

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**POUŽITÍ AGONISTŮ FAGOCYTÁRNÍCH
RECEPTORŮ PRO TERAPII NÁDOROVÝCH
ONEMOCNĚNÍ A STUDIUM MOŽNOSTI
ZESÍLENÍ JEJICH ÚČINKŮ SOUČASNOU
STIMULACÍ TLR RECEPTORŮ**

Diplomová práce

Bc. Nikol Vácová

Vedoucí práce: RNDr. Jan Ženka, CSc.

České Budějovice 2015

Vácová, N., 2015: Použití agonistů fagocytárních receptorů pro terapii nádorových onemocnění a studium možnosti zesílení jejich účinků současnou stimulací TLR receptorů. [The use of agonist of phagocytic receptors for cancer therapy and the study of the possibility to increase their effect by stimulation of TLR receptors. Mgr. Thesis, in Czech] – 64 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, the Czech Republic.

Anotace:

Binding of agonist of phagocytic receptors on surface of tumor cells caused significant reduction of tumor growth. This reduction was enhanced by stimulation of TLR receptors. This immunotherapy combines ligation of phagocytic receptors and signaling receptors to achieve anti-tumor effect. The next part of this thesis was focused on the study of mechanism of the anti-tumor activity of neutrophils.

Prohlášení:

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

Prohlašuji, že 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, 24. dubna 2015

.....
Bc. Nikol Vácová

Poděkování:

Ráda bych poděkovala svému školiteli RNDr. Janu Ženkovi, CSc. za ochotu a trpělivost, s jakou mi věnoval čas, prostor a cenné rady. Nemalou pomoc mi poskytla i Mgr. Liesková, PhD., za což ji též velmi děkuji.

OBSAH:

1. Úvod.....	1
1.1 Dělení nádorů.....	1
1.2 Melanom jako model použitý v této práci	2
1.3 Myší melanom B16-F10	2
2. Nádor a imunitní systém	3
2.1 Rozpoznávání a mechanismy vrozené imunity.....	3
2.2 Rozpoznávání a mechanismy získané imunity	4
2.3 Mechanismy odolnosti nádoru vůči imunitnímu systému.....	5
2.3.1 Chybějící a alternativní MHC	6
2.3.2 Produkce TGF- β nádorovými buňkami	6
2.3.3 Interakce Fas-receptoru a Fas-ligandu.....	7
2.3.4 „Don't eat me“ signály	7
2.3.5 Obrana proti komplementu	8
2.3.6 Inhibitory serinových proteáz	8
3. Imunoterapie nádorových onemocnění.....	9
3.1 Vybrané imunomodulační látky.....	10
3.1.1 Manan	10
3.1.2 N-formyl-methionin-leucin-fenylalanin (f-MLF)	11
3.1.3 Laminarin	11
4. Úloha neutrofilů v terapii nádorů.....	12
4.1 N1 a N2 fenotyp neutrofilů.....	12
4.2 Aktivace neutrofilů a jejich zabíječské schopnosti	13
4.3 Prozánětlivá buněčná signalizace přes NF- κ B.....	14
4.3.1 Aktivace NF- κ B v neutrofilech stimulovaných TNF- α	15
4.3.2 GM-CSF aktivuje NF- κ B přímo	15
4.3.3 Dectin-1/Syk signální dráha.....	15
5. Cíle práce.....	16
6. Materiál a metody	17
6.1 Chemikálie	17
6.2 Laboratorní zvířata a nádorové buněčné linie.....	18
6.3 Příprava melanomových buněk pro <i>in vivo</i> pokusy	18

6.4 Transplantace melanomových buněk	18
6.5 Příprava terapeutických látek.....	18
6.5.1 Příprava f-MLFKK-BAM.....	18
6.5.2 Příprava laminarin-BAM a manan-BAM	19
6.5.3 Příprava f-MLFKK-DOPE.....	19
6.6 Měření velikosti nádorů.....	19
6.7 Počítání plicních metastáz	19
6.8 Příprava melanomových buněk pro <i>in vitro</i> pokusy	19
6.9 Příprava neutrofilů pro <i>in vitro</i> pokusy	20
6.9.1 Izolace neutrofilů kostní dřeně a jejich aktivace.....	20
6.9.2 Izolace neutrofilů z břišní dutiny.....	20
6.10 Příprava erytrocytů pro <i>in vitro</i> pokusy.....	21
6.11 Statistická analýza dat	21
6.12 Pokusy	21
6.12.1 Studium možnosti použití agonisty TLR7 Imiquimodu (R-837) v imunoterapii nádorů s vázaným manan-BAM	21
6.12.2 Chemoatrakce neutrofilů do oblasti nádoru pomocí f-MLF a vliv této terapie na růst nádoru s ukotveným mananem.....	22
6.12.3 Vliv intratumorální aplikace aktivovaných neutrofilů v kombinaci s manan-BAM na růst nádoru.....	22
6.12.4 <i>In vitro</i> analýza cytotoxického efektu neutrofilů na nádorové buňky	23
6.12.5 Vliv fagocytárního ligandu na tvorbu shluků buněk <i>in vitro</i>	24
6.12.6 Tvorba interakcí buněk B16-F10 a myších neutrofilů.....	25
6.12.7 Buněčná signalizace.....	26
7. Výsledky	28
7.1 Studium možnosti použití agonisty TLR7 Imiquimodu (R-837) v imunoterapii nádorů s vázaným manan-BAM.....	28
7.2 Chemoatrakce neutrofilů do oblasti nádoru pomocí f-MLF a vliv této terapie na růst nádoru s ukotveným mananem	30
7.3 Vliv intratumorální aplikace aktivovaných neutrofilů v kombinaci s manan-BAM na růst nádoru	32
7.4 <i>In vitro</i> analýza cytotoxického efektu neutrofilů na nádorové buňky.....	34
7.5 Vliv fagocytárního ligandu na tvorbu shluků buněk <i>in vitro</i>	37
7.6 Tvorba interakcí buněk B16-F10 a myších neutrofilů	42

7.7 Buněčná signalizace	47
8. Diskuze	49
9. Závěr.....	56
10. Seznam citované literatury	57

SEZNAM ZKRATEK:

BAM biokompatibilní kotva do membrány (*biocompatible anchor for membranes*)

CD označení povrchových molekul leukocytů (*cluster of differentiation*)

CR komplement receptor

DAMPs s poškozením asociované molekulární vzory (*damage-associated molecular patterns*)

DMSO dimethylsulfoxid

EDTA kyselina ethylendiamintetraoctová

f-MLF formylmethioninový peptid

FPRs formylpeptidové receptory

Fas receptor Fas ligandu, transmembránový protein

FasL ligand Fas receptoru, transmembránový protein

FCS fetální telecí sérum (*fetal calf serum*)

GM-CSF růstový faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů (*granulocyte-macrophage colony stimulating factor*)

i.t. intratumorálně

IL interleukin (např. IL-2 – interleukin-2)

LPS lipopolysacharid

MBL manan vázající lektin (*mannan binding lectin*)

MHC I hlavní histokompatibilní komplex třídy I (*major histocompatibility complex*)

mRNA messenger RNA

NETs neutrofilní extracelulární pasti (*neutrophil extracellular traps*)

NK buňky přirození zabíječi (*natural killer*)

PAMPs s patogeny asociované molekulární vzory (*pathogen-associated molecular patterns*)

PBS fosfátem pufovaný fyziologický roztok (*phosphate buffered saline*)

PKC protein kináza C

PMA forbol-12-myristát-13-acetát (*phorbol myristate acetate*)

PRRs vzory rozpoznávající receptory (*pattern recognition receptors*)

ROS reaktivní formy kyslíku (*reactive oxygen species*)

s.c. subkutánně

TAM makrofágy v oblasti nádoru (*tumor associated macrophages*)

TAN neutrofilny v oblasti nádoru (*tumor associated neutrophils*)

TGF- β transformující růstový faktor beta (*transforming growth factor beta*)

TLRs Toll-like receptory

TNF- α faktor nekrotizující tumory alfa (*tumor necrosis factor alpha*)

TRF *time-resolved fluorescence*

1. ÚVOD

Výskyt nádorových onemocnění je celosvětově rozšířený a závažný problém především v rozvinutých zemích. Nádorovým onemocněním, pro které je charakteristické nekontrolované a neomezené dělení nádorových buněk, meziročně onemocní stále větší počet lidí (Siegel a kol., 2013). Je bezpochyby nutné se neustále věnovat výzkumu v této oblasti. Nové účinnější terapeutické přístupy přinesou onkologickým pacientům mnohé benefity. Doposud používané metody léčby jako radioterapie a chemoterapie zatěžují pacientovo tělo vedlejšími účinky. Stále platí, že nejúspěšnějším postupem zůstává včasný záchyt nádoru a jeho chirurgické odstranění. K operaci však není možné přistoupit vždy vzhledem k velikosti nádoru. Nejprve je potřeba nádor zmenšit (Flehinger a kol., 1992). V tuto chvíli se uplatňují již zmíněné metody jako ozařování, chemoterapie či velmi rozvíjející se imunoterapie. Bezespornou výhodou imunoterapie je zacílení přímo na nádorové buňky a z toho vyplývající menší poškození ostatních nenádorových tkání (Cannon a Loberiza, 2014).

1.1 Dělení nádorů

Nádory se dělí podle několika různých kritérií. Tím základním dělením je rozdělení nádorových onemocnění na nezhoubné a zhoubné neboli benigní a maligní. Ačkoliv na maligní nádory je obecně nahlíženo jako na tu nebezpečnější variantu pro jejich agresivní růst destruuující okolní tkáň a tvorbu metastáz, benigní nádory též nesou jistá rizika. Přestože růst takovýchto nádorů je neinvazivní, mohou benigní novotvary utlačovat okolí, což může vést k poruše funkce utlačované tkáně (Siegel a kol., 2013).

Klinicky se obě skupiny nádorů dělí podle místa výskytu na těle a tkáň, ze které vycházejí. Benigní i maligní nádory mohou patřit k několika histologicky odlišným typům: epitelové, nádory z pojivové tkáně, hematopoetické, germinomy, neuroektodermové, ze žlázových tkání a smíšené nádory vycházející z více typů tkání. Z orgánově lokalizovaných nádorů se celosvětově nejčastěji u žen vyskytuje maligní karcinom prsu, u mužů karcinom prostaty. Pro obě pohlaví shodně na druhé a třetí příčce jsou karcinom plic a kolorektální karcinom (Siegel a kol., 2013).

1.2 Melanom jako model použitý v této práci

Maligní melanom patří mezi neuroektodermové nádory. Ačkoli se až 95 % melanomů objeví na kůži, nejedná se výlučně o kožní nádor. Maligní melanom může postihnout i oční tkáň a sliznici rekta, pochvy a nosu. Typický výskyt na kůži je zapříčiněn působením vnějších podmínek, především delším pobytem na slunci (De Gruijl a kol., 2001). Melanom se manifestuje v několika poměrně klidných, pomalu rostoucích formách bez většího sklonu metastazovat, avšak nodulární varianta melanomu je agresivní a časně metastazující, což odpovídá i charakteristikám myšního melanomu B16-F10 používaného jako model nádoru v této práci. Myší melanom B16-F10 a lidský nodulární typ melanomu rostou rychle, vertikálně a vykazují stejný vzhled. Vertikální růst maligního melanomu znamená pro pacienta horší prognózu. Lékař by měl v této době okamžitě započít intenzivní léčbu (Smoller, 2006).

1.3 Myší melanom B16-F10

Myší melanom B16-F10 se řadí do skupiny 4 typů myších melanomů společně s B16-F0, B16-F1 a B16-BL/6. Melanom B16-F10 je spontánní melanom odvozený od melanomu myšního kmenu C57BL/6 (Overwijk, 2001). Tento kmen myší je používán v této práci. Subkutánně injikované buňky melanomu se obvykle dobře ujímají a vytvářejí spontánní metastazující model nádoru. Sekundární ložiska melanomu se objevují převážně v dýchacím traktu (Nakamura a kol., 2002). K dalším charakteristikám melanomu B16-F10, vedle intenzivního růstu a brzkého výskytu metastáz, patří i nízká exprese molekul hlavního histokompatibilního komplexu I (MHC I). Ta je pravděpodobně příčinou žádné nebo slabé imunitní odpovědi na přítomnost melanomu. Tyto podmínky vytvářejí velmi těžkou zkoušku pro jakoukoliv formu imunoterapie (Overwijk, 2001).

2. NÁDOR A IMUNITNÍ SYSTÉM

Imunitní systém zajišťuje obranu nejen proti infekcím, ale i nádorům. Vrozená i získaná část imunitního systému disponují širokým spektrem účinných mechanismů obrany, avšak v některých případech se jim nádor ještě účinněji brání. Základem je nádorovou tkáň rozpoznat jako něco cizího a škodlivého a následně ji zlikvidovat. Problém je zde ovšem ten, že nádor vychází z tkáně vlastní, a tudíž se pro zahájení útoku imunitního systému nejeví jako dostatečně cizí.

2.1 Rozpoznávání a mechanismy vrozené imunity

První linií vrozené (nespecifické) imunity jsou mechanické a chemické bariéry na povrchu těla (kůže, kyselina mléčná, lysosym). Po vstupu patogenů do těla jejich fyzikální nebo funkční odlišnosti umožňují zahájit imunitní atak. Buňky vrozené imunity (neutrofil, eosinofil, bazofil, monocyt, makrofág, dendritická a žírná buňka) jsou vybaveny funkcí fagocytózy. Pouze NK buňky (natural killer cells) tuto schopnost postrádají. Fagocyty rozpoznávají potenciální fagocytovanou částici na základě povrchových struktur. Tyto struktury česky nazýváme molekulární vzory spojené s patogenitou (pathogen associated molecular patterns, PAMPs). Jde o evolučně vysoce konzervované vzory, jež jsou pro jejich nositele (mikroorganismy, obecně patogeny) životně důležité. Výhodami PAMPs je jednak to, že je sdílí velký počet mikroorganismů, a jednak nebyly objeveny na hostitelských buňkách. Rozpoznávání se děje pomocí speciálních receptorů (pattern recognition receptors, PRRs). Zjištění PAMPs přes PRRs poukazuje na přítomnost cizorodé částice v těle a upozorňuje na potřebu nastartovat zánětlivé procesy vedoucí k infiltraci buněk vrozené imunity a k fagocytóze. Příkladem dobře rozpoznávaných PAMPs jsou lipopolysacharidy gramnegativních bakterií, kyselina lipoteichová grampozitivních bakterií nebo glukany a manany kvasinek a plísní (Beutler, 2004).

Pro úplnost nutno zmínit i vzory spojené s poškozením buňky (damage associated molecular pattern, dále jen DAMPs). Jedná se o jednotlivé látky uvolněné do extracelulárního prostředí pouze v případě buněčné smrti typu nekrózy. DAMPs nejsou do okolí uvolňovány při apoptóze. Tyto molekuly po navázání na PRRs též mohou iniciovat vrozenou imunitní odpověď nebo podpořit vzniklý zánět. Příkladem DAMPs jsou nukleové kyseliny nebo heat-shock proteiny (Tang a kol., 2012).

Vrozená imunita nakládá se systémy obrany velmi účinně. Fagocytóza, jako typický zástupce těchto systémů, zahrnuje po rozpoznání cizorodé částice (včetně nádorové buňky) její pohlcení do váčku zvaného fagozóm, splynutí s lyzozómem či granuly s lytickými enzymy a degradaci obsahu váčku (Aderem a Underhill, 1999). Fagocyty navíc využívají možnosti zabíjení, a to u buněk, které pro jejich velikost nelze fagocytovat. Jedná se o děj v anglické literatuře označovaný jako „frustrated phagocytosis“ a děje se poté, co fagocyt zjistí, že cíl, jež měl v úmyslu pohltnout fagocytózou, je moc velký. V tomto případě nejsou lytické enzymy vyloučeny do uzavřeného fagozómu, nýbrž do jisté kapsy, která se utvořila mezi cílovou a efektorovou buňkou (Labrousse a kol., 2011; Kazura a kol., 1985).

Účinná obrana nespočívá v jednorázové akci mezi přítomnými imunitními a nádorovými buňkami. Imunitní atak je komplexní děj, v němž významnou roli hraje mezi-buněčná komunikace. Buňky imunitního systému jsou po setkání s cizorodou buňkou aktivovány a na základě této aktivace dochází k uvolnění mnoha mediátorů (především cytokinů a chemokinů), jež do místa vznikajícího zánětu povolají ještě další imunitní buňky. Převaha imunitních buněk nad buňkami nádorovými může přinést účinnou likvidaci nádoru (Medzhitov a Janeway, 1997).

2.2 Rozpoznávání a mechanismy získané imunity

Získaná (specifická) imunita využívá sofistikovanějších mechanismů v boji proti infekci či nádoru, ale nastupuje o něco později než vrozená imunita. Možnost adaptace imunitní odpovědi a paměť jsou plusem získané imunity. Rychlejší nespecifická imunitní reakce tyto atributy nevlastní.

