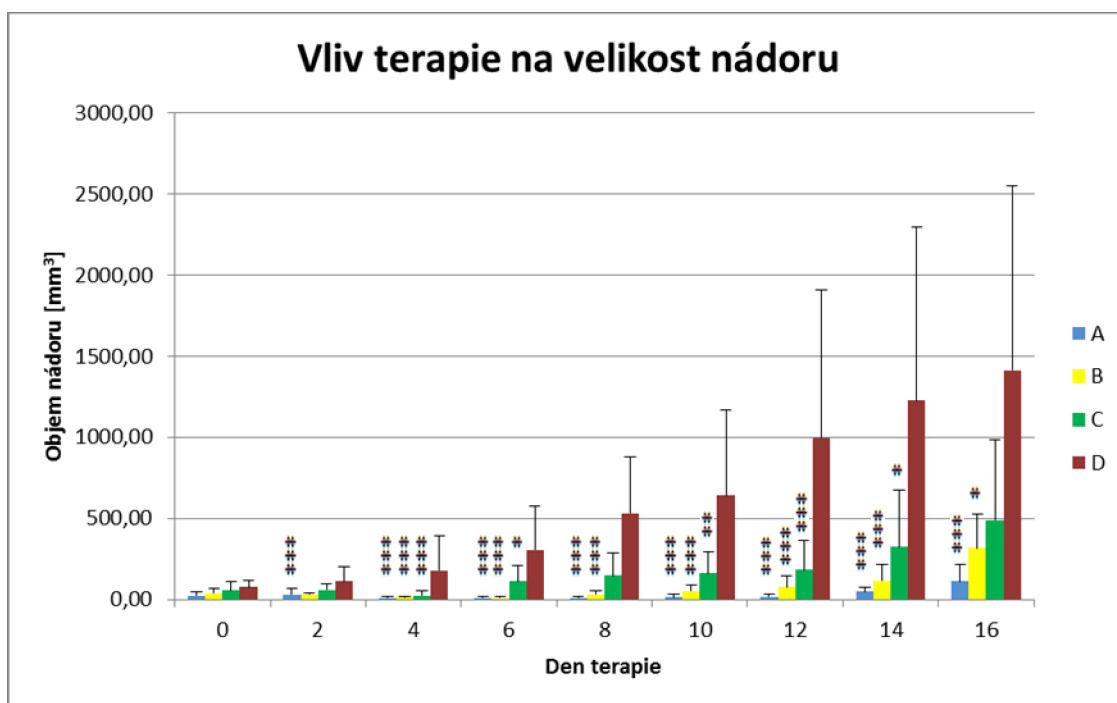
- A) 6 i.t. aplikací po 50 mikrolitrech roztoku 0,5mg LPS/ml PBS
- B) 6 i.t. aplikací po 50 mikrolitrech PBS

Dvanáctý a čtrnáctý den terapie se provedlo pouze měření teploty a velikosti nádoru bez podání látky. U všech myší bylo dále sledováno přežití.

## 4 Výsledky

### 4.1 Pokus č. 1 - Studium různých koncentrací i.t. aplikovaného LPS na růst nádorů melanomu B16-F10 in vivo

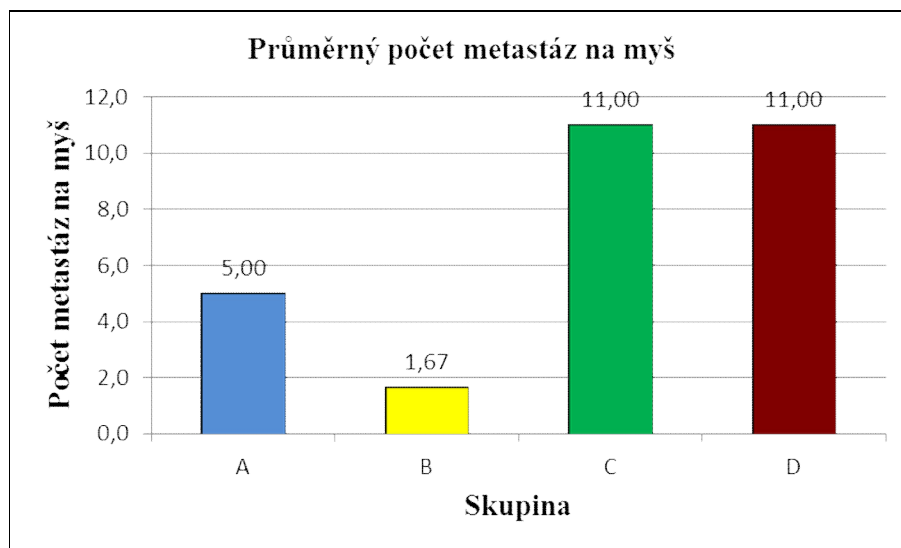
Tímto pokusem jsme se snažili, zjistit, jak aplikace LPS podávaná v různých koncentracích ovlivňovala velikost nádoru. Jak ukazuje Obrázek 4, všechny podávané koncentrace vykazovaly statisticky velmi významnou účinnost. Léčba byla nejúčinnější u skupiny A a B. U skupiny A si můžeme všimnout, že došlo ke zmenšení nádorů a zastavení jejich růstu. Čtrnáctý den terapie došlo sice ke zvětšení nádoru, ale nádory v této skupině byly stále statisticky velmi významně menší, než v kontrole. Podobných výsledků bylo dosaženo i u skupiny B, ve které došlo dříve ke zvětšování nádorů.



**Obr. 4:** Vliv terapie na průměrnou velikost nádorů. (Skupina A – LPS (10mg/ml), Skupina B – LPS (6mg/ml), skupina C – LPS (1mg/ml), Skupina D – kontrola (PBS))

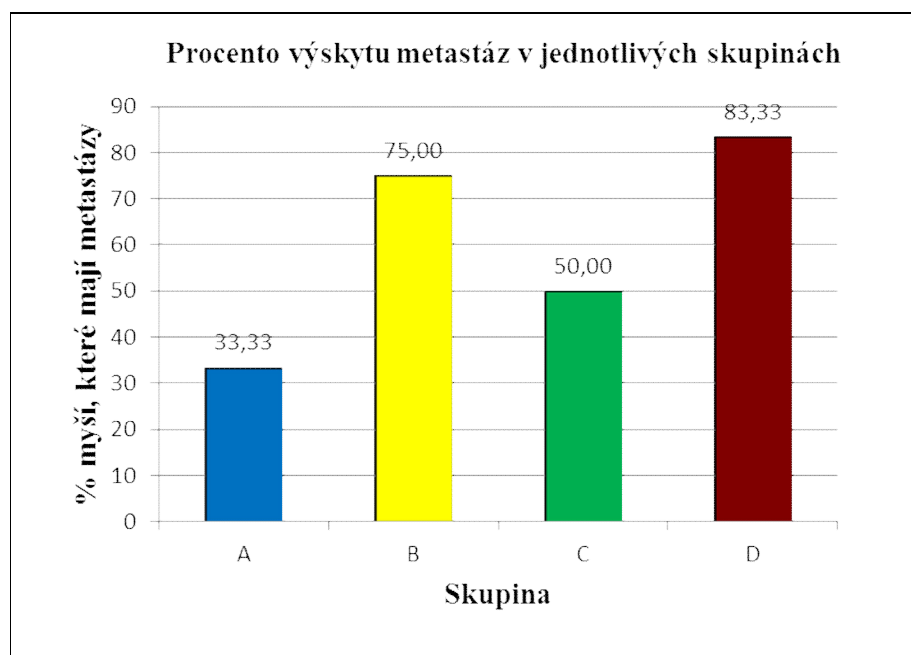
\* =  $P \leq 0,05$     \*\* =  $P \leq 0,001$     \*\*\* =  $P \leq 0,005$

Na obrázku 5 můžeme vidět vliv terapie na intenzitu metastázování, tedy průměrný počet metastáz u myši, u kterých byly metastázy zjištěny. Můžeme říci, že u myši, kterým byly aplikovány vyšší koncentrace LPS, se vyskytoval menší počet metastáz oproti skupině C, které byly podávány nízké koncentrace a kontrolní skupině D.



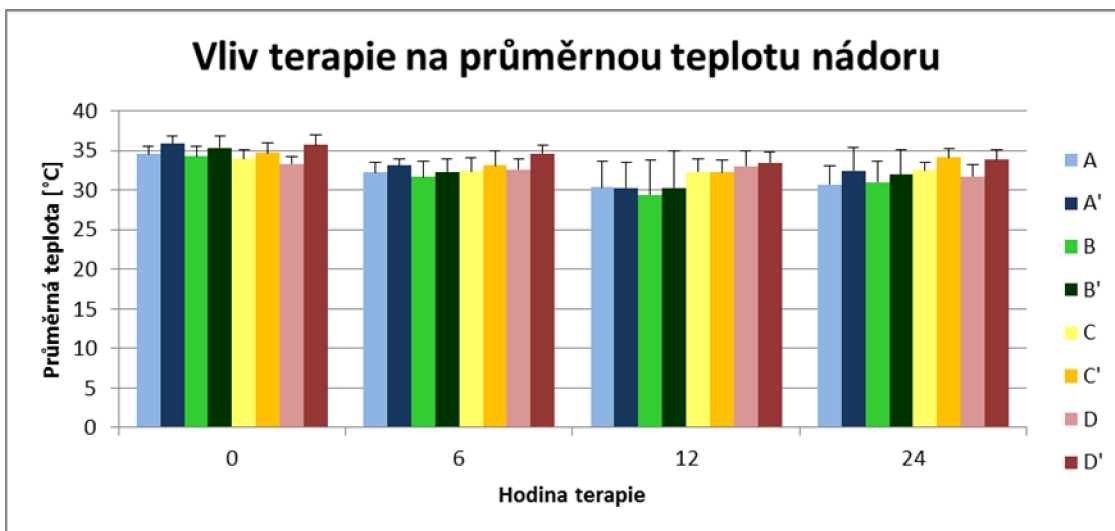
**Obr. 5:** *Intenzita metastázování. (Skupina A – LPS (10mg/ml), Skupina B – LPS (6mg/ml), skupina C – LPS (1mg/ml), Skupina D – kontrola (PBS))*

Následující obrázek 6 znázorňuje procento výskytu metastáz v jednotlivých skupinách. Můžeme konstatovat určitý podpůrný, ale ne příliš výrazný vliv léčby.