Pro aktivitu získané imunity je důležitá přítomnost antigenu. Získaná imunita reaguje na antigen tvorbou protilátek v případě B-lymfocytů a v případě T-lymfocytů zabíjením. Výskyt antigenu na nádorových buňkách je jev mnoha ohledech problematický. Nádorové buňky vycházejí z buněk vlastních a antigeny na nich jsou jen málo nebo vůbec pozměněné. Navíc T-lymfocyty vyžadují prezentaci antigenu společně s molekulami hlavního histokompatibilního komplexu. U nádorových buněk je typické snižování exprese MHC molekul, a tím navození slabé imunogenicity. Dostatečná prezentace antigenu antigen-prezentujícími buňkami se ukazuje být klíčovým bodem v úspěšném boji získané imunity proti nádorům. Makrofágy a dendritické buňky jako profesionální antigen-prezentující buňky vytvářejí spojnicí mezi přirozenou a získanou imunitou (Medzhitov a Janeway, 1997).

Speciální kapitolou imunitního systému jsou NK buňky, granulocytární lymfocyty bez imunologické paměti, jejichž úlohou je zabití cílových buněk. Účinné jsou zejména v boji proti virům a nádorům. Při infekčních stavech vyplňují mezeru mezi působením přirozené imunity a nástupem té získané. Rozpoznávání cíle umožňují dva signály: 1) po přemostění lektinového receptoru vznikne pozitivní signál k zabití cíle, 2) negativní signál se vytvoří při rozpoznání MCH I, čímž je zabráněno zabití buněk vlastních. U virem infikovaných buněk je exprese MHC I snižena. To samé platí i pro nádory. Jejich cytotoxický efekt spočívá ve spolupráci perforinů a granzymů z granul NK buněk. Perforiny mají schopnost vytvářet v cytoplazmatické membráně buněk póry, které buňku destabilizují. Granzymy aktivují proces apoptózy (Bellora a kol., 2014).

2.3 Mechanismy odolnosti nádoru vůči imunitnímu systému

Doposud bylo vytvořeno mnoho teorií popisujících vznik a vývoj nádoru. Výzkum ale naznačuje, že patrně ani soudobé uznávané názory neobstojí. Důvodem otřesů převládajících výkladů jsou nové poznatky v oblasti obrany nádorů vůči působení imunitního systému. V současné době je platná myšlenka, že nádorová buňka vzniká na podkladě nestabilního genomu zatíženého určitým počtem mutací. Tato buňka získává neomezený replikační potenciál a rozvíjí se klon uniformních buněk, které souhrnně tvoří nádor. Schopnost dělit se nad rámec fyziologických opakování je sice prostředkem, jak přežít, ovšem to by samo o sobě v reálných podmínkách nestačilo. Nutně by muselo dojít k situaci, kdy imunitní systém najde zbraň, která si poradí se všemi uniformními buňkami. Z klinické praxe je zřejmé, že tomu tak není (Kim a kol., 2007). Byl učiněn objev, že nádor je kompilací několika různých nádorových subpopulací, a že každá vykazuje jiné charakteristiky. Nádor vyrůstá v živém dynamickém prostředí a je pro jeho přežití je nutná adaptace. Každá další subpopulace se stává odolnější. Existence subpopulací pak komplikuje snahu o odstranění nádoru. Opět se objevuje potřeba dalšího výzkumu biologického chování nádorů pod vlivem imunitního systému neboli jevu zvaného imunoediting (Dunn a kol., 2004; O'Sullivan a kol., 2012).

Tváří tvář realitě selhává i teorie o imunitním dozoru. Tato teorie tvrdí, že v organismu spontánně vznikají nádorové buňky a že imunitní dozor, reprezentovaný NK buňkami, makrofágy a T-lymfocyty, je schopný tyto buňky zlikvidovat. Nepodařilo se však prokázat, že by lidé postižení poruchou imunity měli více spontánních nádorů. Teorie imunitního dozoru ob stojí, pokud se zaměříme na indukované nádory, které jsou více imunogen-

ni. Lidé s infekcí HIV například častěji trpí na virem navozené nádory jako je vzácný Kaposiho sarkom (Hatina, 2005). Naopak podle týmu profesora Klatzmanna je situace taková, že během prvních dní rozvoje nádoru nejsou nádorové buňky vnímány jako cizí, ale jako ty, které je potřeba chránit (Darrasse-Jèze a kol., 2009). Proto je vhodné zařazovat pojem imunitní dozor do širší teorie imunoeditingu, ve které imunitní dohled může tvořit první ze tří fází interakce imunitního systému a nádoru. Druhou fází je rovnováha, kdy nádor přítomen je, ale celkový počet buněk zůstává konstantní. Rozvoj klinicky detekovatelného nádoru představuje závěrečnou třetí fází. V této fází již není imunita schopná rozsáhlou nádorovou populaci zlikvidovat (Dunn a kol., 2004).

2.3.1 Chybějící a alternativní MHC

Dobrym příkladem obraných mechanismů je obecně nízká imunogenicita kvůli malé odlišnosti nádorových antigenů od antigenů vlastních a nezbytnost prezentace těchto antigenů s MHC I a kostimulačními molekulami. Nicméně obojí často chybí. Snižování exprese MHC I ochraňuje nádorové buňky před cytotoxickými T-lymfocyty, ale zároveň umožňuje atak NK buněk. Jejich útoku se nádory brání expresí pozměněných MHC Ib. NK buňka nádorovou buňku s MHC Ib rozpozná jako vlastní a neútočí na ni (Haynes-Gilmore, 2014). Z výše uvedeného lze shrnout a připomenout požadavek imunitního systému na dostatečnou odlišnost nádoru od vlastních buněk, aby mohl být zdárně odstraněn.

2.3.2 Produkce TGF- β nádorovými buňkami

Ve výčtu mechanismů obrany nádoru vůči imunitnímu systému nemůže chybět významná produkce cytokinu TGF- β (tumor growth factor beta). TGF- β vyvolává tvorbu regulačních T-lymfocytů z CD4⁺ T-lymfocytů. CD je zkratka „cluster of differentiation“ a jde o povrchové znaky vyskytující se nejen na leukocytech. Regulační T-lymfocyty mají zásadní fyziologický význam. Brání autoimunitním reakcím. V tomto případě pracují pro nádor a chrání ho před útokem imunity. Navíc regulační T-lymfocyty autokrinně produkují TGF- β .

Vědcům z kolektivu profesora Klatzmanna se podařilo prokázat to, že pokud by se prvních interakcí mezi nádorem a imunitou neúčastnily regulační T-lymfocyty, je velmi pravděpodobné, že by došlo k rozvoji mohutné imunitní odpovědi, a to v době, kdy je ještě možné dosáhnout likvidace nádoru (Darrasse-Jèze a kol., 2009).

Suprimující účinek jako TGF- β má i interleukin 10 (IL-10) uvolňovaný nádorem. TGF- β a IL-10 tlumí protinádorovou funkci makrofágů změnou fenotypu. Tzv. TAM M2 fenotyp (tumor associated macrophages) je pronádorový a účastní se přeměny dalších makrofágů na tento alternativní fenotyp. Tato změna je reverzibilní a lze ji vrátit zvýšením prozánětlivých cytokinů v prostředí nádoru. Nádor se však za všech okolností snaží udržet svůj signál výraznější (Chan a kol., 2011).

2.3.3 Interakce Fas-receptoru a Fas-ligandu

Možného nebezpečného útočníka nádor odstraní působením Fas-ligandu. Fas-receptor pro Fas-ligand se vyskytuje i na imunitních buňkách. Po jejich spojení buňka přechází do apoptózy. Nádory také mají Fas-receptor, ale jeho expresi záměrně snižují (Kim a kol., 2007).

2.3.4 „Don't eat me“ signály

Molekuly CD47 na povrchu buněk představují tzv. „don't eat me“ signál. Spojení CD47 a proteinu SIRP α na makrofágu říká, že buňka označená CD47 nemá být pohlcena. Respektive, na celé signalizaci se podílejí navíc CD31 a CD200. CD47 molekuly se nachází i na normálních buňkách, ovšem na povrchu nádoru je jich více. Jak ukazuje práce Willingham z roku 2012, míra exprese mRNA CD47 může být prognostickým faktorem pro solidní nádory. Vyšší hladina mRNA CD47 koreluje se zkrácenou dobou přežití. Použití anti-CD47 protilátek zatím ukazuje dobrý protinádorový účinek, včetně pozitivního vlivu na výskyt metastáz s minimálním cytotoxickým účinkem na normální tkáň (Willingham a kol., 2012). Minimální cytotoxický účinek na normální tkáň při použití anti-CD47 terapie vysvětlil Chao. Normální i nádorové buňky exprimují CD47 v takové míře tak, aby byly chráněny před fagocytujícími buňkami. Důvodem vyššího výskytu CD47 na nádorech je přítomnost tzv. „eat me“ signálů na povrchu nádorových buněk. Tento signál představuje podle uvedené práce z roku 2010 kalretikulín. Ten se na normálních buňkách prakticky nevyskytuje. Čím více je kalretikulínu, tím více je CD47 molekul, tak aby převážil „don't eat me“ signál. Po odstranění „don't eat me“ signálu přes anti-CD47 protilátky dojde k odhalení kalretikulínu (Chao a kol., 2010).

2.3.5 Obrana proti komplementu

Komplementu se nádor brání expresí CD55 neboli DAF proteinu. Normálně má tento protein chránit před poškozením tkáně při nechtěné aktivaci komplementové kaskády. Tohoto jevu využívá nádor ve svůj prospěch. Pomocný účinek mají i CD46, CD57 a CD59 (Kesselring a kol., 2014).

2.3.6 Inhibitory serinových proteáz

Nádor si též vyvinul úspěšný mechanismus blokace působení granzymů uvolněných NK buňkami. Tím mechanismem je inhibitor serinových proteáz PI-9/SPI-6, který interaguje s granzymem B, jehož úkolem je indukce buněčné smrti (Medema a kol., 2001).

Lze tedy shrnout v zásadě dvě strategie, kterých nádor využívá při úniku pozornosti imunitního systému. Za prvé se před imunitním systémem skrývá či maskuje a vytváří dojem, jakoby ani v organismu nebyl. Za druhé aktivně paralyzuje imunitní systém. Nádor působí především lokálně s mírným přesahem do systémové imunoprese (Hatina, 2005).

3. IMUNOTERAPIE NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ

Imunoterapie je moderním terapeutickým přístupem v léčbě nádorových onemocnění. V současnosti v klinické praxi převládá využití specifické části imunitního systému. Mnoho preparátů je na bázi protilátek, které cílí na konkrétní místo. Tak nedochází k poškození zdravé tkáně, což znamená šetrnější léčbu. Protilátka může sloužit jako nosič pro terapeutický toxin, anebo sama způsobí smrt buňky přemostěním některého z receptorů zahrnutých v apoptóze. Další funkce protilátek spojují specifickou a nespecifickou oblast imunity. Protilátky se uplatňují v opsonizaci pro fagocytózu a aktivují komplement (Scott a kol., 2012).

Naše pozornost je směřována k vrozené imunitě. Přesvědčující jsou pokusy např. prof. Cuiho či dr. Underhilla, kdy je vrozená imunita schopná si za jistých podmínek poradit s nádorovými buňkami.

Cui při své práci se sarkomy objevil SR/CR mutaci. Spontánní regrese (SR) a kompletní rezistence (CR) jsou dva stupně odolnosti vůči nádorům. Cui narazil na myš, která byla odolná vůči obrovské dávce transplantovaných sarkomových buněk. Nesla totiž SR/CR mutaci na některém autozómu. Křížením myši se SR/CR mutací bylo zjištěno, že se jedná o dědičnou dominantní mutaci. Mutace přináší odolnost vůči širokému spektru nádorů. Ihned po transplantaci nádorových buněk následovala mohutná infiltrace leukocytů, které vytvářely rozety s nádorovými buňkami. Cytolýza nádorových buněk proběhla rychle a bez poškození vlastní tkáně. Tyto myši byly nadále plně zdravé s normální délkou života (Cui a kol., 2003). Snaha zjistit mechanismus odolnosti přinesla zjištění, že nádorové buňky jsou likvidovány pouze buňkami vrozené imunity, především neutrofily, makrofágy a NK buňky. Ke stejnému výsledku se došlo i při použití myši bez T-lymfocytů. Tím byla potvrzena neúčast specifické imunity. Zajímavým zjištěním bylo, že leukocyty ze SR/CR myši podávají stejný výkon i po přenosu do normálních myšič (Hicks a kol., 2006).

V době, kdy je počet nádorových buněk v těle pod detekovatelným limitem, tedy v době počátečního rozvoje nádoru, je aktivovaná vrozená imunita. Aktivace této části imunity je zajišťována uvolněnými DAMPs molekulami jednak z vlastních buněk poškozených růstem nádoru, a jednak z buněk rostoucího nádoru. Tyto stimuly jsou ale slabé a nevedou k výrazné imunitní odpovědi. Stimulace pokračuje i v době makroskopického nálezu nádoru, ovšem v tuto chvíli již nádor disponuje značně rozvinutými systémy na oslabení imunitního systému. Proto je potřeba v co nejranější fázi nádoru vhodně podpořit imunitu (Jube a kol., 2012; Sato a kol., 2009).

Možnou variantou podpoření imunitních funkcí je aplikace PAMPs na povrch nádorových buněk. PAMPs označí nádorové buňky jako jasně cizí a určené k fagocytóze nebo zabití. PAMPs jsou rozpoznávané více druhy PRRs. Sekretované PRRs opsonizují cizorodé částice a aktivují komplement. Výsledkem je fagocytóza nebo lýze cizorodé částice (obvykle mikroba s PAMPs na povrchu). Významným zástupcem je C-reaktivní protein. Fagocytární PRRs, membránově vázané receptory, se nacházejí na povrchu fagocytujících buněk a po interakci s ligandem následuje fagocytóza částice, jejíž součástí je tento ligand. Třetí skupinou PRRs jsou signální receptory v cytoplazmě i na cytoplazmatické membráně. Tyto PRRs aktivují signální dráhy vedoucí k syntéze prozánětlivých cytokinů, chemokinů a iniciaci zánětu. Příkladem jsou tzv. TLRs neboli Toll-like receptory (Medzhitov a Janeway, 1997). Z práce Underhilla a Gantnera z roku 2004 je zřetelné, že ligandy pro fagocytární receptory by měly být membránově vázané, zatímco ligandy pro signální receptory by měly být rozpustné (Underhill a Gantner, 2004). V protinádorové terapii je například účinná kombinace formylmethioninových peptidů (f-MLF) a lipopolysacharidu (LPS). LPS je agonistou signálních PRRs, zatímco f-MLF fagocytárních receptorů (Vácová, 2013).

3.1 Vybrané imunomodulační látky

3.1.1 Manan

Manan pocházející z buněčné stěny kvasinek je podstatný polysacharid tvořený jednotkami manózy. Hlavní kostru mananu tvoří D-manózové jednotky spojené alfa-1,6 vazbami. Vysoce větvená struktura je dosahována vazbami alfa-1,2 a alfa-1,3 (Jones a Ballou, 1969). Na povrchu makrofágů a dendritických buněk je exprimován manózový receptor patří do skupiny fagocytárních PRRs, jehož ligandem je právě terminální D-manóza mananu. Jeho funkce, vyjma fagocytózy, spočívá v regulaci imunitní odpovědi (Gazi a Martinez-Pomares, 2009).

Sérový manan vázající protein (MBL) rozeznává jednotlivé PAMPs s terminální D-manózou, L-fukózou a N-acetyl-D-glukosaminem v první linii obrany, váže se na ně, a tím se účastní aktivace komplementové kaskády a funguje jako opsonin pro fagocytózu (Takahashi a Ezekowitz, 2005). Jeho buněčným receptorem je komplement receptor 1 (CR1, též CD35) vyskytující se na neutrofilech (Chiran a kol., 2000). Aktivace komplementu vede k vytvoření jednotek C3b a iC3b, které také hrají roli opsoninů. Tyto jednotky rozeznává komplement receptor 3 (CR3). CR3 je na povrch neutrofilů umístován během jejich aktivace (Větvička a kol., 1996).

3.1.2 N-formyl-methionin-leucin-fenylalanin (f-MLF)

N-formyl-methionin je aminokyselina, která se vyskytuje na začátku bakteriálních peptidů. U eukaryotních organismů lze N-formyl-methionin nalézt v mitochondriích. f-MLF je typický fagocytární PAMPs rozpoznávaný formylpeptidovými receptory (FPRs) na buňkách imunitního systému. N-formylmethionin je pak tou konkrétní značkou přítomnosti cizorodé částice v těle. Volný f-MLF je výrazný chemoatraktant pro neutrofilů. Síla chemotaktického a fagocytárního signálu je dána sekvencí za N-formylmethioninem. Nejvýrazněji působí nepolární zbytky leucinu, fenylalaninu nebo tryptofanu. Přemostění FPR receptoru f-MLF vede k několika různým akcím; převážně k tvorbě chemokinů, fagocytóze a produkci kyslíkových radikálů (Schiffmann a kol., 1975; Hayashi a kol., 2013).

3.1.3 Laminarin

Laminarin je nízkomolekulární rozpustný β -glukan získávaný z hnědých řas. Hlavní kostra je tvořena beta-1,3 vazbami a postranní větve vazbami beta-1,6. Jeho receptorovým protějškem je dectin-1. Buňky jako neutrofilů nebo makrofágy na setkání s laminarinem reagují produkcí peroxidu vodíku, oxidů dusíku a prozánětlivých cytokinů jako TNF- α nebo IL-1 β . Podle dr. Leeové může mít laminarin protinádorový účinek díky jeho výraznému imunostimulačnímu efektu (Lee a kol., 2012).