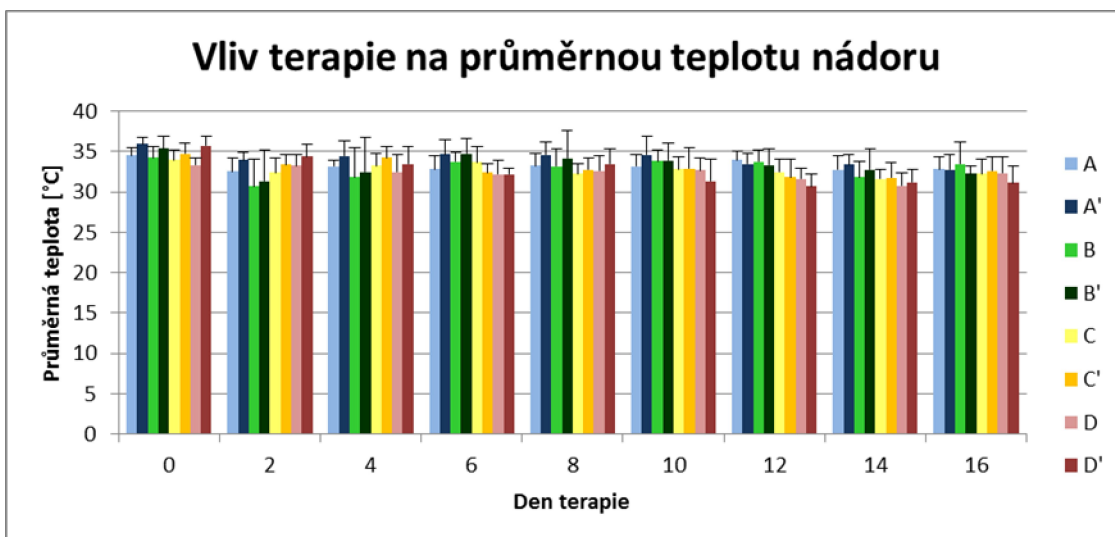


**Obr. 6:** Procento výskytu metastáz v jednotlivých skupinách. (Skupina A – LPS (10mg/ml), Skupina B – LPS (6mg/ml), skupina C – LPS (1mg/ml), Skupina D – kontrola (PBS))

Dalším zjišťovaným parametrem byl vliv léčby na teplotu nádorů. Na obrázku 7 vidíme teploty nádorů v jednotlivých skupinách měřené v intervalech 0, 6, 12, 24 hod. Obrázek 8 pak ukazuje teploty v intervalech 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 den terapie. Teplota nádoru se příliš neliší od teploty druhého boku. Teploty celkově nijak neodrážejí způsob terapie a výsledky působení LPS na nádorový růst.



**Obr. 7:** Vliv terapie na průměrnou teplotu nádorů. (Skupina A, A' – LPS (10mg/ml), Skupina B, B' – LPS (6mg/ml), skupina C, C' – LPS (1mg/ml), Skupina D, D' – kontrola (PBS))



**Obr. 8:** Vliv terapie na průměrnou teplotu nádorů. (Skupina A, A' – LPS (10mg/ml), Skupina B, B' – LPS (6mg/ml), skupina C, C' – LPS (1mg/ml), Skupina D, D' – kontrola (PBS))

Skupiny A, B, C – teploty nádorů

Skupiny A', B', C' - teploty druhého boku

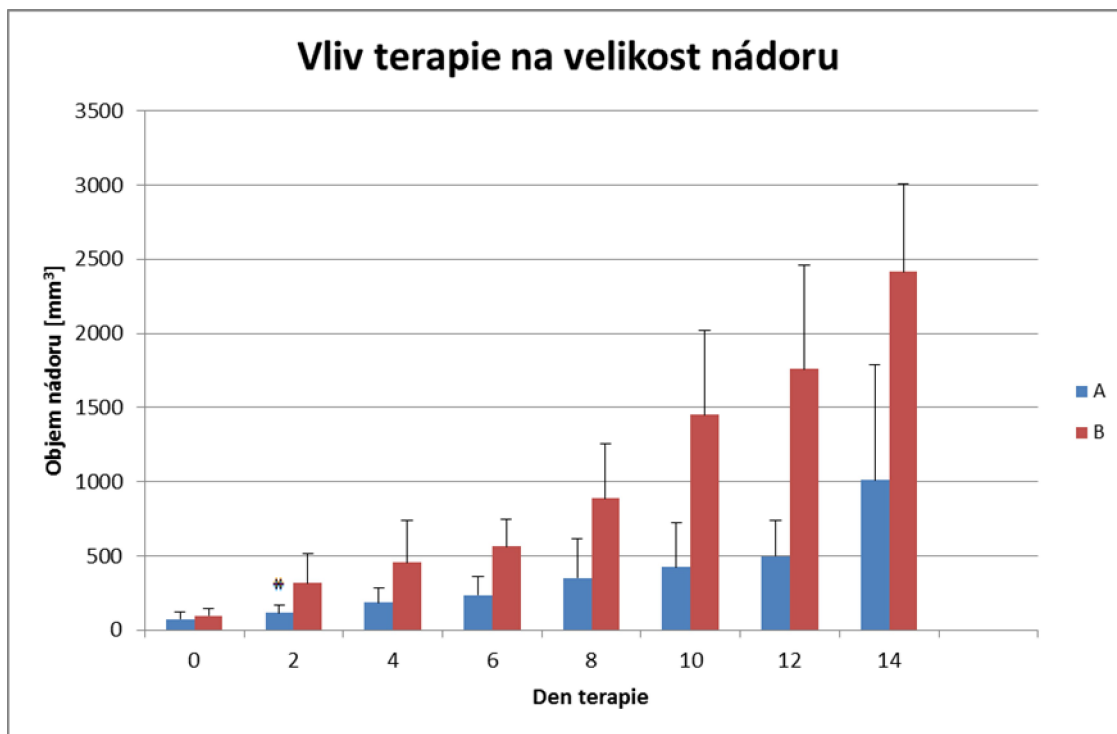
## **4.2 Pokus č. 2 - In vitro studium vlivu LPS na buňky melanomu B16-F10 a na buňky primokultury morčecích ledvin**

Již během prvních 10 minut došlo u nejvyšší koncentrace LPS (4 mg/ml) k úplné lýze jak nádorových, tak buněk morčecích ledvin. Koncentrace 2 mg/ml způsobila shluky většiny nádorových buněk, u morčecích ledvin se shlukovala jen část buněk.

Po 24 hodinách bylo zjištěno, že LPS v koncentracích 1-4 mg/ml vyvolává úplnou likvidaci nádorových buněk. Nižší koncentrace (0,0625 – 0,5 mg/ml) neměly ani na nádorové buňky, ani na buňky morčecích ledvin žádný vliv. Bylo nalezeno takové množství živých nádorových buněk, které odpovídalo kontrole bez LPS, to je průměrně 120 500 nádorových buněk a 23 000 buněk morčecích ledvin na jamku (v kontrolách bylo průměrně 118 000 nádorových a 18 500 buněk morčecích ledvin na jamku).

## **4.3 Pokus č. 3 - In vivo studium vlivu LPS o necytotoxické koncentraci na melanom B16-F10.**

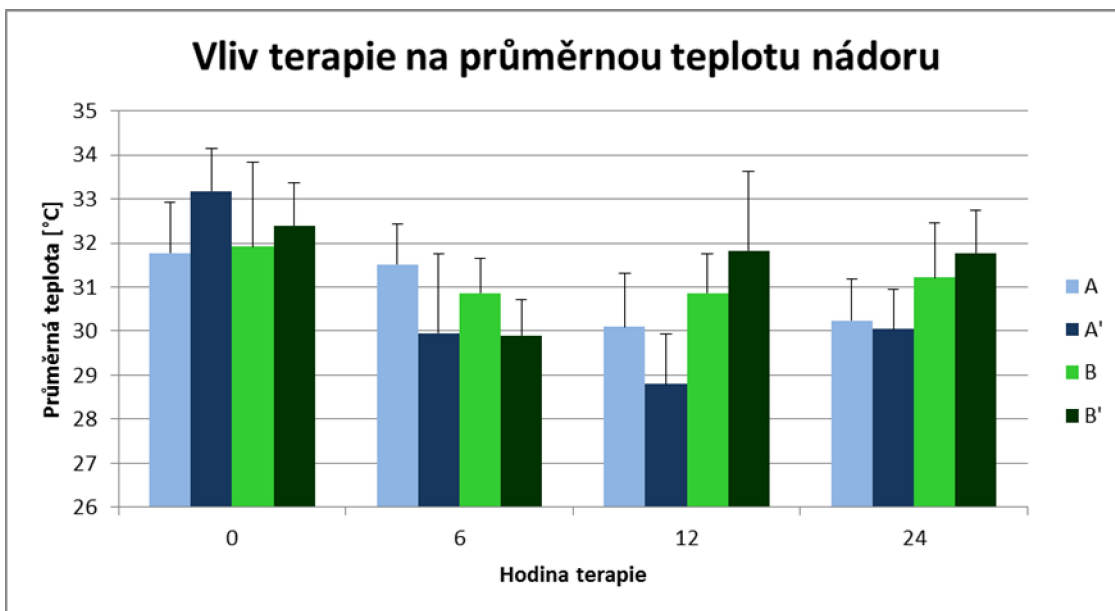
Cílem tohoto pokusu bylo zjistit, jak se s použitím nižší koncentrace změní účinek léčby na velikost nádorů. Na obrázku 9 vidíme růst nádoru s časem u neléčené skupiny B, ve srovnání se skupinou A, kde terapie snižuje růst nádorů. Větší nárůst jsme zaznamenali až 14. den terapie.



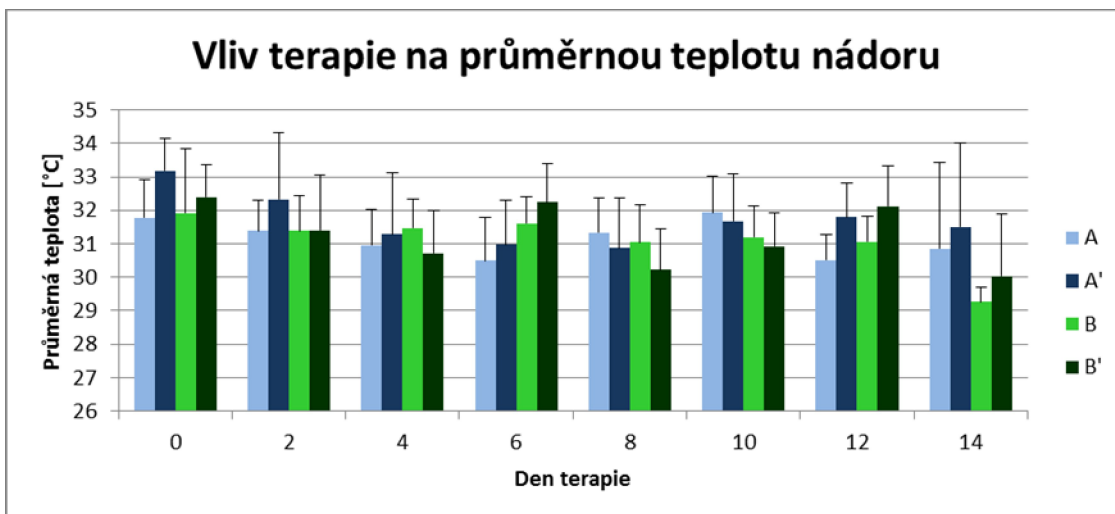
**Obr. 9:** *Vliv terapie na průměrnou velikost nádorů. (Skupina A – LPS (0,5mg/ml), Skupina B – kontrola (PBS))*