4. ÚLOHA NEUTROFILŮ V TERAPII NÁDORŮ

Nejvíce zastoupenými imunitními buňkami v oblasti nádoru jsou neutrofilové, esenciální část vrozené imunity. K tomuto jevu přispívá hned několik faktorů. Mezi bílými krvinkami jsou nejpočetnější skupinou právě neutrofilní granulocyty. Až 70 % bílého krevního obrazu může být tvořeno frakcí neutrofilů. Neutrofil je charakterický svým segmentovaným jádrem a prezencí granul v cytoplazmě. Navíc sám nádor ovlivňuje množství neutrofilů v nádoru i v těle a mnozí pacienti s pokročilým stádiem nádoru mají neutrofilii. Neutrofilie je s pohledu klinického pracovníka obvykle vnímána jako negativní prognostický faktor (Schmidt a kol., 2005).

4.1 N1 a N2 fenotyp neutrofilů

Neutrofilové nalezené v oblasti nádoru se v anglicky psané literatuře označují jako „tumor associated neutrophils“ (TAN). TAN vykazují dva fenotypy označované symboly N1 a N2. Rozdíl lze nalézt v transkripční aktivitě. N1 fenotyp je považován za prozánětlivý a protinádorový, zatímco N2 protizánětlivý a pronádorový. Bipolární charakter neutrofilů využívá nádor ve svůj prospěch. Ovšem tento aspekt lze využít i ve prospěch účinnosti terapie. Podobný dvojitý fenotyp byl popsán i u makrofágů (Fridlender a kol., 2009).

Nádor se aktivně podílí na nábore neutrofilů do nádoru. Produkuje mnohé cytokinové a chemokinové signály, na jejichž základě neutrofilové odpouštějí krevní řečiště a vstupují do tkáně. Neutrofilové v kostní dřeni a v krevním řečišti jsou intaktní, zatímco přestup do tkáně je aktivuje a umožňuje vykonávat jejich funkce. Pod vlivem GM-CSF se prodlužuje životaschopnost neutrofilů a podle některých studií může tento cytokin fungovat jako silný chemoatraktant pro polymorfonukleární granulocyty. Produkce GM-CSF byla prokázána v celé řadě nádorových systémů (McGary a kol., 1995). TAN jsou v místě nádoru stimulovány k vlastní produkci cytokinů zajišťující příliv dalších neutrofilů. Vytváří se pozitivní smyčka jako například v případě infekce. Do procesu získávání neutrofilů jsou zařazeny i makrofágy. Doktor Fridlender se důkladně zabývá TAN. Za největší rozdíl mezi TAN a nativními neutrofilové považuje výrazně zvýšenou produkci celého spektra cytokinů v některých případech více než stonásobně. Podle jeho názoru neutrofilové v nádoru plní roli regulace imunitních reakcí. Svou činností balancují mezi mírou aktivace a suprese imunitního systému (Fridlender a kol., 2009).

Pronádorové vlastnosti N2 fenotypu TAN se můžou plně vyvinout v neléčeném nádoru. N2 TAN jsou zahrnuty předně v procesu růstu nádoru. Deplece takových neutrofilů povede k inhibici růstu nádoru. Dále N2 neutrofilů podporují tvorbu cév, jistý vliv mohou mít i na metastazování, též tlumí účinek CD8+ T-lymfocytů (Di Carlo a kol., 2005).

Významným nádorovým signálem pro N2 neutrofilů je TGF- β . TGF- β například znemožňuje degranulaci neutrofilů. Blokáce TGF- β způsobí změnu N2 fenotypu na N1. Této změny je možné docílit i vnější prozánětlivou cytokinovou stimulací (Fridlender a kol., 2009).

N1 neutrofilů mají značný potenciál zabít nádorové buňky a omezovat růst nádoru. N1 neutrofilů izolované z nádoru uvolňují prokazatelně více kyslíkových radikálů. Druhým mechanismem zabíjení je interakce Fas-FasL. N1 neutrofilů více exprimují FasL. Dále produkují převážně prozánětlivé cytokiny a jsou schopné účinně aktivovat CD8+ T-lymfocyty (Di Carlo a kol., 2005).

4.2 Aktivace neutrofilů a jejich zabíječské schopnosti

Neutrofilů se jsou v krevním oběhu v klidovém stádiu a k jejich aktivaci jsou zapotřebí určité signály, aby nedošlo k náhodné či samovolné degranulaci obsahu granul do volného prostoru a následnému poškození tkáně. Aktivace, neboli priming, může být provedena bakteriálními produkty nebo cytokiny (např. TNF- α , GM-CSF). V procesu aktivace jsou na povrch buňky instalovány předsyntetizované receptory, je zvyšována jejich afinita a zahajuje se transkripce nových receptorů a dalších cytokinů. Předsyntetizované receptory jsou uloženy v granulích. Aktivované neutrofilů vykazují prodlouženou životaschopnost. To je také důvodem, proč neutrofilů izolované z krve nedisponují celou škálou funkcí (Woodfin a kol., 2009).

Bylo prokázáno, že aktivované neutrofilů jsou schopné zabít nádorové buňky *in vitro* (Gerrard a kol., 1981; Ackermann a kol., 1989; Dallegri a kol., 1991) i *in vivo* (Lee a kol., 2000). Tou účinnou molekulou je kyselina chlorná (Dallegri a kol., 1991).

Neutrofilů mohou své cíle zabít třemi způsoby. Dobře prostudovaným mechanismem je fagocytóza. Tu užívají neutrofilů především tehdy, mají-li se vyrovnat s mikrobiální infekcí. Bakterie jsou dostatečně malé, aby mohly být pohlceny do fagocytárního váčku a v něm zlikvidovány tím, že je obsah neutrofilních granul uvolněn do fagozómu.

S velkými cíly, které nelze fagocytovat, se neutrofilů mohou vyrovnat tvorbou tzv. neutrofilních extracelulárních pastí (neutrophil extracellular traps, NETs) nebo již zmíněným

procesem frustrované fagocytózy. Při tvorbě NETs dochází k rozsáhlé přestavbě buňky na vlákna obsahující především dekonduovaný chromatin a proteiny z granul. NETs vytváří síťovitou strukturu, jejíž výhoda spočívá nejen ve schopnosti zabíjet patogeny, ale i v zamezení jejich dalšímu šíření. Plocha pokrytá NETs je 10 – 15 × větší než byla původní buňka. Tento jev byl objeven v roce 2004 prof. Brinkmannem a doposud je velmi intenzivně studován (Brinkmann a kol., 2004). Dnes se ví, že pro tvorbu NETs je vyžadována úvodní stimulace, například TLR4 některými mikrobiálními produkty, a přemostění CR3 receptoru. Klíčovou roli hraje též tvorba reaktivních forem kyslíku (ROS, reactive oxygen species) a nezbytně nutné je i uvolnění neutrofilní elastázy (Brinkmann a Zychlinsky, 2012).

K frustrované fagocytóze dochází v případě, že neutrofil započal fagocytovat svůj cíl, ale následně došlo ke zjištění, že cíl je příliš velký. Zabití je dosaženo degranulací do oblasti mezi cílovou buňkou a neutrofilem. Toto spojení vytváří jakousi kapsu, jež umožňuje uvolnění obsahu granul do extracelulárního prostředí bez rizika rozsáhlého poškození tkáně (Labrousse a kol., 2011; Kazura a kol., 1985). Poznání velikosti cílové buňky se děje pravděpodobně prostřednictvím fagocytárního receptoru dectin-1. Přemostění dectinu-1 negativně reguluje tvorbu NETs (Branzk a kol., 2014).

4.3 Prozánětlivá buněčná signalizace přes NF-κB

Jedním z ústředních témat buněčné biologie je zjistit, po jakých drahách jsou vedeny signály v buňce. Signální sítě jsou často vysoce komplexní soustavy obsahující mnoho komponent a interakcí.

Neutrofilů jako první buňky v místě zánětu produkují mnohé prozánětlivé cytokiny a chemokiny, které mohou mohutně zesílit proces zánětu. Expze těchto prozánětlivých proteinů je regulována na úrovni transkripčních faktorů NF-κB. NF-κB transkripční faktory jsou zásadní pro expzi genů zánětlivé odpvědi a apoptózy. Po úvodním aktivačním signálu dochází ke spuštění signalizační dráhy, rozpadu inhibitoru I-κB a vstupu NF-κB do jádra. Vhodnými aktivátory dráhy jsou například TNF-α, IL-1β a bakteriální lipopolysacharid.

Aktivace NF-κB se přísně regulována prostřednictvím dvou drah; normativní a non-normativní. Normativní dráha jde od TLR nebo PRR receptorů. Non-normativní dráha je aktivována předchozí stimulací TNF receptoru. Obě cesty vedou k vytvoření dimeru NF-κB a jeho translokaci do jádra. Podjednotka p65 dimeru NF-κB je fosforylována a acetylována, což zvyšuje afinitu transkripčního faktoru k DNA (Kingeter a Lin, 2012).

4.3.1 Aktivace NF- κ B v neutrofilech stimulovaných TNF- α

Aktivace neutrofilů prostřednictvím TNF- α vede po specifické dráze přes protein kinázu C delta (PKC- δ). Působení na PKC- δ rottlerinem blokuje aktivaci NF- κ B po předchozí stimulaci TNF- α . Mechanismem této blokace je zabránění rozpadu inhibitoru I- κ B α . Stimulace neutrofilů IL-1 β nebo LPS není blokována rottlerinem, který míří na PKC- δ . Další specifikům pro neutrofile, nikoliv však pro monocyty/makrofágy, je množství a lokalizace inhibitoru aktivace NF- κ B I- κ B α . Ten je ve velkém množství uložen v jádře u nestimulovaných neutrofilů. Ve výsledku vazba NF- κ B na DNA nekoreluje s mírou translokace NF- κ B do jádra, ale s množstvím inhibitoru v jádře. V tom tkví molekulární rozdíl mezi neutrofilem a ostatními imunitními buňkami, u niž je míra translokace do jádra rozhodující (Vancurova a kol., 2001).

4.3.2 GM-CSF aktivuje NF- κ B přímo

Alfa řetězec receptoru pro GM-CSF vytváří přímou vnitrobuněčnou interakci s inhibitorem NF- κ B I- κ B β . NF- κ B má vliv na prozánětlivé geny a geny apoptózy. V případě aktivace buněk před GM-CSF a signalizace přes α -řetězec GM-CSF receptoru se uplatňuje vliv na druhou skupinu genů, a tedy GM-CSF zajišťuje prodloužení přežití neutrofilních granulocytů (Ebner a kol., 2003).

4.3.3 Dectin-1/Syk signální dráha

Dectin-1 receptor zprostředkovává neopsonizovanou fagocytózu například kvasinek. Právě kvasinky bývají častým zdrojem β -glukanů pro širokospektré využití. A protože savci nejsou schopni vytvářet β -glukany, je dectin-1 zásadním receptorem přirozené imunity. Produkce cytokinů imunitními buňkami může být zajištěna přemostěním dectinu-1 β -glukany. Produkovány jsou cytokiny IL-1 – 6, IL-12, IL-13 a TNF- α . Klíčovým hráčem je zde Syk kináza vedoucí k fosforylaci NF- κ B. Navíc bylo zjištěno, že není potřeba, aby došlo k fagocytóze, jestliže má nastat fosforylace NF- κ B. Stačí kontakt mezi buňkami nesoucí receptor a ligand. Tato dráha byla prokázána u makrofágů, dendritických buněk a žírných buněk (Kimura a kol., 2014; Rogers a kol., 2005; Underhill, 2005). Tvorba cytokinů je výrazně zvyšována současnou stimulací TLRs (Underhill, 2005).

5. CÍLE PRÁCE

Studium možnosti použití agonisty TLR7 Imiquimodu (R-837) v imunoterapii nádorů

Zjišťování možností účinné protinádorové *in vivo* terapie založené na neutrofilech

In vitro studium mechanismů protinádorového účinku neutrofilů

6. MATERIÁL A METODY

6.1 Chemikálie

anti- β -actin králičí protilátka (Cell Signalling, USA)

anti-fosfo-NF- κ Bp65 králičí protilátka (Cell Signalling, USA)

anti-IgG králičí protilátka (Cell Signalling, USA)

BAM (Biocompatible Anchor for cell membranes; NOF Europe, Belgie)

Delfia® EuTDA Cytotoxicity Kit (Perkin&Elmer, USA)

EDTA (Kyselina ethylendiamintetraoctová; Sigma-Aldrich, USA)

DOPE-N-(Succinimidyl-oxo-L-glutaryl)-L- α -phosphatidylethanolamin, Dioleoyl
(NOF Corporation, Japonsko)

DMSO (Dimetyl-sulfoxid; Sigma-Aldrich, USA)

FCS (Fetal Calf Serum; Sigma-Aldrich, USA)

f-MLF (N-formyl-methioninyl-leucyl-phenylalanin; Sigma-Aldrich, USA)

f-MLFKK (N-Schafer, Dánsko)

GM-CSF (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, Sigma-Aldrich, USA)

MACS Neutrophil Isolation Kit, mouse (Miltenyi Biotec Inc., USA)

Manan (Sigma-Aldrich, USA)

Merkaptoetanol (PAA-The Cell Culture Company, USA)

Laminarin (Sigma-Aldrich, USA)

Penicilin/streptomycin antibiotika (PAA-The Cell Culture Company, USA)

PMA (Phorbol Myristate Acetate; Sigma-Aldrich, USA)

R-837 (Imiquimod; InvivoGen, Francie)

RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, USA)

Thioglykolátové médium (BD Bioscience, USA)

TNF- α (Tumor necrosis factor alfa; Sigma-Aldrich, USA)

6.2 Laboratorní zvířata a nádorové buněčné linie

Samice kmene C57BL/6N byly pořízeny u firmy Charles River Laboratories. Pokušné podmínky zahrnovaly fotoperiodu 12/12 hodin, stálou teplotu 22 °C, 65% relativní vlhkost a neomezený přístup ke sterilní vodě a krmivu ve formě pelet.

Buňky melanomu B16-F10 byly zakoupeny u American Type Culture Collection. Kultivace buněk byla provedena při 37 °C v RPMI 1640 s 10 % FCS, antibiotiky (1 %), glutaminem (1 %) a merkaptoethanolem (1 %) v atmosféře nasycené vodními parami s oxidem uhličitým (koncentrace CO₂ 5 %).

6.3 Příprava melanomových buněk pro *in vivo* pokusy

Buňky byly zbaveny média 3 × promytím sterilním PBS (fosfátový pufr s chloridem sodným, pH 7,3-7,4). Dalším krokem byla trypsinizace při 37 °C 5 minut. Trypsinizační směs obsahovala 0,02% trypsin a 0,02% EDTA v PBS. Trypsinizace byla ukončena přidáním média RPMI 1640 s 10 % FCS. Rozvolněné buňky byly centrifugovány (10 minut, při 150G, 4°C). Supernatant byl slit a k peletě bylo přidáno médium RPMI 1640 bez séra. Buňky byly po obarvení mrtvých buněk trypanovou modří (0,5% vodný roztok trypanové modří) spočítány v Bürkerově komůrce a případně rozředěny na požadovanou koncentraci.

6.4 Transplantace melanomových buněk

Buněčná suspenze obsahující 400 000 buněk melanomu B16-F10 v 0,1 ml RPMI 1640 bez séra v jedné dávce byla myším injikována subkutánně do pravé dolní části zad. Tato část byla před aplikací oholena, aby byl nádor patrnější. Myši byly v době aplikace 8 týdnů staré a vážily mezi 18 a 20 g.

6.5 Příprava terapeutických látek

6.5.1 Příprava f-MLFKK-BAM

Syntéza f-MLFKK-BAM bylo provedena navázáním molekuly BAM na f-MLFKK při pH 7,3 metodou podle Kato a kol., 2004. Během jedné hodiny při pokojové teplotě došlo k reakci skupiny NHS (vazebná část BAM molekul) s ε-aminoskupinou lysinu v f-MLFKK. Získaný roztok (v PBS) byl až do doby použití uchováván při mínus 20 °C.

6.5.2 Příprava laminarin-BAM a manan-BAM

Nejdříve byly připraveny aminovaný laminarin a manan redukční aminací. Roztok laminarinu (mananu) byl redukován kyanoborohydridem sodným při pH 7,5 a 50° C po dobu pěti dnů v prostředí obsahující octan amonný. Následně byl vzniklý roztok dialyzován při 4°C proti PBS přes noc (dialyzační membrány MWCO 3500, Serva, Německo). Navázání kotvy BAM na aminoskupinu laminarinu (mananu) bylo provedeno výše uvedenou metodou podle Kato a kol., 2004, za stejných podmínek.

6.5.3 Příprava f-MLFKK-DOPE

Syntéza f-MLFKK-DOPE byla provedením přidáním vazebné molekuly DOPE na molekulu f-MLFKK. K 0,53 mM f-MLFKK s bylo přidáno ekvimolární množství 9 mM DOPE-NHS v DMSO. Inkubace těchto látek probíhala při pokojové teplotě po dobu 60 minut. Sterilizace výsledného roztoku byla provedena filtrací (0,22 μm).

6.6 Měření velikosti nádorů

Pro vyhodnocení vlivu terapie na růst nádoru byla měřena velikost nádoru kaliperem. Z naměřených hodnot byl vypočítán objem nádoru podle vzorce $v = \pi/6 * A * B^2$, přičemž A je nejdelší rozměr nádoru v milimetrech (odpovídá šířce) a B nejkratší rozměr nádoru (odpovídá výšce) v milimetrech (Li a kol., 2009).