Obrázek 10 a 11 opět znázorňuje vliv léčby na průměrnou teplotu nádorů. Kromě určitého trendu spočívajícím v postupném snižování teplot během celého experimentu nelze najít žádnou reflexi působení LPS na nádorový růst.



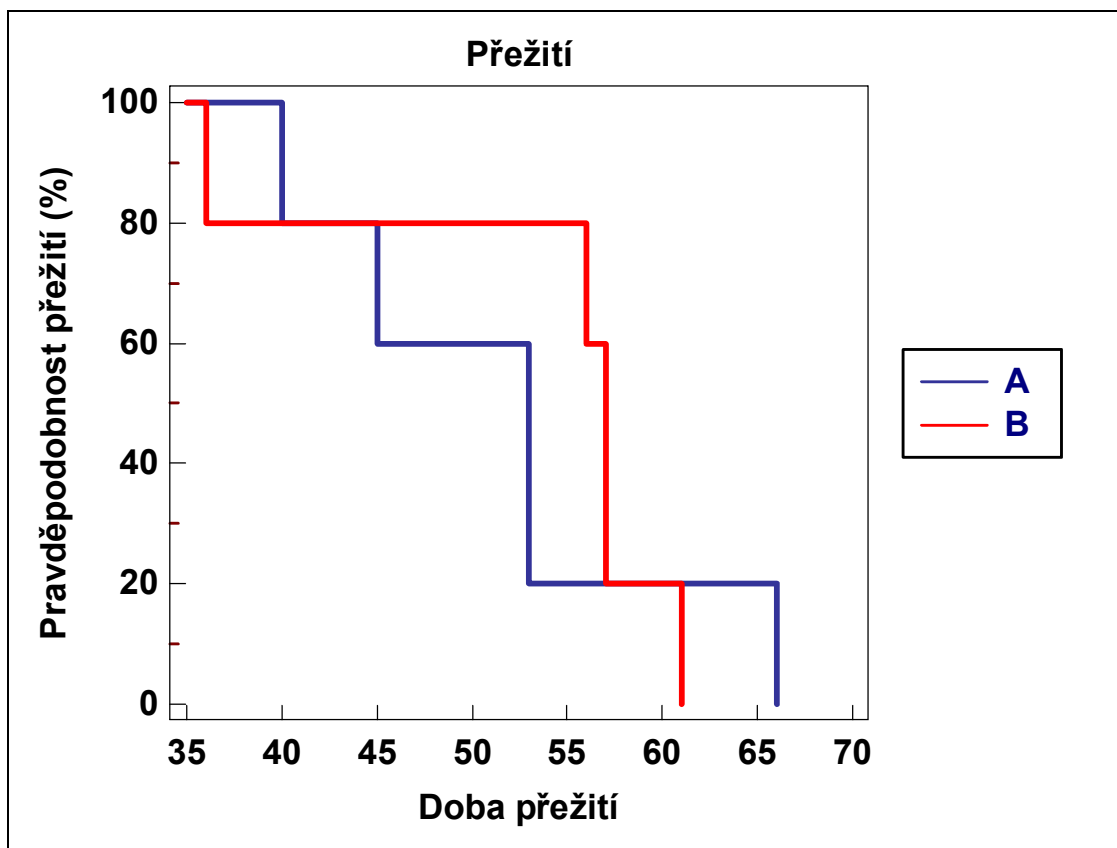


**Obr. 10 :** Vliv terapie na průměrnou teplotu nádorů. (Skupina A, A' – LPS (0,5mg/ml), Skupina B, B' - kontrola (PBS))



**Obr. 11:** Vliv terapie na průměrnou teplotu nádorů. (Skupina A, A' – LPS (0,5mg/ml), Skupina B, B' - kontrola (PBS))

Obrázek 12 udává výsledek analýzy doby přežití ve sledovaných skupinách. Mezi oběma skupinami nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl v přežití.



Obr. 12: Vyhodnocení doby přežití. (Skupina A – LPS (0,5mg/ml), Skupina B – kontrola (PBS))

## 5 Diskuze

Ve všech provedených experimentech jsme zjistili, že LPS působí proti nádorům. V prvním experimentu jsme dokázali nejen určitý protimetastázový efekt, ale především statisticky velmi významný účinek projevující se nejen velmi výraznou redukcí nádorového růstu, ale i přechodným zmenšením nádorů, což potvrzuje i práce Čechové, 2010. Obdobných výsledků dosáhl i Mariani a kol. 2007 nebo Chicoine a kol. 2001, jejich výsledky byly při použití srovnatelných koncentrací lepší než v našem případě, ale to můžeme připisovat nádoru, na kterém byla léčba pozorována. Používali značně arteficiální podkožně transplantované gliomy, kdežto v našich pokusech byl používán agresivní a rychle rostoucí model melanomu. V jejich studiích, ale i v našem prvním experimentu byly však použity velmi vysoké koncentrace LPS, které jsou toxické, a použití takovýchto koncentrací u lidí by bylo smrtelné.