6.7 Počítání plicních metastáz

Myši byly usmrceny stržením vazů. Po vyjmutí plic z těla byly plíce fixovány 4% formaldehydem. Obratem byly celé plíce prohlédnuty pod binokulární lupou a byly spočítány metastázy. Metastázy byly pozorovány jako výrazné černé tečky v růžové tkáni plic.

Ze získaných dat byly vyhodnocovány dvě hodnoty. Jednak průměrný počet metastáz, daný průměrným počtem metastáz u myší, u kterých byly metastázy nalezeny, a jednak procento výskytu metastáz, což je procento myší, u kterých byly metastázy nalezeny z celkového počtu myší.

6.8 Příprava melanomových buněk pro *in vitro* pokusy

Nádorové buňky pro *in vitro* pokusy byly připravovány identicky s přípravou buněk pro *in vivo* pokusy. Po upravení koncentrace na 1 milión na mililitr byly buňky inkubovány

s fagocytárním ligandem (f-MLFKK-BAM, laminarin-BAM, manan-BAM) nebo jeho nefunkční náhradou (HMLFKK-BAM, lysin-BAM) 30 minut při 37 °C. Výsledná koncentrace ligandu byla pro f-MLF a jeho deriváty 0,05 mM, pro laminarin, manan a jejich deriváty 0,02 mM, což odpovídá desetině terapeutické koncentrace. Po uplynutí doby inkubace byly buňky promyty centrifugací (150 g, 5 minut, 4 °C).

6.9 Příprava neutrofilů pro *in vitro* pokusy

6.9.1 Izolace neutrofilů kostní dřeně a jejich aktivace

Neutrofilů byly izolovány z kostní dřeně myši C57BL/6N podle Stassen a kol., 2006. Myš byla usmrcena stržením vazů. Z dolních končetin byla stažena kůže a následně byly končetiny odděleny od těla. Dalším krokem bylo oddělení svaloviny od kostí. Čisté kosti (bez svaloviny) byly vloženy do RPMI s 10 % FCS. Z kostí dolních končetin byly odstříhány kloubní hlavice a kostní dřeň byla vytlačena pomocí injekční stříkačky do čistého RPMI s 10 % FCS.

Vlastní separace neutrofilů od ostatních buněk z kostní dřeně byla provedena magnetickou separací podle pokynů k MACS Neutrophil Isolation Kit, mouse. Princip této metody je založen na vyvázání všech buněk na kolonku, mimo neutrofilů. Jde tedy o negativní selekci. Směs buněk kostní dřeně byla inkubována s mixem různým protilátek, tak aby bylo pokryto celé spektrum buněk kostní dřeně, vyjma neutrofilů. V druhém v kroku došlo k vytvoření konjugátů mezi protilátkami navázanými na buňkách a magnetickými kuličkami. V kolonce byly zadrženy magneticky označené buňky, zatímco neutrofilů kolonkou prošly. Čistota získaných neutrofilů byla průběžně stanovována průtokovou cytometrií na přístroji BD FACSCanto II (BD Bioscience, USA). Izolované intaktní neutrofilů byly před použitím v *in vitro* pokusech aktivovány cytokiny GM-CSF (12 ng/ml média) a TNF- α (2,5 ng/ml média) podle Dewas a kol., 2003, a 2 μ M nízkomolekulárním β -glukanem laminarinem (Mw 6007) podle Větvičky a kol., 1996. Jako pozitivní kontrola aktivace sloužily neutrofilů inkubované s PMA v DMSO ve výsledné koncentraci 100 ng/ml média.

6.9.2 Izolace neutrofilů z břišní dutiny

Den předem byl připraven 4% roztok thioglykolátového média. Po rozpuštění sypkého thioglykolátového média v deionizované vodě vznikl světle modrý roztok. Ke změně barvy roztoku na červeno-růžovou došlo po provaření roztoku v mikrovlnné troubě po dobu 1-2

minut. Po odstátí roztoku v chladničce přes noc se vytvořily dvě vrstvy (spodní žlutá a horní růžová). Pro injekční intraperitoneální aplikaci média byl odebrán 1 ml spodní žluté vrstvy. Po dvou hodinách od aplikace byla myš uspána inhalací par dietyléteru, vykrvena a následně usmrcena stržením vazů. Po stažení kůže v oblasti břicha bylo injekčně vstříknuto do břišní dutiny myši 5 ml ledového PBS a opět nasáto zpět. Získaná tekutina byla obohacena o neutrofilů (Davidson, 2011). Neutrofilů byly převedeny do RPMI s 10 % FCS a použity pro cytotoxický test. Čistota těchto neutrofilů byla stanovena průtokovou cytometrií na přístroji BD FACSCanto II.

6.10 Příprava erytrocytů pro *in vitro* pokusy

Myš kmene C57BL/6N byla uspána inhalací par dietyléteru a vykrvena. Krev byla přidána do EDTA v poměru 5:1. Plná krev byla následně ředěna 1 000 × v RPMI s 10 % FCS (na 25 mil./ml).

6.11 Statistická analýza dat

K vyhodnocení získaných dat byl využitý programy MS Excel a Statistica 12 (Analýza přežití, ANOVA test).

6.12 Pokusy

6.12.1 Studium možnosti použití agonisty TLR7 Imiquimodu (R-837) v imunoterapii nádorů s vázaným manan-BAM

Pokus byl prováděn s 20 samicemi myšního kmene C57BL/6N. Dvanáctý den po transplantaci melanomových buněk byly myši náhodně rozděleny do 4 terapeutických skupin (A – D). Každá skupina byla tvořena 5 myšmi. Každá myš byla umístěna do svého boxu. Terapie byla započata ihned. Před aplikací terapeutických látek byly změřeny objemy nádorů na počátku terapie. Měření bylo opakováno každý druhý den. Podávání terapeutik bylo v řádu tzv. pulzního režimu, kdy první pulz terapie přišel ve dnech 0, 1 a 2 a druhý pulz ve dnech 8, 9 a 10. Terapeutika byla podávána intratumorálně (i.t.) nebo subkutánně (s.c.).

Přehled terapie (skupina, podaná látka, způsob podání):

- Skupina A – 50 μ l R-837 (0,5 mg/ml PBS) s.c.
- Skupina B – 50 μ l 0,2 mM manan-BAM v PBS i.t.
- Skupina C – 50 μ l 0,2 mM manan-BAM v PBS i.t. a 50 μ l R-837 (0,5 mg/ml PBS) s.c.
- Skupina D – 50 μ l PBS

Po ukončení terapie byla sledována doba přežití myši.

6.12.2 Chemoatrakce neutrofilů do oblasti nádoru pomocí f-MLF a vliv této terapie na růst nádoru s ukotveným mananem

Na tento pokus bylo použito 24 samic kmene C57BL/6N. Dvanáctý den po transplantaci nádorových buněk byly myši náhodně rozřazeny do čtyř skupin (A – D). Všechny skupiny čítaly 6 myši a každá myš měla svůj box. Terapie byla započata týž den. Před aplikací terapeutických roztoků byly změřeny počáteční objemy nádorů. Měření bylo opakováno každý druhý den. Podávání terapeutik bylo v řádu tzv. pulzního režimu, kdy první pulz terapie přišel ve dnech 0, 1 a 2 a druhý pulz ve dnech 8, 9 a 10. Terapeutika byla podávána intratumorálně.

Přehled terapie (skupina, podaná látka):

- Skupina A – 50 μ l 5 mM f-MLF v PBS
- Skupina B – 50 μ l 0,2 mM manan-BAM v PBS
- Skupina C – 50 μ l 5 mM f-MLF v PBS a 0,2 mM manan-BAM v PBS
- Skupina D – 50 μ l PBS

Po 14 dnech od zahájení terapie byl vyhodnocen vliv terapie na výskyt metastáz.

6.12.3 Vliv intratumorální aplikace aktivovaných neutrofilů v kombinaci s manan-BAM na růst nádoru

Pro pokus bylo použito 18 myši kmene C57BL/6. Po 12 dnech od transplantace nádorů byly vytvořeny 3 terapeutické skupiny (A – C), každá po 6 myších. Týž den byly změřeny

počáteční velikosti nádorů a započata terapie. Měření velikosti nádorů bylo provedeno obden. Terapeutika byly podávány ve dnech 0, 1, 2 a 8, 9, 10 intratumorálně. Pro terapii byly použity neutrofilů, které byly aktivovány cytokiny GM-CSF a TNF- α a laminariem podle protokolu uvedeného v kapitole Materiál a metody. Jedna terapeutická dávka obsahovala 2 milióny neutrofilů v RPMI s 10 % FCS.

Přehled terapie (skupina, podaná látka):

- Skupina A – 50 μ l 0,2 mM manan-BAM v PBS a po hodině 50 μ l aktivovaných neutrofilů
- Skupina B – 50 μ l 0,2 mM manan-BAM v PBS
- Skupina C – 50 μ l PBS

Po ukončení pokusu byl vyhodnocen vliv terapie na výskyt metastáz.

6.12.4 *In vitro* analýza cytotoxického efektu neutrofilů na nádorové buňky

Cytotoxický účinek neutrofilů na nádorové buňky B16-F10 byl testován pomocí sady od firmy Perkin&Elmer Delfia® EuTDA Cytotoxicity assay kit. Princip této metody je založen na průniku fluorescenční látky BATDA (bis(acetoxymethyl)2,2':6',2"-terpyridin-6,6"-dikarboxylát) do nádorových buněk, kde je hydrolyzována. Hydrolýza zabrání uniku látky do prostředí. Po dvouhodinové inkubaci nádorových buněk společně s neutrofilů se nádorové buňky rozpadnou a fluorescenční látka se uvolní do supernatantu. Fluorescence je vyvolána přidáním roztoku obsahujícího kationty europia, které jsou chelatovány. Míra uvolnění byla měřena na přístroji BioTek Synergy H1 (BioTek, USA), software Gen5TM, mód time-resolved fluorescence (TRF, excitační vlnová délka 340 nm, emisní vlnová délka 612 nm). Procento specifické lýze bylo vypočítáno podle následujícího vzorce:

$$\frac{\text{Experimentální výsledek} - \text{spontánní uvolnění}}{\text{Maximální uvolnění} - \text{spontánní uvolnění}} \times 100 \%$$

přičemž spontánní uvolnění bylo dáno inkubací samotných nádorových buněk bez neutrofilů a maximálního uvolnění bylo dosaženo použitím lyzačního roztoku.

Pro tyto *in vitro* pokusy byly použity čerstvě izolované neutrofilů z peritonea a melanomové buňky B16-F10 z kultury s i bez fagocytárního ligandu.

Pokus byl sestaven z následujících skupin:

- Skupina A – spontánní uvolnění (B16-F10 + RPMI s 10 % FCS)
- Skupina B – maximální uvolnění (B16-F10 + lyzační roztok)
- Skupina C – pozadí (supernatant po centrifugování B16-F10)
- Skupina D – B16-F10 + neutrofilů (poměry 1:6 – 1:50)
- Skupina E – B16-F10-ligand + neutrofilů (1:6 – 1:50)
- Skupina F – B16-F10 + neutrofilů (1:6 – 1:50) + PMA (100 ng/ml)
- Skupina G – B16-F10-ligand + neutrofilů (1:6 – 1:50) + PMA (100 ng/ml)

6.12.5 Vliv fagocytárního ligandu na tvorbu shluků buněk *in vitro*

Melanomové buňky B16-F10 v počtu 100 000 na jamku (96 jamkový panel, průhledný, ploché dno) byly inkubovány s ligandem fagocytárních receptorů, jeho nefunkční náhradou nebo PBS. Do kontrolní skupiny bylo přidáno PBS ve stejném množství jako ligand. V desetiminutových intervalech byla pozorována tvorba shluků pod invertovaným mikroskopem při zvětšení 40 – 400 ×. Mezi jednotlivými pozorováními byly buňky umístěny v inkubátoru (37 °C, 5 % CO₂). Pokus byl navíc proveden i s aktivovanými neutrofilů z kostní dřeně (200 000 na jamku) a erytrocyty (1 milión na jamku).

Použití kotvení ligandu umožnilo provést pokus ve dvou variantách. Jedna zahrnovala kotvení ligandu do cytoplazmatické membrány a odmytí nenavázaného přebytku. Druhá byla provedena jako přidání ligandu s kotvou BAM bez odmytí přebytku.

Skupiny byly následující:

- Skupina A – B16-F10 + 0,05 mM f-MLFKK-BAM (nebo 0,02 mM manan-BAM nebo 0,02 mM laminarin-BAM), odmytý přebytek
- Skupina B – B16-F10 + 0,05 mM f-MLFKK-BAM (nebo 0,02 mM manan-BAM nebo 0,02 mM laminarin-BAM), neodmytý přebytek
- Skupina C – B16-F10 + 0,05 mM H-MLFKK-BAM (nebo 0,02 mM lysin-BAM), odmytý přebytek
- Skupina D – B16-F10 + 0,05 mM H-MLFKK-BAM (nebo 0,02 mM lysin-BAM), neodmytý přebytek

- Skupina E – B16-F10 + 0,05 mM volné f-MLF (nebo 0,02 mM volný manan nebo 0,02 mM volný laminarin)
- Skupina F – B16-F10 + PBS
- Skupina G – aktivované neutrofilly + 0,05 mM f-MLFKK-BAM (nebo 0,02 mM manan-BAM nebo 0,02 mM laminarin-BAM), neodmytý přebytek
- Skupina H – aktivované neutrofilly + 0,05 mM volné f-MLF (nebo 0,02 mM volný manan nebo 0,02 mM volný laminarin)
- Skupina I – aktivované neutrofilly + PBS
- Skupina J – erytrocyty + 0,05 mM f-MLFKK-BAM, neodmytý přebytek
- Skupina K – erytrocyty + PBS

6.12.6 Tvorba interakcí buněk B16-F10 a myších neutrofilů

Pro sledování mezibuněčných interakcí byly použity melanomové buňky B16-F10 z kultury a čerstvě izolované neutrofilly z kostní dřeně. Prvním krokem bylo navázání ligandu na nádorové buňky. Výsledná koncentrace ligandu byla totožná s výše uvedeným. Po třicetiminutové inkubaci v inkubátoru (stejně podmínky jako je uvedeno výše) následovala centrifugace a promytí (3 ×). Takto připravené buňky s navázaným ligandem byly napipetovány do jamek (24 jamkové destičky, průhledné, s plochým dnem) v počtu 150 000. V zápětí byly do jamek přidány i aktivované neutrofilly v poměru k nádorovým buňkám 2:1. Neutrofilly byly aktivované GM-CSF, TNF- α a laminarinem 20 minut při 37 °C. Interakce byly pozorovány v desetiminutových intervalech pod invertovaným mikroskopem při různých zvětšeních.

Skupiny v těchto pokusech byly:

- Skupina A – B16-F10 + 0,05 mM f-MLFKK-BAM (nebo 0,02 mM manan-BAM nebo 0,02 mM laminarin-BAM) + aktivované neutrofilly
- Skupina B – B16-F10 + 0,05 mM volné f-MLF (nebo 0,02 mM volný manan nebo 0,02 mM volný laminarin) + aktivované neutrofilly
- Skupina C – B16-F10 + PBS+ aktivované neutrofilly

V pokusu byly sledovány dva parametry. První z nich byl kontakt mezi nádorovou buňkou a neutrofilem. Za kontakt bylo považováno spojení buněk alespoň v jednom bodě

a toto spojení bylo zřejmé i v různých rovinách zaostření. Druhým sledovaným parametrem byla tzv. frustrovaná fagocytóza. Tento jev vykazoval charakteristické spojení nádorové buňky a neutrofilního granulocytu (popřípadě více neutrofilů), kdy neutrofil těsně doléhal na nádorovou buňku a nesl tvar písmene D nebo C. Šlo o spojení ve více bodech a při přeastřování do různých rovin se neobjevil volný prostor mezi buňkami. Kvantifikace pokusu byla vyhodnocena na základě fotografií pořízených při zvětšení $400\times$ v intervalu 20, 30 a 40 minut koinkubace a při různých rovinách zaostření. Byly vybrány tři fotografie pro každý časový interval, na kterých byl největší počet nádorových buněk. Na vybraných fotografiích byly určeny počty kontaktů a frustrované fagocytózy. Konečný výsledek je uváděn jako procento interakcí a procento frustrované fagocytózy. Tyto hodnoty jsou dány výpočtem:

$$\% \text{ interakcí} = \frac{\text{počet kontaktů}}{\text{počet nádorových buněk}} * 100$$

$$\% \text{ fr. fagocytózy} = \frac{\text{počet fr. fagocytóz}}{\text{počet kontaktů}} * 100$$

Průběh pokusu byl zaznamenán i ve formě videa. Nádorové buňky s laminarin-BAM byly koinkubovány s aktivovanými neutrofilů 10 minut při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Následně byla každých 15 sekund pořízena fotografie jednoho místa. Fotografování trvalo 40 minut a celkem bylo pořízeno 160 fotografií. Následně byly fotografie seřazeny do jedné sekvence od délce 00:36 s.

6.12.7 Buněčná signalizace

Nádorové buňky bez nebo s navázaným ligandem byly nasazeny do jamek 24 jamkového panelu v počtu 200 000 buněk. Následně byly přidány aktivované neutrofilů v počtu 400 000 buněk na jamku. Priming neutrofilů byl proveden podle uvedeného protokolu. Po 20 minutách vyla suspenze neutrofilů centrifugována a cytokiny byly odmyty. Tím byl priming ukončen. Buňky byly spolu inkubovány 0 – 90 minut při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $5\% \text{ CO}_2$. V časech 0, 60, a 90 minut byla interakce nádorových buněk a neutrofilů zastavena lyzačním roztokem (RI-PA buffer s inhibitory fosfatáz a proteáz). Lyzační roztok obsahoval 1% Nonidet P-40, 0.25% deoxycholátu sodného, 1 mM EGTA, 150 mM NaCl, a 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) a inhibitory proteáz (10 $\mu\text{g/ml}$ aprotinin, 1 $\mu\text{g/ml}$ leupeptin, 1 mM fenylmethylsulfonyl fluorid, 1 $\mu\text{g/ml}$ pepstatin) a fosfatáz (25 mM fluorid sodný and 2 mM orthovanadát sodný). Bu-

něčné lyzáty byly smíchány s $2 \times$ SDS-PAGE loading buffer. Proteiny vzorku byly separovány metodou SDS-PAGE a přeneseny na Immobilon-P membránu. Imunoblotty byly inkubovány s anti-fosfo-NF- κ Bp65 protilátkou a s anti- β -actin protilátkou (ředění 1:1000). Proteiny byly vizualizovány prostřednictvím chemiluminiscence (přístroj Uvitec Cambridge, software Alliance 4.7).

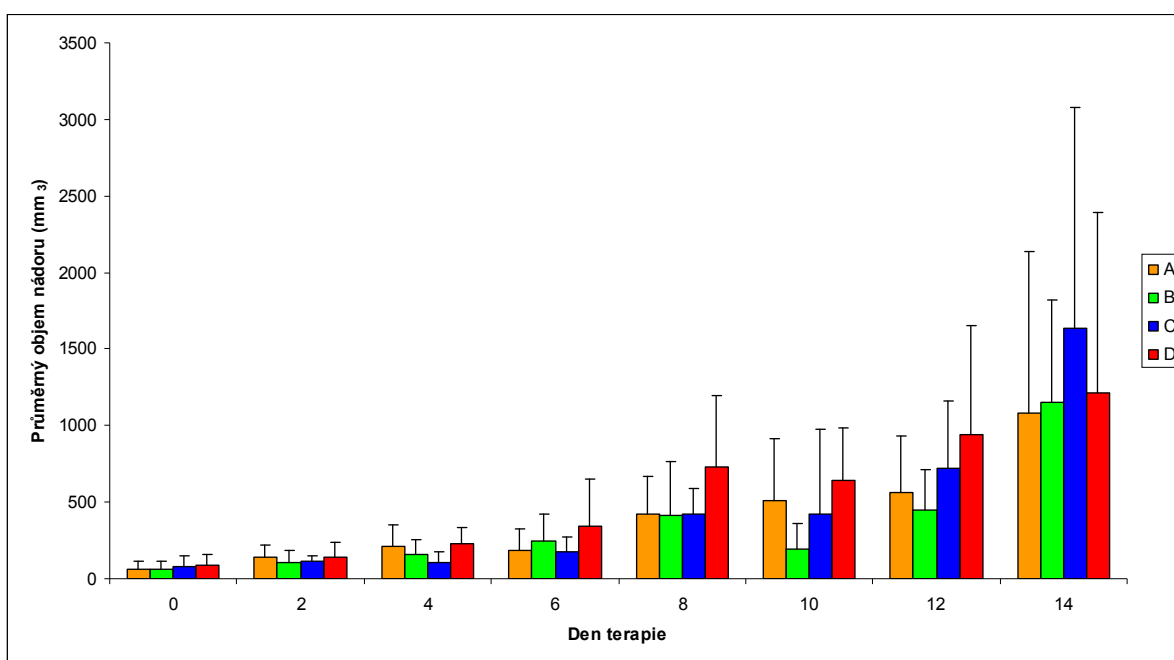
Přehled skupin:

- Skupina A – neaktivované neutrofilly
- Skupina B – aktivované neutrofilly (30 minut po zahájení primingu)
- Skupina C – aktivované neutrofilly (2 hodiny a 30 minut po zahájení primingu)
- Skupina D – aktivované neutrofilly (4 hodiny po zahájení primingu)
- Skupina E, H, K – B16-F10 + PBS + aktivované neutrofilly (4 hodiny po zahájení primingu), čas 0 (E), 60 (H), 90 (K) minut
- Skupina F, I, L – B16-F10 + 0,02 mM volný laminarin + aktivované neutrofilly (4 hodiny po zahájení primingu), čas 0 (F), 60 (I), 90 (L) minut
- Skupina G, J, M – B16-F10 + 0,02 mM laminarin-BAM + aktivované neutrofilly (4 hodiny po zahájení primingu), čas 0 (G), 60 (J), 90 (M) minut

7. VÝSLEDKY

7.1 Studium možnosti použití agonisty TLR7 Imiquimodu (R-837) v imunoterapii nádorů s vázaným manan-BAM

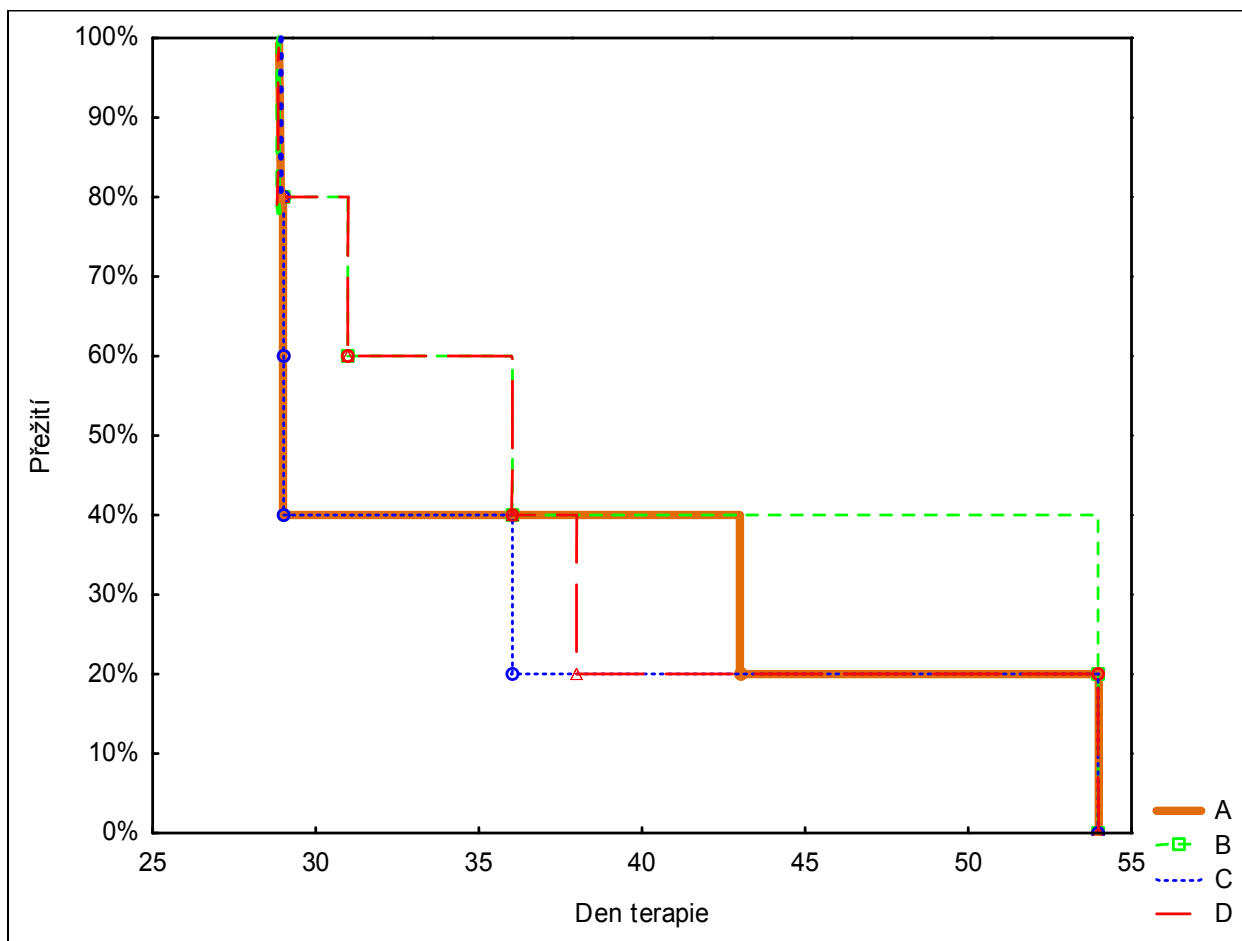
V tomto pokusu byl sledován vliv Imiquimodu na růst nádoru a přežívání myši. Jak je z grafu (Obr. 1) patrné, samotný R-837 (skupina A) ani v kombinaci s manan-BAM (skupina C) nevyvolává statisticky významnou redukci nádorového růstu vzhledem ke kontrolní skupině (skupina D).



Obr. 1: Vliv terapie založené na Imiquimodu v kombinaci s manan-BAM na růst nádoru.

Skupina A – R-837 s.c., skupina B – manan-BAM i.t., skupina C – manan-BAM i.t. + R-837 s.c., skupina D – PBS

Po ukončení terapie byla sledována doba přežití myši. Nebylo dosaženo statisticky významně delšího přežití myši proti kontrole (skupina D). Vliv Imiquimodu samotného i v kombinaci s kotveným mananem na přežívání myši je na obrázku 2.

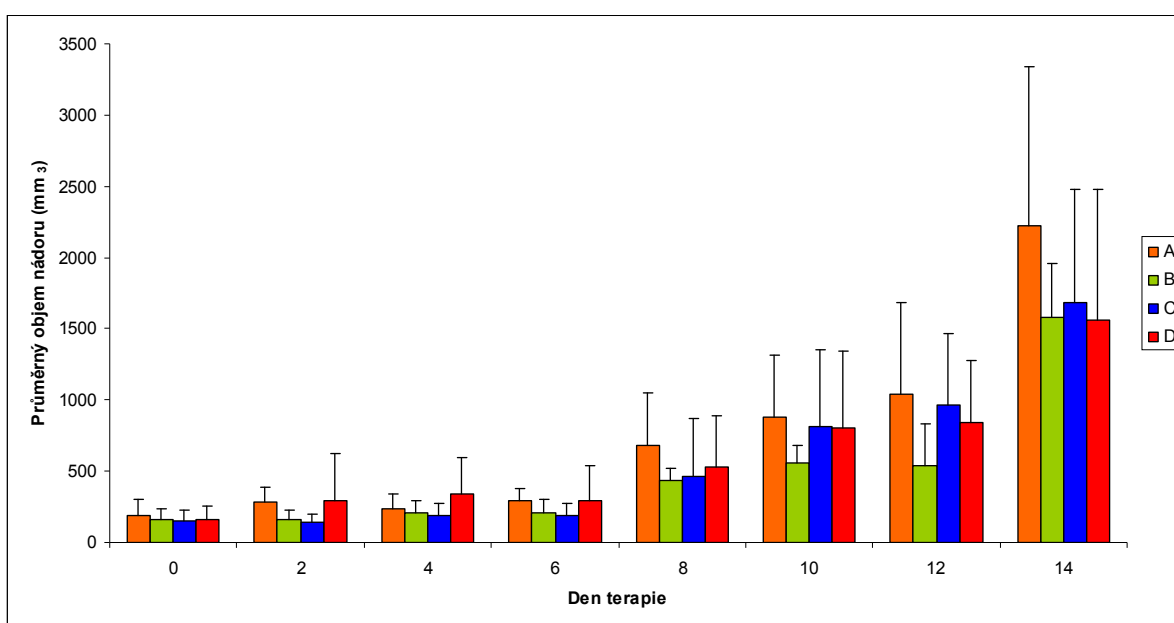


Obr. 2: Vliv terapie založené na Imiquimodu v kombinaci s manan-BAM na délku přežití.

Skupina A – R-837 s.c., skupina B – manan-BAM i.t., skupina C – manan-BAM i.t. + R-837 s.c., skupina D – PBS

7.2 Chemoatrakce neutrofilů do oblasti nádoru pomocí f-MLF a vliv této terapie na růst nádoru s ukotveným mananem

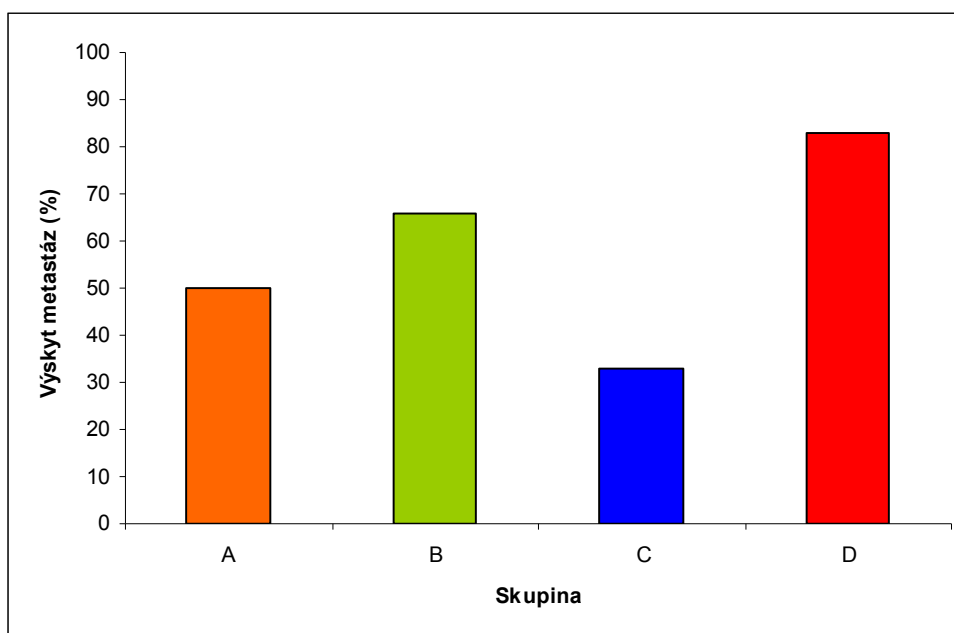
Tento experiment sledoval vliv terapie založené na použití neutrofilního chemoatraktantu na růst nádoru a výskyt metastáz. Následující graf (Obr. 3) ukazuje, že samotné volné 5 mM f-MLF (skupina A) nemá redukční účinek, ba naopak zde docházelo k nárůstu mírně větších nádorů než v kontrolní skupině (skupina D). O něco lepší účinek měl vázaný manan (skupina B). Po přidání volného 5 mM f-MLF k manan-BAM (skupina C) nebyl zaznamenán žádný efekt v porovnání se všemi ostatními skupinami.



Obr. 3: Vliv chemoatrakce neutrofilů do nádoru na jeho růst.

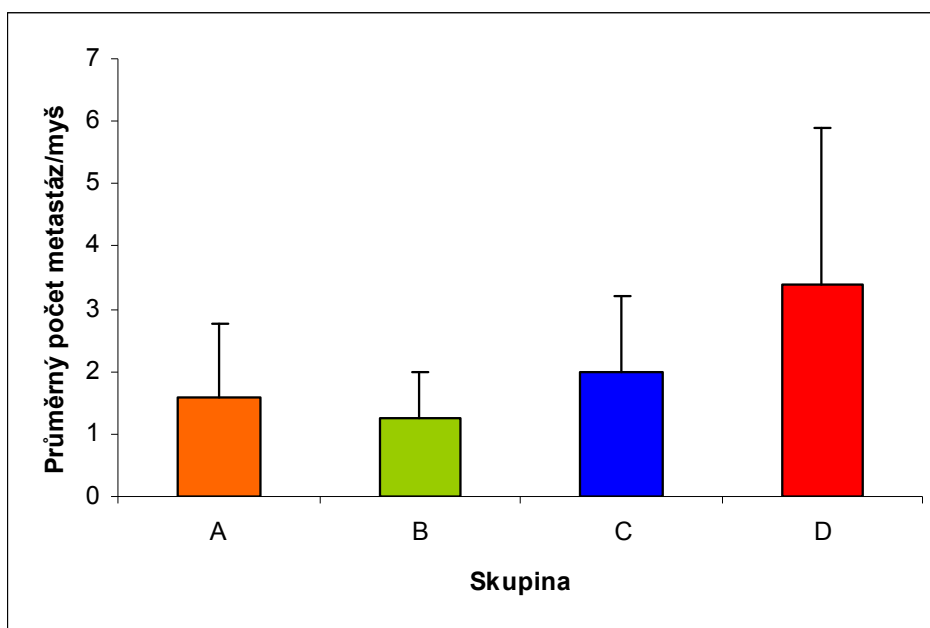
Skupina A – f-MLF, skupina B – manan-BAM, skupina C – f-MLF + manan-BAM, skupina D – PBS

Procentuální výskyt metastáz nádoru v plicích je uveden na obrázku 4. V kontrolní skupině byly nalezeny metastázy u 5 ze 6 myší. U léčených myší (skupiny A – C) byla intenzita metastazování nižší. Obrázek 5 uvádí průměrný počet metastáz na myš u myší, u kterých byly metastázy nalezeny. Četnost metastáz v neléčené skupině (skupina D) byla asi 2 x vyšší oproti léčeným skupinám (skupiny A – C).