V druhém in vitro experimentu jsme si ověřili, že koncentrace, které jsme v prvním experimentu použili, a rovněž koncentrace používané v uvedených studiích jsou natolik vysoké, že způsobují přímý cytotoxický vliv na nádorové i normální buňky a nemohou tedy uvedené studie být vydávány za imunologické. Vysvětlením je zřejmě přímá interakce lipofilních řetězců LPS s nepolární mezivrstvou membrán. LPS jakožto agonista TLR4 samozřejmě spustí kaskádu reakcí vedoucích k syntéze prozánětlivých cytokinů, nicméně podíl přímé cytotoxicity nelze stanovit. Proto jsme určili v in vitro experimentu mez použitelnosti LPS, za kterou není možné se vydávat při imunologických experimentech.

V třetím experimentu jsme ověřili, že nalezená koncentrace LPS působí více než 50% redukci nádorového růstu, byť jen na hranici statistické významnosti.

LPS o vhodné koncentraci bude využit jako modelová látka pro stimulaci signálních receptorů vrozené imunity při studiu jejich synergie s aktivací receptorů fagocytárních. Jak bylo zjištěno, tato synergie je spojena se silným protinádorovým účinkem (Ženka, *ústní sdělení*). Další etapou pak bude nahrazení LPS jinými, pro člověka neškodnými, agonisty TLR.

## 6 Závěr

- Bylo prokázáno velmi výrazné zpomalení růstu nádorů a přechodná redukce jejich objemu při i. t. aplikaci LPS na modelu myš/ melanom B16–F10. Byl rovněž zjištěn částečný vliv vyšších koncentrací LPS na redukci metastázování.
- V *in vitro* experimentu jsme zjistili, že vyšší koncentrace LPS působí přímým cytotoxickým vlivem na nádorové buňky a způsobují jejich lyzování. Byl nalezen práh, od kterého nižší koncentrace již žádnou cytotoxicitu nevyvolávají.
- Bylo ověřeno, že i tato koncentrace je schopna vyvolat více než 50% redukci nádorového růstu a je diskutováno použití LPS o této koncentraci v experimentech zaměřených na studium vlivu vrozené imunity na nádory.
- Měření povrchové teploty nádoru a myši se ukázalo jako nevhodné pro monitorování tohoto druhu experimentů.

## 7 Seznam použité literatury

**Boyd, J. A., Barrett, J. C.** 1990 *Genetic and cellular basis of multistep carcinogenesis*. Pharmacology & Therapeutics. 46: 469–486.

**Bremers, A. J. A., Kuppen, P. J. K., Parmiani, G.** 2000 *Tumour immunotherapy: the adjuvant treatment of the 21st century?* European Journal of Surgical Oncology. 26: 418-424.

**Bremers, A. J. A., Parmiani, G.** 2000 *Immunology and immunotherapy of human cancer: present concepts and clinical developments*. Critical Reviews in Oncology/Hematology. 34: 1-25.

**Cassel, S. Z., Joly, S., Sutterwala, F. S.** 2009 *The NLRP3 inflammasome: A sensor of immune danger signals*. Seminars in Immunology. 21: 194-198.

**Clark, R., Kupper, T.** 2005 *Old meets new: the interaction between innate and adaptive immunity*. The Journal of investigative dermatology. 125: 629-637.

**Čechová, M.** 2010 *Studium možnosti ovlivnění metastázování pomocí proenzymoterapie*. České Budějovice, diplomová práce PřF JU. 83 s.

**Dostert, C., Meylan, E., Tschopp, J.** 2008 *Intracellular pattern-recognition receptors*. Advanced Drug Delivery Reviews. 60: 830-840.

**Doucas, H., Berry, D.** 2006 *Basic principles of the molecular biology of cancer I. Surgery*. 24: 43-47.

**Durrant, L. G., Scholefield, J. H.** 2003 *Principles of cancer treatment by immunotherapy*. Surgery. 21: 277–279.

**Erridge, C., Bennett-Guerrero, E., Poxton, I. R.** 2002 *Structure and function of lipopolysaccharides*. Microbes and Infection. 4: 837–851.

**Feinberg, A. P.** 2004 *The epigenetics of cancer etiology*. *Seminars in Cancer Biology*. 14: 427–432.

**Freudenberg, M. A., Tchaptchet, S., Keck, S., Fejer, G., Huber, M., Schütze, N., Beutler, B., Galanos, C.** 2008 *Lipopolysaccharide sensing an important factor in the innate immune response to Gram-negative bacterial infections: Benefits and hazards of LPS hypersensitivity*. *Immunobiology*. 213: 193-203.

**Fujihara, M., Muroi, M., Tanamoto, K., Suzuki, T., Azuma, H., Ikeda, H.** 2003 *Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide: roles of the receptor complex*. *Pharmacology & Therapeutics*. 100: 171– 194.

**Fukata, M., Vamadevan, A.S., Abreu, M. T.** 2009 *Toll-like receptors (TLRs) and Nod-like receptors (NLRs) in inflammatory disorders*. *Seminars in Immunology*. 21: 242–253.