Obr. 4: Procentuální výskyt metastáz u jednotlivých skupin (chemoatrakce neutrofilů).

Skupina A – f-MLF, skupina B – manan-BAM, skupina C – f-MLF + manan-BAM, skupina D – PBS



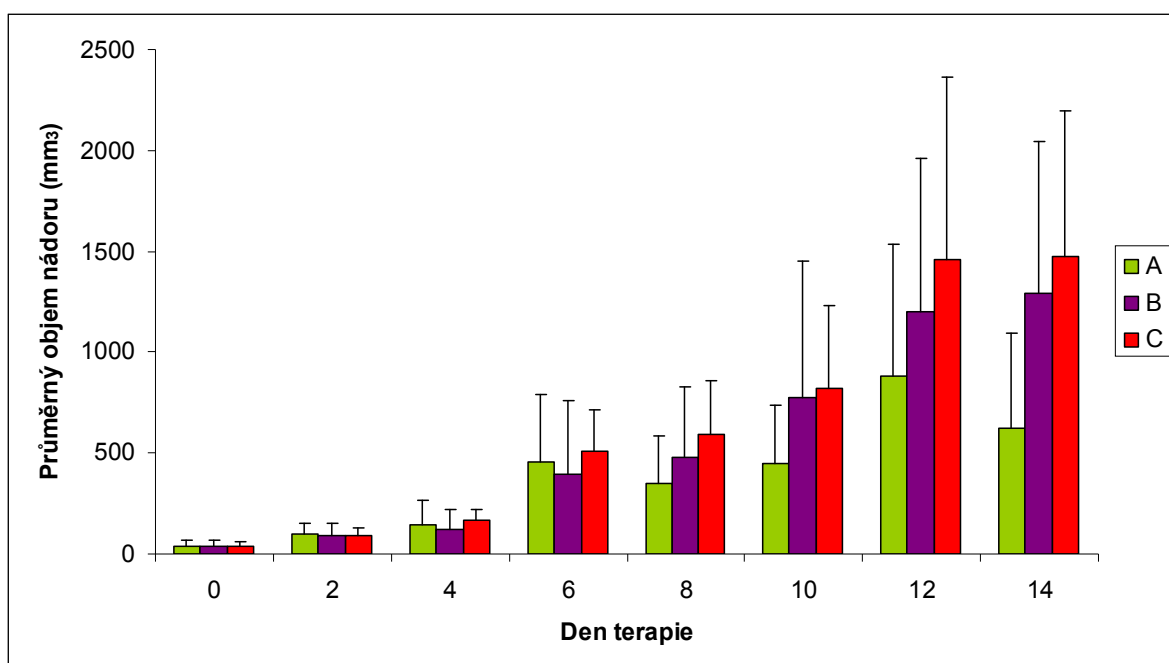
Obr. 5: Průměrný počet metastáz v jednotlivých skupinách (chemoatrakce neutrofilů).

Skupina A – f-MLF, skupina B – manan-BAM, skupina C – f-MLF + manan-BAM, skupina D – PBS

7.3 Vliv intratumorální aplikace aktivovaných neutrofilů v kombinaci s manan-BAM na růst nádoru

V tomto pokusu byl zjišťován vliv kotveného mananu s přidáním aktivovaných neutrofilů na růst nádoru a výskyt metastáz. Neutrofilů pocházely z kostní dřeně a jejich čistota byla 90 %.

Použití samotného manan-BAM (skupina B) nemělo žádný vliv na růst nádoru. Přídavek neutrofilů k manan-BAM (skupina A) vedl jen k nevýrazné redukci nádorového růstu. Červeně označené skupině C bylo podáváno PBS a tato skupina byla kontrolou. Výše uvedené je na obrázku 6.

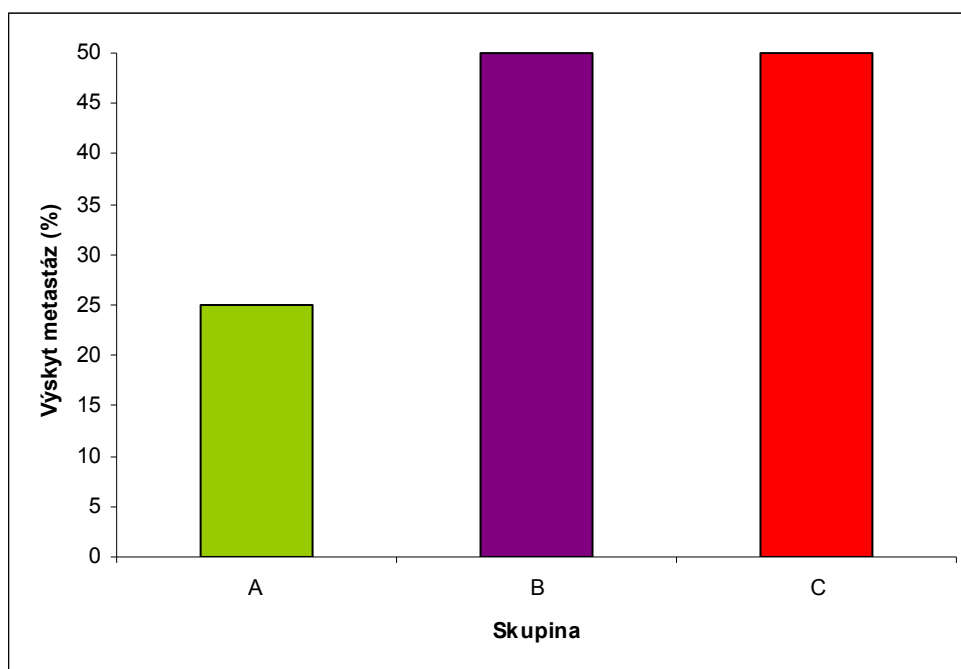


Obr. 6: Vliv terapie založené na intratumorální aplikaci neutrofilů na růst nádoru.

Skupina A – manan-BAM + aktivované neutrofilů, skupina B – manan-BAM, skupina C – PBS

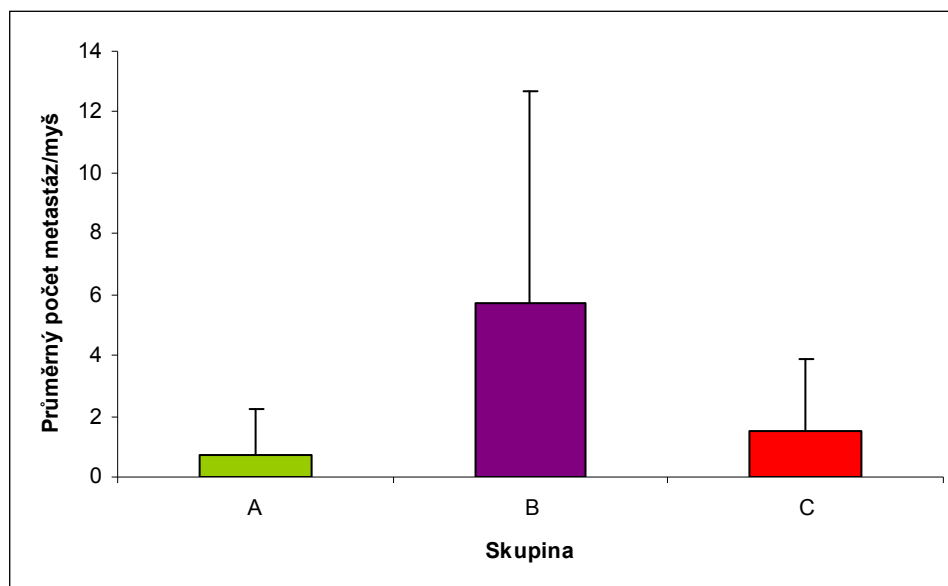
Procentuální výskyt metastáz melanomu B16-F10 v plicích je zobrazen na obrázku 7 a průměrný počet metastáz ve skupině je na následujícím grafu (Obr. 8). Skupina A, které byly aplikovány aktivované neutrofilů, měla metastáz méně než kontrolní skupina (skupina C). Na druhou stranu, zaměříme-li se na skupinu léčenou manan-BAM (skupina B) zjistíme, že se metastázy objevily u poloviny myši, stejně tak jako v kontrolní skupině (skupina C),

avšak v celkově vyšším počtu. Stručně, pozitivní vliv na metastazování tohoto nádoru nebyl zjištěn.



Obr. 7: Procentuální výskyt metastáz u jednotlivých skupin (i.t. aplikace neutrofilů).

Skupina A – manan-BAM + aktivované neutrofilů, skupina B – manan-BAM, skupina C – PBS



Obr. 8: Průměrný počet metastáz v jednotlivých skupinách (i.t. aplikace neutrofilů).

Skupina A – manan-BAM + aktivované neutrofilů, skupina B – manan-BAM, skupina C – PBS

7.4 *In vitro* analýza cytotoxického efektu neutrofilů na nádorové buňky

Tento pokus si kladl za cíl určit schopnost neutrofilů zabíjet nádorové buňky B16-F10. Ke zjištění tohoto cíle byl použit kit od firmy Perkin&Elmer. Cílovými buňkami byly buňky melanomu B16-F10 a jako efektorové buňky byly použity neutrofilů z peritonea (30% čistota). Pokus byl proveden 6 × v několika modifikacích.

Opakovaně se objevovaly potíže v podobě nízkých a rozkolísaných hodnot maximálního uvolnění, a zároveň vysokého pozadí i hodnot spontánního uvolnění. Přehled naměřených hodnot (fluorescenční jednotky) v jednotlivých experimentech přibližuje následující tabulka (Tab. 1). V pokusu 2 a 3 byl pro naměření pozadí použit špatný vzorek. Šlo o supernatant odebraný během promývání po inkubaci buněk B16-F10 s fluorescenčním ligandem. Tento supernatant byl změřen i v ostatních pokusech a stejně jako v pokusech 2 a 3 bylo dosaženo hodnot nad 40 000 fluorescenčních jednotek. Po dalším promytí supernatant obsahoval stále ještě dalších 10 000 fluorescenčních jednotek.

Otázkou také bylo to, zda použití fagocytárního ligandu f-MLFKK-DOPE na buňky předtím inkubované s fluorescenčním ligandem nemá tento test cytotoxicity. Provedení testu bez ligandu však ukázalo, že tím to není. Nedošlo zde ke zvýšení maximálního uvolnění za současného snížení spontánního uvolnění (Tab. 1).

Pokus č.	1	2	3	4	5	6
Ligand	f-MLFKK-DOPE	f-MLFKK-DOPE	bez ligandu	bez ligandu	bez ligandu	bez ligandu
Max. uvolnění	4 512	836	22 500	1 231	2 000	20 533
Spont. uvolnění	3 350	741	6 472	453	1 934	14 001
Pozadí	3 242	---	---	219	1 305	3 000

Tab. 1: Naměřené hodnoty maximálního a spontánního uvolnění a pozadí.

V rámci optimalizace testu bylo pracováno s neutrofilů v pokusech 1, 3, 4, 5. Byly použity různé poměry nádorových buněk ku neutrofilům (1:50 – 1:6). Neutrofilů byly aktivovány přídatkem PMA (100 ng/ml). Ani v případě koinkubace nádorových buněk s neutrofilů nebylo dosaženo optimálních hodnot. V každém pokusu bylo dosaženo přibližně stejných hodnot fluorescence napříč rozdílnými poměry. Kolísání hodnot skrz jednotlivými pokusy koreluje se zjištěnými parametry testu (maximální uvolnění, spontánní uvolnění,

pozadí). Například v pokusu č. 1 a č. 5 byly zjištěny téměř shodné hodnoty, přestože se lišily přidavkem f-MLFKK-DOPE. Podle očekávání měl být ve vzorcích s f-MLFKK-DOPE naměřen vyšší signál (pokus č. 1), neboť ligand slouží jako označení cíle zabití pro neutrofilů. Přehled získaných průměrných hodnot fluorescence z vzorků s neutrofilů je v tabulce 2.

Pokus č.	1	3	4	5
Ligand	f-MLFKK-DOPE	bez ligandu	bez ligandu	bez ligandu
1:50	2 792	7 296	500	2 142
1:25	3 035	8 872	474	2 042
1:12,5	2 997	9 963	520	1 968
1:6	2 074	8 210	531	2 187

Tab. 2: Naměřené hodnoty fluorescence ve vzorcích s neutrofilů (různé poměry).

Další modifikací bylo provedení testu s 30 minutovou inkubací navíc při 37 °C, bez fagocytárního ligandu. V této době byl panel s nádorovými buňkami umístěn v inkubátoru. Po uplynutí 30 minut byly přidány neutrofilů a byla započata dvouhodinová koinkubace neutrofilů a nádorových buněk. Interval 30 minut navíc nahrazoval dobu, kdy byly nádorové buňky v ostatních pokusech inkubovány s fagocytárním ligandem, která následovala až po inkubaci s fluorescenčním ligandem. Z tabulky 3 je dobře patrné, že 30 minut navíc v průběhu testu nezpůsobilo žádný rozdíl v naměřených hodnotách. Jedná se o průměrné hodnoty získané ze vzorků s neutrofilů. Přidání 30 minut navíc úspěšnému provedení testu nebrání.

Poměr NB : neu	bez 30 min	s 30 min	rozdíl
1:50	2 142,5	2 352,5	210
1:25	2 042	2 009,5	-32,5
1:12,5	1 968	2 062,2	94,2
1:6	2 187,5	2 104,5	-83

Tab. 3: Hodnoty fluorescence naměřené ve variantě pokusu s 30 minutami navíc.

V pořadí další modifikací bylo provedení pokusu takové, že koinkubace nádorových buněk a neutrofilů byla prodloužena na 3 hodiny místo původních 2 hodin. Tato varianta byla provedena 2 ×. Nádorové buňky nenesly fagocytární ligand, a ani nebyl do pokusu za-

řazován žádný čas navíc. Hodnoty fluorescenčního signálu byly změřeny nejprve po dvou hodinách koinkubace a poté po další hodině. Nárůst hodnot fluorescence byl v případě pokusu číslo 5 průměrně $13,5 \times$ a v pokusu číslo 6 průměrně $1,6 \times$. Důležité je podotknout, že nárůst byl mezi sledovanými parametry přibližně stejný. Tedy o hodinu delší koinkubace nevedla ke zpřesnění pokusu (Tab. 4).

	Pokus č. 5			Pokus č. 6		
	2 hodiny	3 hodiny	nárůst	2 hodiny	3 hodiny	nárůst
Max. uvolnění	2 000	25 413	$12,5 \times$	20 533	38 000	$1,8 \times$
Spont. uvolnění	1 934	28 338	$14,6 \times$	14 001	17 000	$1,2 \times$
Pozadí	1 305	17 500	$13,4 \times$	3 000	5 000	$1,6 \times$

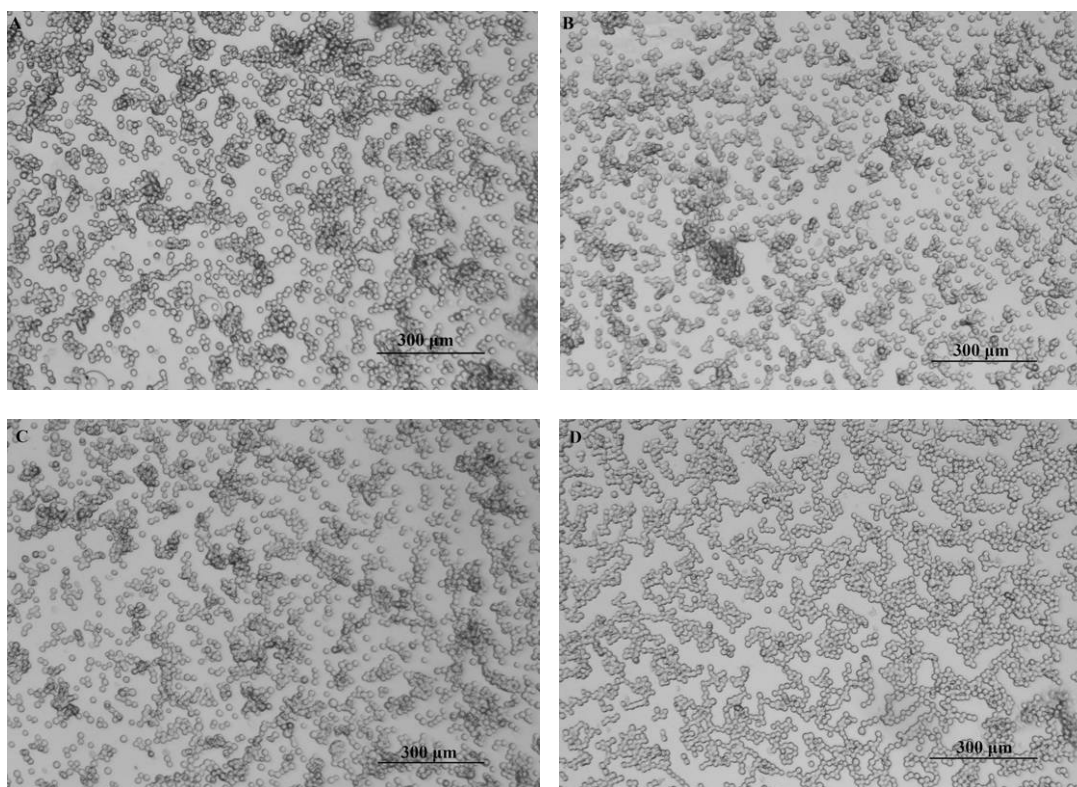
Tab. 4: Rozdíly mezi dvou- a tříhodinovou koinkubací nádorových buněk a neutrofilů (fluorescenční jednotky).