**Garbe, C., Peris, K., Hauschild, A., Saiag, P., Middleton, M., Spatz, A., Grob, J. J., Malvehy, J., Newton-Bishop, J., Stratigos, A., Pehamberger, H., Eggermont, A.** 2010 *Diagnosis and treatment of melanoma: European consensus-based interdisciplinary guideline*. *European Journal of Cancer*. 46: 270-283.

**Garg, A. D., Nowis, D., Golab, J., Vandenabeele, P., Krysko, D. V., Agostinis, P.** 2010 *Immunogenic cell death, DAMPs and anticancer therapeutics: An emerging amalgamation*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. 1805: 53-71.

**Hanahan, D., Weinberg, R. A.** 2000 *The hallmarks of cancer*. *Cell*. 100: 57–70.

**Hansen, J. D., Vojtech, L. N., Laing, K. J.** 2011 *Sensing disease and danger: A survey of vertebrate PRRs and their origins*. *Developmental and Comparative Immunology*. 35: 886–897.

**Hejmadi, M.** 2010 *Introduction to Cancer Biology*. Dánsko: Ventus Publishing ApS. 46s.

**Hořejší, V., Bartůňková, J.** 2009 *Základy imunologie. 4. vydání*. Praha: Triton. 290 s.

**Chamuleau, M. E. D., Ossenkoppele, G. J., van de Loosdrecht, A. A.** 2006 *MHC class II molecules in tumour immunology: Prognostic marker and target for immune modulation.* Immunobiology. 211: 619-625.

**Chatelain, C., Ciarletta, P., Amar, M. B.** 2011 *Morphological changes in early melanoma development: Influence of nutrients, growth inhibitors and cell-adhesion mechanisms.* Journal of Theoretical Biology. 290: 6–59.

**Chicoine, M. R., Won, E. K., Zahner, M. C.** 2001 *Intratumoral Injection of Lipopolysaccharide Causes Regression of Subcutaneously Implanted Mouse Glioblastoma Multiforme.* Neurosurgery. 48: 607–615.

**Cho, Y. J., Ahn, B. J., Lee, N. G., Lee, D. H., Kim, D. S.** 2006 *A combination of E. coli DNA fragments and modified lipopolysaccharides as a cancer immunotherapy.* Vaccine. 24: 5862–5871.

**Inaba, M., Tashiro, T., Kobayashi, T., Fujimoto, S., Sakurai, Y., Maruo, K., Ohnishi, Y., Ueyama, Y., Nomura, T.** 1986 *Evaluation of response rates to various antitumor agents of human gastric tumors implanted in nude mouse.* Japanese Journal of Cancer Research. 77: 190-196.

**Jeannin, J. F.** 2009 *Lipid A in Cancer Therapy.* New York: Springer. 136 s.

**Jeannin, P., Jaillon, S., Delneste, Y.** 2008 *Pattern recognition receptors in the immune response against dying cells.* Current Opinion in Immunology. 20: 530-537.

**Jinushi, M., Dranoff, G.** 2007 *Immunosurveillance: Innate and Adaptive Antitumor Immunity.* In: Prendergast, G. C., Jaffee, E. M., editors. Cancer Immunotherapy: Immune suppression and Tumour Growth.. New York: Elsevier Academic Press. 29-41.

**Knowles, M. A., Selby, P. J.** 2005 *Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer. Fourth Edition.* New York: Oxford University Press. 532 s.

- Lewicky, J. D., Ulanova, M., Jiang, Z. H.** 2011 *Synthesis of a dimeric monosaccharide lipid A mimic and its synergistic effect on the immunostimulatory activity of lipopolysaccharide*. Carbohydrate Research. 346: 1705-1713.
- Lu, Y. C., Yeh, W. C., Ohashi, P. S.** 2008 *LPS/TLR4 signal transduction pathway*. Cytokine. 42: 145–151.
- Lundin, J. A., Checkoway, H.** 2009 *Endotoxin and cancer*. Environ Health Perspect. 117: 1344-50.
- Mačák, J., Mačáková, J.** 2004 *Patologie*. Praha: Grada Publishing. 376 s.
- Mačák, J.** 2002 *Obečná Patologie*. Olomouc: Vydavatelství UP. 189 s.
- Mariani, C. L., Rajon, D., Bova, F. J., Streit, W. J.** 2007 *Nonspecific immunotherapy with intratumoral lipopolysaccharide and zymosan A but not GM-CSF leads to an effective anti-tumor response in subcutaneous RG-2 gliomas*. Journal of Neuro-Oncology. 85: :231-240.
- Maruyama, K., Selmani, Z., Ishii, H., Yamaguchi, K.** 2011 *Innate immunity and cancer therapy*. International Immunopharmacology. 11: 350- 357.
- Molinaro, A., Newman, M. A., Lanzetta, R., Parrilli, M.** 2009 *The Structures of Lipopolysaccharides from Plant-Associated Gram-Negative Bacteria*. European Journal of Organic Chemistry. 34: 5887-5896.
- Mukhopadhyay, S., Gordon, S.** 2004 *The role of scavenger receptors in pathogen recognition and innate immunity*. Immunobiology. 209: 39–49.
- 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: 791-798.



**Oblak, A., Jerala, R.** 2011 *Toll-Like Receptor 4 Activation in Cancer Progression and Therapy. Clinical and Developmental Immunology*. New York: Hindawi Publishing Corporation. 12s.