7.5 Vliv fagocytárního ligandu na tvorbu shluků buněk *in vitro*

Před zahájením experimentů týkajících se interakcí buněk bylo potřeba zjistit, zda ligandy používané v *in vivo* terapii a v *in vitro* pokusech nemají vliv na samotné nádorové buňky nebo na neutrofile. Tedy hlavním záměrem v tomto případě bylo sledovat změny v suspenzi buněk pod vlivem přídatku fagocytárního ligandu, ať už jeho kotvené a volné varianty nebo jeho nefunkční náhrady. Chování buněk bylo sledováno pod invertovaným mikroskopem a zachyceno na fotografiích při zvětšení 40 – 400 ×. Čistota použitých neutrofilů z kostní dřeně byla průměrně 90 %.

Bylo zjištěno, že vázané f-MLF (0,05 mM f-MLFKK-BAM) shlukuje nádorové buňky do klastrů (Obr. 9/A). Shluky byly pozorovány po 15 – 20 minutách inkubace buněk s ligandem při 37 stupních Celsia. Tyto shluky nebyly rozvolněny ani přídatkem 0,05 mM volného f-MLF (Obr. 9/B), ani přídatkem 0,5 mM volného f-MLF ve výsledné koncentraci (Obr. 9/C). Rozvolnění klastrů vzniklých po přídatku f-MLFKK-BAM bylo zkoušeno ve dvou variantách: 1) volné f-MLF bylo přidáváno až po 30minutové inkubaci s vázaným f-MLF (bez obrázku); 2) volné i vázané f-MLF byly přidány zároveň v čase 0 (Obr. 9/B a Obr. 9/C). Ani jedna z variant nevedla k rozvolnění klastrů vytvořených pod vlivem f-MLFKK-BAM. Samotné volné f-MLF (obě koncentrace) nevytvářelo klastry nádorových buněk (bez obrázku). Jestliže bylo k nádorovým buňkám v suspenzi přidáno ekvivalentní množství PBS místo ligandu, klastry se nevytvořily (Obr. 9/D). Fotografie (Obr. 9/A – D) byly pořízené po 30 minutové inkubaci při 37 °C při celkovém zvětšení 40 ×, kdy volný i vázaný ligand byly přidány zároveň v čase 0.

Testována byla i nefunkční náhrada f-MLF (HMLF i HMLFKK-BAM). Analogicky byly provedeny experimenty s ostatními ligandy. Přehled výsledků je uveden v tabulce 5. Všechny pokusy tohoto druhu byly provedeny s odmytým i neodmytým nadbytkem ligandu. Shluky se vytvářely po 15 – 20 minutách inkubace při 37 °C a trvaly až do konce pozorování (60 minut).



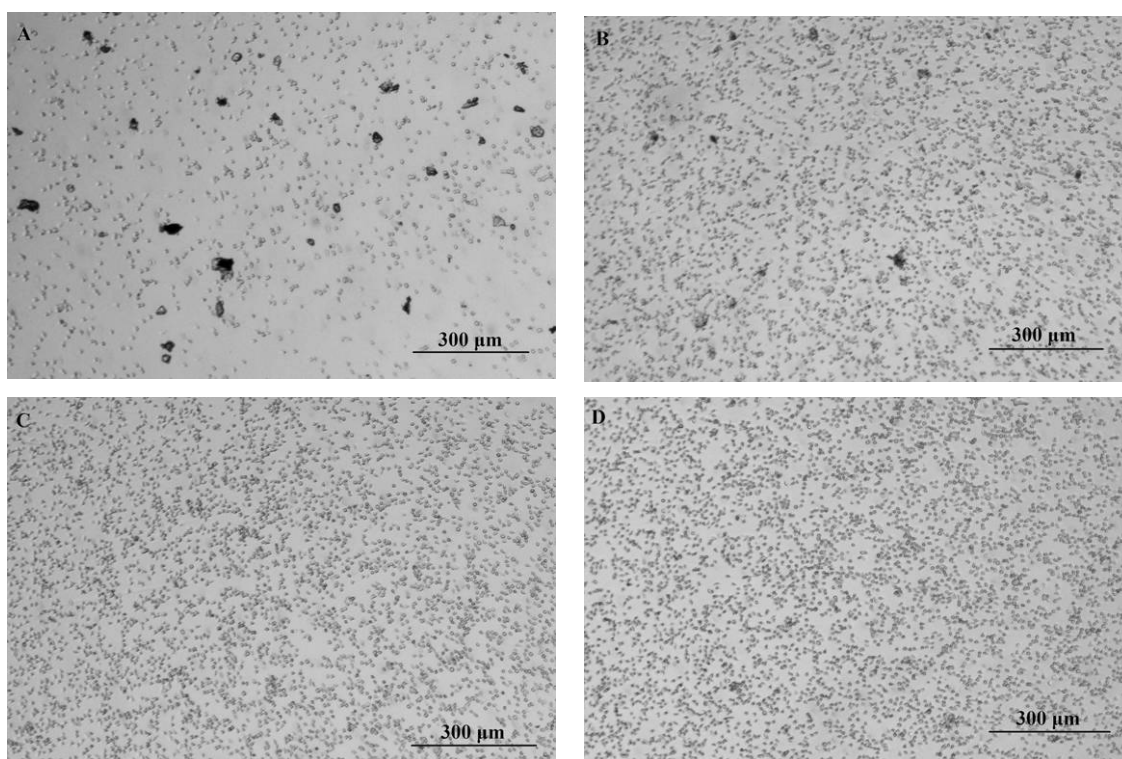
Obr. 9: Vliv f-MLF na suspenzi nádorových buněk.

A – 0,05 mM f-MLFKK-BAM, B – 0,05 mM f-MLFKK-BAM + 0,5 mM f-MLF, C – 0,05 mM f-MLFKK-BAM + 0,5 mM f-MLF, D – PBS, 30 minut po inkubaci při 37 °C, zvětšení 40 ×.

Ligand	Koncentrace	Nadbytek ligandu	Tvorba klastrů	Ligand	Koncentrace	Nadbytek ligandu	Tvorba klastrů
f-MLFKK-BAM	0,05 mM	odmyt	ano	laminarin-BAM	0,02 mM	neodmyt	ne
f-MLFKK-BAM	0,05 mM	neodmyt	ano	lysin-BAM	0,02 mM	odmyt	ne
HMLFKK-BAM	0,05 mM	odmyt	ne	lysin-BAM	0,02 mM	neodmyt	ne
HMLFKK-BAM	0,05 mM	neodmyt	ne	volný laminarin	0,02 mM	neodmyt	ne
volné f-MLF	0,05 mM	neodmyt	ne	manan-BAM	0,02 mM	odmyt	ne
volné f-MLF	0,05 mM	neodmyt	ne	manan-BAM	0,02 mM	neodmyt	ne
laminarin-BAM	0,02 mM	odmyt	ne	volný manan	0,02 mM	neodmyt	ne

Tab. 5: Vliv fagocytárního ligandu a jeho náhrad na suspenzi nádorových buněk.

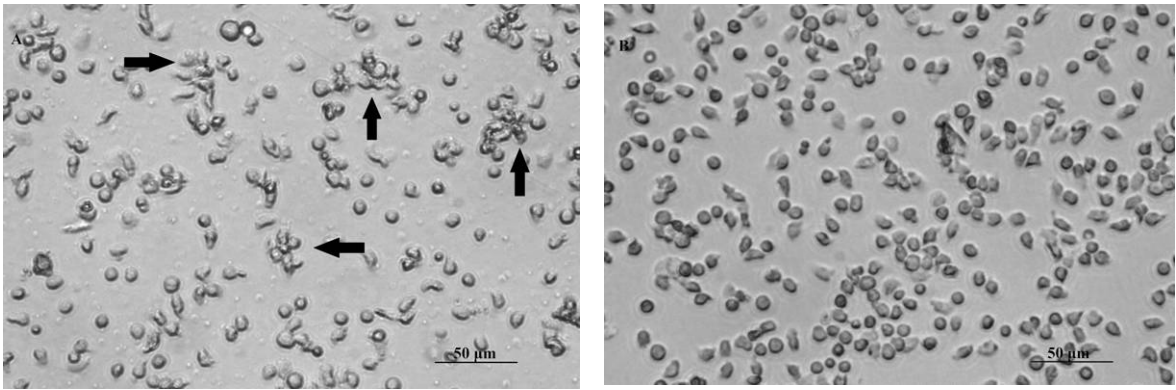
Specifický vliv kotveného f-MLF byl zaznamenán i na suspenzi neutrofilů. Na obrázku 10 jsou záběry suspenze neutrofilů. Pod vlivem samotného 0,05 mM f-MLFKK-BAM bez odmytí nadbytku (Obr. 10/A) se neutrofilové agregovaly do výrazných klastrů. Přídavek 0,05 mM f-MLFKK-BAM a zároveň 0,5 mM f-MLF též vedl k ustavení shluků buněk (Obr. 10/B). Volný f-MLF nedokázal účinek f-MLFKK-BAM nikterak ovlivnit. Vzorek se samotným 0,5 mM f-MLF (Obr. 10/C) vykazoval stejný vzor jako skupina s PBS (Obr. 10/D). Pokus byl ještě opakován v podobném designu jako u nádorových buněk. Nejprve se neutrofilové nechaly 30 minut inkubovat s kotveným f-MLF, a poté byl přidán 0,5 mM volný f-MLF (bez obrázku). Ani zde nedošlo k rozpadu klastrů.



Obr. 10: Vliv f-MLF na suspenzi neutrofilů. Tvorba klastrů.

A – 0,05 mM f-MLFKK-BAM, B – 0,05 mM f-MLFKK-BAM + 0,5 mM f-MLF,
C – 0,5 mM f-MLF, D – PBS, 20 minut po inkubaci při 37 °C, zvětšení 40 ×

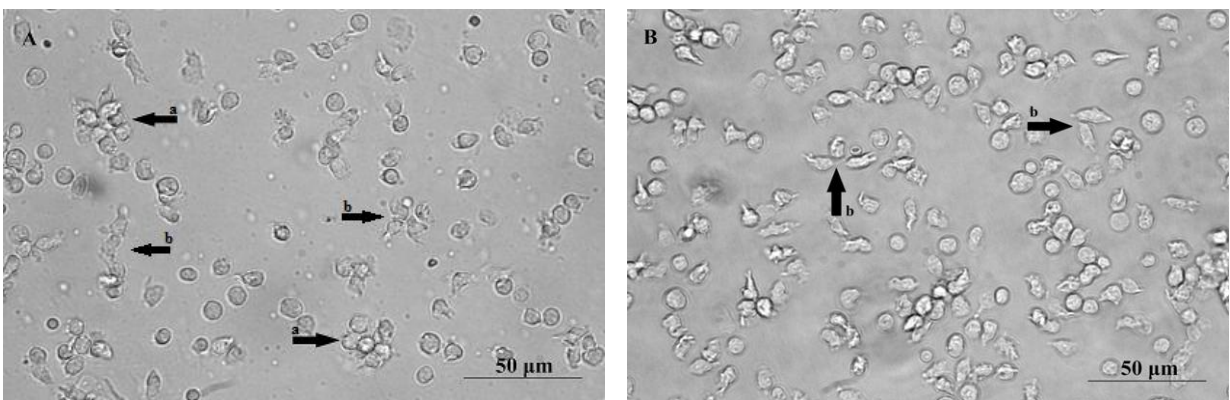
Detailnější pohled na tvorbu agregátů neutrofilů pod vlivem 0,05 mM f-MLFKK-BAM je možné vidět na obrázku 11. Velké klastry buněk jsou označeny šipkami.



Obr. 11: Tvorba klastrů neutrofilů pod vlivem f-MLFKK-BAM.

A – 0,05 mM f-MLF-BAM, B – PBS, 30 minut po inkubaci při 37 °C, zvětšení 200 ×

Kromě charakteristického shlukování se v tomto případě objevil další fenomén. Neutrofilů pod vlivem f-MLFKK-BAM i volného f-MLF měnily tvar z hladkého kulatého na oválný střapatý. Morfologická změna neutrofilů byla zachycena na fotografiích při zvětšení 400 × po 30 minutové inkubaci při 37 °C. Změna nepostihla 100 % buněk. Tyto změny jsou dobře viditelné na následujících fotografiích (Obr. 12). Velké klastry (a) a příklady morfologických změn (b) jsou označeny šipkami.



Obr. 12: Změna tvaru neutrofilů a tvorba klastrů pod vlivem f-MLF.

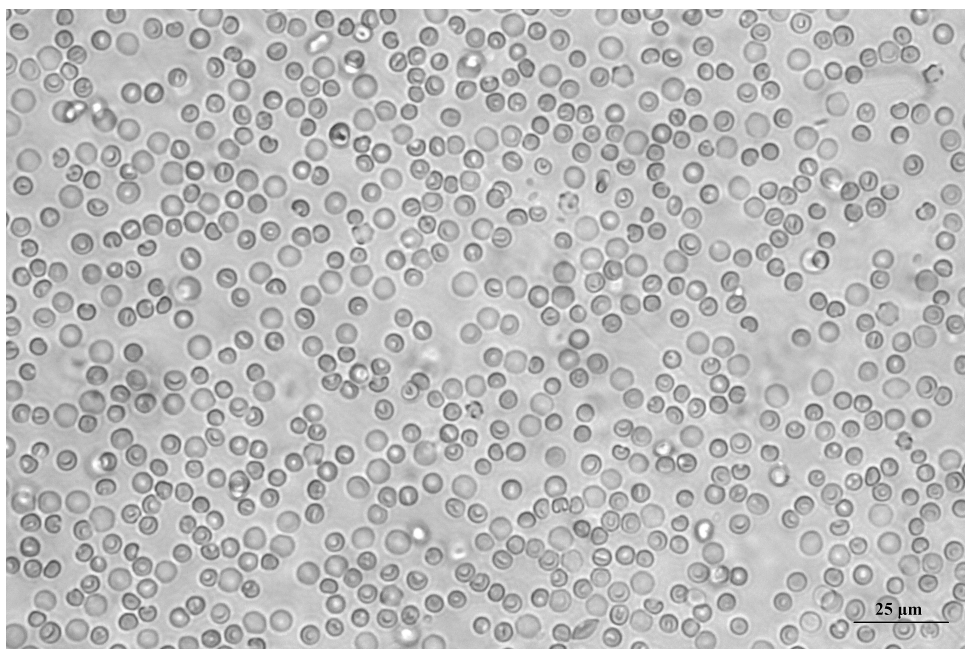
A – 0,05 mM f-MLFKK-BAM, B – 0,05 mM volné f-MLF, a – velké klastry, b – morfologické změny po 30 minutách inkubace, zvětšení 400 ×

Stejná změna tvaru nastala i při prodloužení aktivace neboli primingu neutrofilů na více než 35 minut, zatímco pro *in vitro* pokusy byly neutrofilů standardně aktivovány

20 minut. Dvacetiminutová inkubace s GM-CSF a TNF- α nevyvolala morfologickou změnu neutrofilů (bez obrázku).

Při použití laminarinu nebo mananu (kotvený i volný) nedocházelo ke tvorbě klastrů ani ke změně tvaru neutrofilů.

Byl vyhodnocen i vliv f-MLFKK-BAM na erythrocyty. Červené krvinky ani neměnily svůj tvar, a ani se neshlukovaly do klastrů. Suspenze erythrocytů s přidavkem f-MLFKK-BAM je na obrázku 13 a vykazovala stejný vzhled jako vzorek, do kterého bylo přidáno PBS (bez obrázku). Pozorování trvalo 60 minut.



Obr. 13: Vliv f-MLFKK-BAM na suspenzi erythrocytů. 20 minut po inkubaci při 37 °C, zvětšení 400 \times .

7.6 Tvorba interakcí buněk B16-F10 a myších neutrofilů

Účelem tohoto pokusu bylo zaznamenat atraktivitu fagocytárního ligandu vázaného na nádorové buňky pro neutrofilů. V pokusu byly použity neutrofilů z kostní dřeně. Jejich čistota dosáhla průměrně 90 %. Pokus byl zdokumentován fotografiemi při zvětšení 400 ×, na jejichž základě bylo provedeno i vyhodnocení. Průměrný počet nádorových buněk ve skupině byl $40,3 \pm 19,5$.

Rozdíly mezi kotveným ligandem a PBS nebo volným ligandem byly zcela zřejmé již při pohledu do mikroskopu. Po vyhodnocení pokusu z pořízených fotografií vyšlo najevo, že neutrofilů se statisticky více zajímají o nádorové buňky s kotveným ligandem. Ve vzorcích s volným ligandem nebo PBS byla atraktivita nádorových buněk pro neutrofilů minimální až žádná. Procentuální vyjádření množství kontaktů a tzv. frustrované fagocytózy jsou uvedena v tabulkách 6 a 7 pro f-MLF, 8 a 9 pro laminarin a 10 a 11 pro manan.

% interakcí	Minuty		
	Ligand	20	30
f-MLFKK-BAM	56,0*	61,6	64,4* ^o
volné f-MLF	18,9	20,2	8,3
PBS	10,6	5,5	6,1

Tab. 6: Procentuální vyjádření počtu interakcí ve skupině s f-MLF.