**Panno, J.** 2005 *Cancer: The Role of Genes, Lifestyle, and Environment*. New York: Facts On File. 162 s.

**Patwardhan, S. H., Dhawan, A. P., Relue, P. A.** 2003 *Classification of melanoma using tree structured wavelet transforms*. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*. 72: 223-239.

**Peiser, L., Mukhopadhyay, S., Gordon, S.** 2002 *Scavenger receptors in innate immunity*. *Current Opinion in Immunology*. 14: 123-128.

**Pelengaris, S., Khan, M.** 2006 *The Molecular Biology of Cancer*. Oxford: Blackwell Publishing. 531s.

**Raetz, C. R. H., Reynolds, C. M., Trent, M. S., Bishop, R. E.** 2007 *Lipid A modification systems in gram-negative bacteria*. *Annual Review of Biochemistry*.76: 295-329.

**Rajendran, K. V., Zhang, J., Liu, S., Kucuktas, H., Wang, X., Liu, H., Sha, Z., Terhune, J., Peatman, E., Liu, Z.** 2012 *Pathogen recognition receptors in channel catfish: I. Identification, phylogeny and expression of NOD-like receptors*. *Developmental and Comparative Immunology*. 37: 77-86.

**Reisser, D., Pance, A., Jeanin, J. F.** 2002 *Mechanisms of the antitumoral effect of lipid A*. *Bioessays*. 24: 284-289.

**Rosenfeld, Y., Papo, N., Shai, Y.** 2006 *Endotoxin (Lipopolysaccharide) Neutralization by Innate Immunity Host-Defense Peptides.: Peptide Properties and Plausible Modes of Action*. *The Journal of Biological Chemistry* 281: 1636–1643.

**Ruddon, R. W.** 2007 *Cancer Biology*. New York: Oxford University Press. 568 s.

- Russo, G. L.** 2007 *Ins and outs of dietary phytochemicals in cancer chemoprevention*. *Biochemical Pharmacology*. 74: 533-544.
- Sawan, C., Vaissiere, T., Murr, R., Herceg, Z.** 2008 *Epigenetic drivers and genetic passengers on the road to cancer*. *Mutation Research*. 642: 1-13.
- Scolyer, R. A., Long, G. V., Thompson, J. F.** 2011 *Evolving concepts in melanoma classification and their relevance to multidisciplinary melanoma patient care*. *Molecular Oncology*. 5: 124-136.
- Sengupta, N., MacFie, T. S., MacDonald, T. T., Pennington, D., Silver, A. R.** 2010 *Cancer immunoediting and "spontaneous" tumor regression*. *Pathology – Research and Practice*. 206: 1–8.
- Shaw, M. H., Reimer, T., Kim, Y. G., Nunez, G.** 2008 *NOD-like receptors (NLRs): bona fide intracellular microbial sensors*. *Current Opinion in Immunology*. 20:377–382.
- Schulz, W. A.** 2005 *Molecular Biology of Human Cancers*. Dordrecht: Springer. 508 s.
- Smith, J. J., Tully, P., Padberg, R. M.** 2005 *Chemoprevention: A Primary Cancer Prevention Strategy*. *Seminars in Oncology Nursing*. 21: 243–251.
- Sugimura, T., Ushijima, T.** 2000 *Genetic and epigenetic alterations in carcinogenesis*. *Mutation Research*. 462: 235–246.
- Tsung, K., Norton, J. A.** 2006 *Lessons from Coley's Toxin*. *Surgical Oncology*. 15: 25–28.
- Turvey, S. E., Broide, D. H.** 2010 *Innate immunity*. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 125: S24-S32.
- Underhill, D. M., Gantner, B.** 2004 *Integration of Toll-like receptor and phagocytic signaling for tailored immunity*. *Microbes and Infection*. 6: 1368–1373.

- Vetvicka, V., Dvorak, B., Vetvickova, J., Richter, J., Krizan, J., Sima, P., Yvin, J. C.** 2007 *Orally administered marine (1→3)-β-D-glucan Phycarine stimulates both humoral and cellular immunity*. *International Journal of Biological Macromolecules*. 40: 291-298.
- Wang, R., Chandawarkar, R. Y.** 2010 *Phagocytosis of Fungal Agents and Yeast Via Macrophage Cell Surface Scavenger Receptors*. *Journal of Surgical Research*. 164: e273–e279.
- Wang, X., Quinn, P. J.** 2010 *Lipopolysaccharide: Biosynthetic pathway and structure modification*. *Progress in Lipid Research*. 49: 97–107.
- Whelan, M., Whelan, J., Russell, N., Dalglish, A.** 2003 *Cancer immunotherapy: an embarrassment of riches?* *Drug Discovery Today*. 8: 253-258.
- Wu, X., Patterson, S., Hawk, E.** 2011 *Chemoprevention – History and general principles*. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 25: 445–459.
- Yee, C.** 2006 *Tumor Immunity and Immunotherapy*. In: Pelengaris, S., Khan, M., editors. *The Molecular Biology of Cancer*. Oxford: Blackwell Publishing. 389-410.
- Ziech, D., Anastopoulos, I., Hanafi, R., Voulgaridou, G. P., Franco, R., Georgakilas, A. G., Pappa, A., Panayiotidis, M. I.** 2012 *Pleiotropic effects of natural products in ROS-induced carcinogenesis: The role of plant-derived natural products in oral cancer chemoprevention*. *Cancer Letters*. Elektronická forma před vytisknutím.