% fr. fagocytózy	Minuty		
	Ligand	20	30
f-MLFKK-BAM	58,9* ^o	31,1	36,0* ^o
volné f-MLF	4,8	11,1	0,0
PBS	13,3	0,0	0,0

Tab. 7: Procentuální vyjádření počtu případů fr. fagocytózy ve skupině s f-MLF.

* $p \leq 0,05$ vztaheno ke skupině s PBS, ^o $p \leq 0,05$ vztaheno ke skupině s volným f-MLF

% interakcí	Minuty		
	Ligand	20	30
laminarin-BAM	29,8* ^o	20,4	29,8* ^o
volný laminarin	22,5	1,4	9,7
PBS	2,6	4,2	6,1

Tab. 8: Procentuální vyjádření počtu interakcí ve skupině s laminarinem.

% fr. fagocytózy	Minuty		
	Ligand	20	30
laminarin-BAM	78,3 ^o	55,0	47,9*
volný laminarin	21,7	0,0	16,7
PBS	0,0	0,0	0,0

Tab. 9: Procentuální vyjádření počtu fr. fagocytózy ve skupině s laminarinem.

* $p \leq 0,05$ vztaheno ke skupině s PBS, ^o $p \leq 0,05$ vztaheno ke skupině s volným laminarinem

% interakcí	Minuty		
	20	30	40
Ligand			
manan-BAM	38,3*	55,7* ^o	91,7* ^o
volný manan	12,5	3,2	6,8
PBS	9,5	2,6	0,0

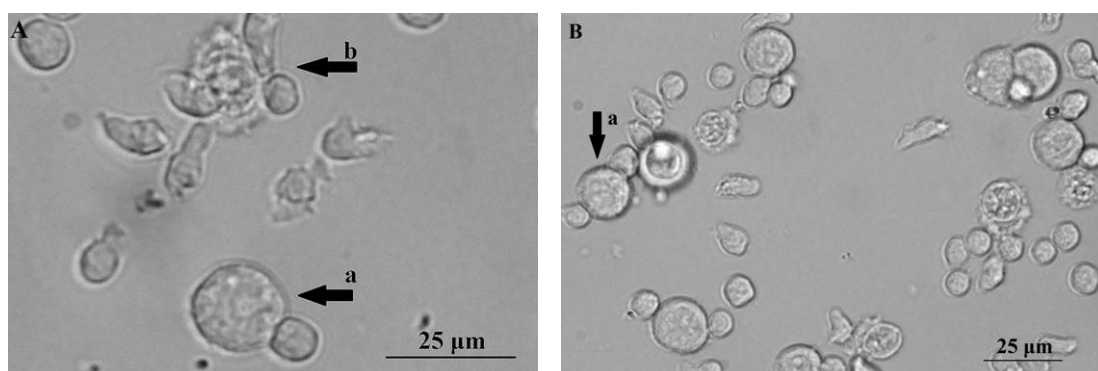
Tab. 10: Procentuální vyjádření počtu interakcí ve skupině s mananem.

% fr. fagocytózy	Minuty		
	20	30	40
Ligand			
manan-BAM	33,3	55,6* ^o	73,3* ^o
volný manan	11,1	0,0	0,0
PBS	0,0	0,0	0,0

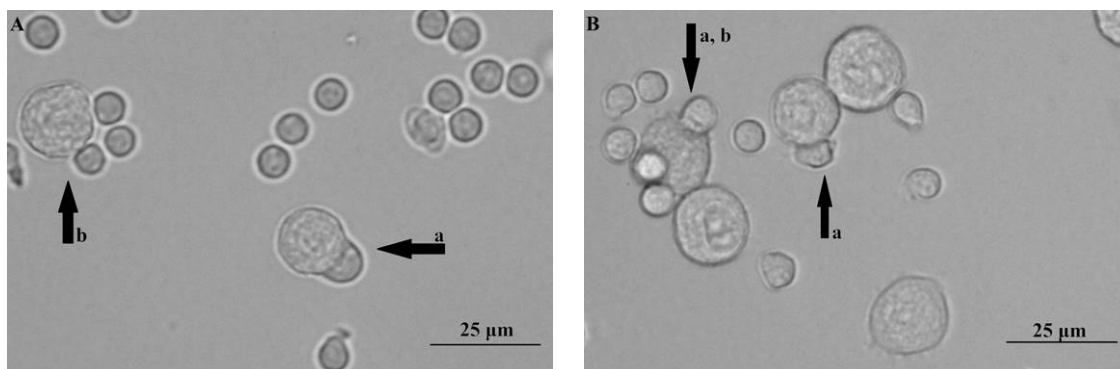
Tab. 11: Procentuální vyjádření počtu fr. fagocytózy ve skupině s mananem.

* $p \leq 0,05$ vztaženo ke skupině s PBS, ^o $p \leq 0,05$ vztaženo ke skupině s volným mananem

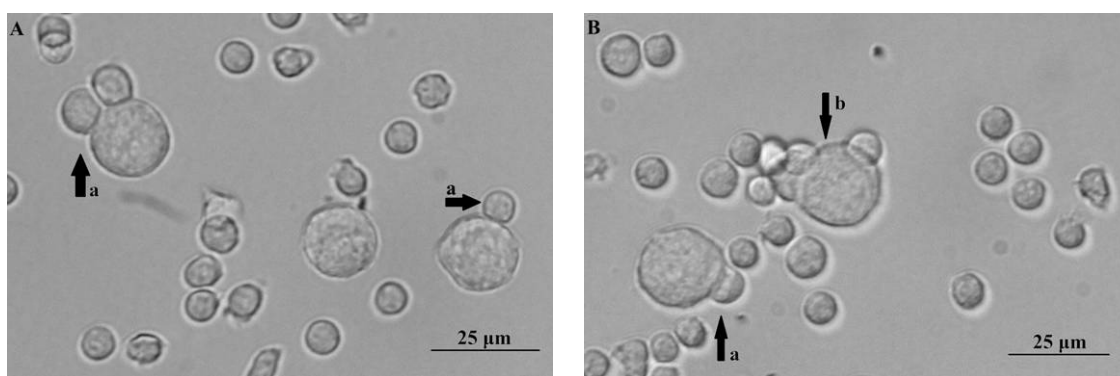
Nedílnou součástí tohoto pokusu byly fotografie, které přesvědčivě dokazují význam kotvení ligandu do membrány nádorových buněk pro *in vivo* terapii. Následující výběr reprezentativních fotografií ukazuje typické uspořádání buněk po koinkubaci. Obrázek 14/A prezentuje situaci po 30 minutách koinkubace při 37 °C a obrázek 14/B prakticky totéž po čtyřicetiminutové koinkubaci za stejných podmínek. Použitým ligandem byl f-MLFKK-BAM. Obdobná situace se vytvořila i ve vzorcích s laminarin-BAM (Obr. 15) a manan-BAM (Obr. 16). Souhrnně na všech fotografiích (Obr. 14 – 16) je možné vidět už definovanou frustrovanou fagocytózu (označeno šipkou s malým a) a tvorbu rozet (označeno šipkou s malým b). Za rozetu je považován útvar jedné nádorové buňky, kolem níž se shlukuje několik neutrofilů. Dále je možné vidět jednotlivé kontakty nádorových buněk a neutrofilů (bez označení šipkou).



Obr. 14: Interakce neutrofilů s nádorovými buňkami s f-MLFKK-BAM. A – 30 minut, B – 40 minut. a – frustrovaná fagocytóza, b – rozeta.

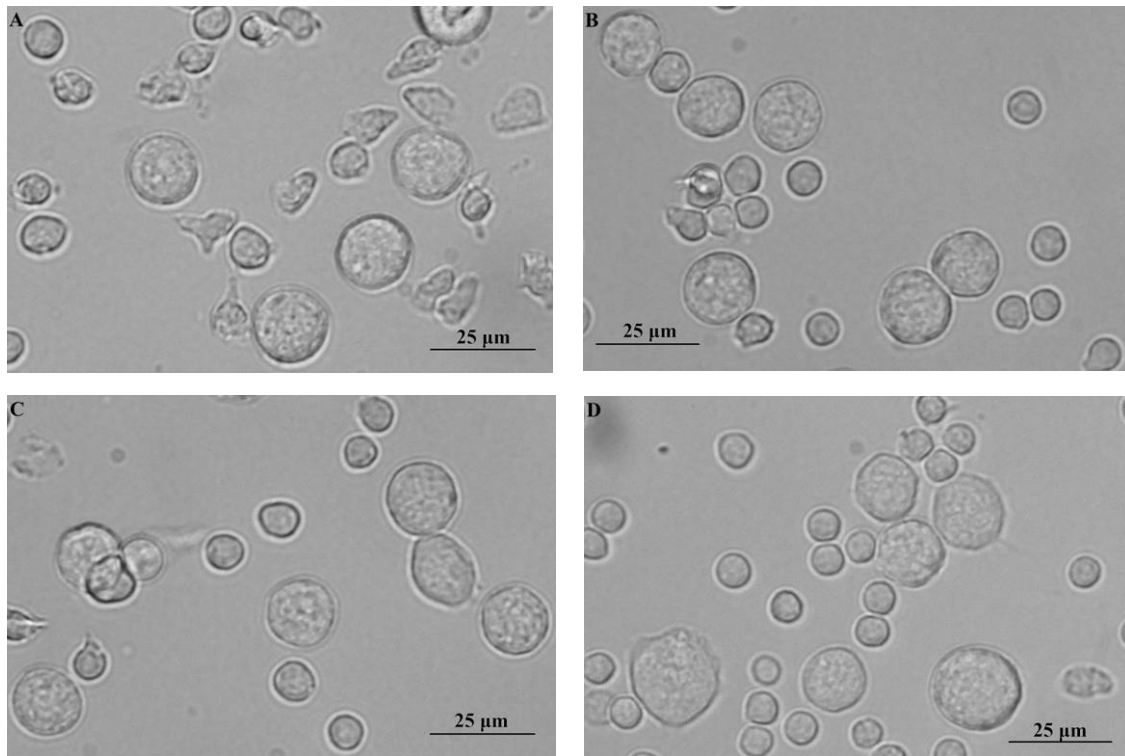


Obr. 15: Interakce neutrofilů s nádorovými buňkami s laminarin-BAM. A – 20 minut, B – 30 minut. a – frustrovaná fagocytóza, b – rozeta.



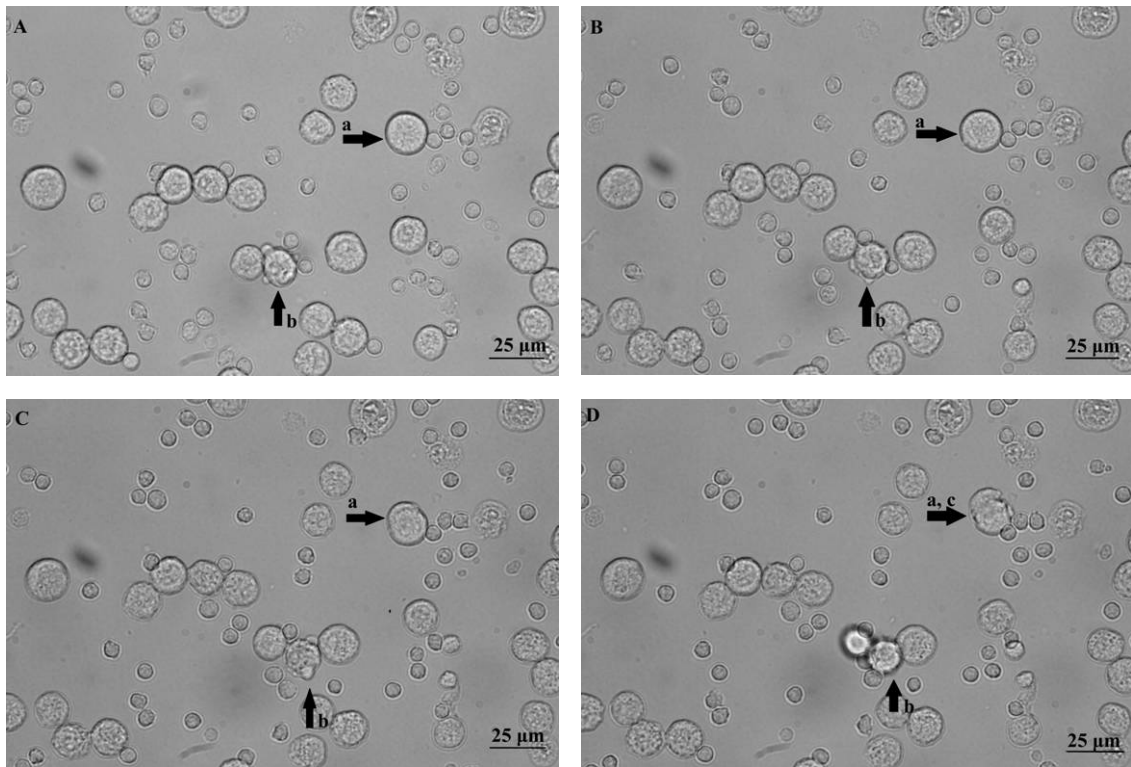
Obr. 16: Interakce neutrofilů s nádorovými buňkami s mannan-BAM. A – 30 minut, B – 40 minut. a – frustrovaná fagocytóza, b – rozeta.

Další série obrázků zobrazuje situaci ve vzorcích s volnými ligandy a s PBS. Na fotografiích je patrné, že neutrofilů jsou v blízkosti nádorových buněk, ale nedochází ke kontaktům, natož k výskytu frustrované fagocytózy (Obr. 17).



Obr. 17: Interakce neutrofilů s nádorovými buňkami. A – volné f-MLF, 30 minut, B – volný laminarin, 20 minut, C – volný manan, 40 minut, D – PBS, 30 minut.

Na závěr bylo pozorování zachyceno na videu. Video ukazuje 40 minut interakcí mezi aktivovanými neutrofilů a nádorovými buňkami s laminarin-BAM. Pořízení záznamu předcházela desetiminutová inkubace při 37 °C. Video zachycuje dvě významné události: 1) Tvorbu rozety v průběhu celého videa. Nádorová buňka je obklopena celou dobu několika neutrofilů. 2) Intenzivní kontakt neutrofilního granulocytu a nádorové buňky. Celkově tento kontakt trvá 25 minut, ale je přerušovaný. Jednotlivé sekvence kontaktu trvaly 1,25; 1; 3,25; 4,25; 0,75 a 8,5 minut. Po asi 20 minutách kontaktu nádorová buňka umírá. Na ostatních místech obrazu jsou vidět jednotlivé kontakty nádorových buněk a neutrofilů. Video bylo pořízeno při zvětšení 400 ×. Obrázek 18 přináší několik záběrů z pořízeného videa. Video je dostupné na adrese: <http://kme.prf.jcu.cz/content/studentske-prace>. V případě potíží s přehráváním videa je možné video uložit do počítače (CTRL+S) nebo mě kontaktovat na e-mailu NikVacova@seznam.cz.



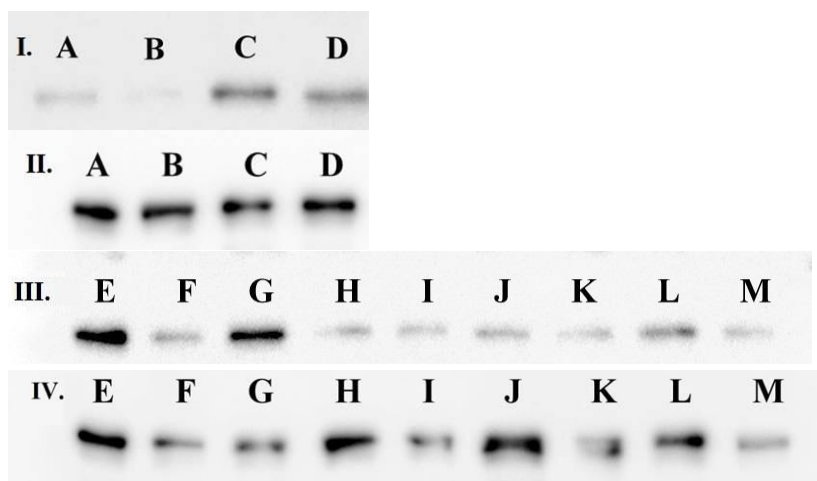
Obr. 18: Výběr záběrů z videa, 40 minutová koinkubace aktivovaných neutrofilů s B16-F10 s laminarin-BAM. A – 10. minuta, B – 18. minuta, C – 25. minuta, D – 27. minuta, a – frustrovaná fagocytóza, b – rozeta, c – buněčná smrt, zvětšení 400 ×.

7.7 Buněčná signalizace

Tento pokus patřil k těm, které měly potvrdit fakt, že pro účinnou terapii je nutné použít kotvené agonisty fagocytárních receptorů, a to na úrovni fosforylace transkripčního faktoru NF- κ B. Dále bylo ověřováno, zda priming aktivuje NF- κ B.

V tomto případě bylo potvrzeno, že po primingu neutrofilů je aktivováno NF- κ B. Na obrázku 19/I., II. jsou výsledky ze vzorků s neutrofilů bez nádorových buněk ve skupinách A – D. Obrázek 19/I. zachycuje množství fosforylovaného transkripčního faktoru NF- κ B, obrázek 19/II. množství β -aktinu jako kontroly. U neaktivovaných neutrofilů (skupina A) je množství fosforylovaného faktoru NF- κ B málo. Po 30 minutách od zahájení primingu (skupina B) u neutrofilů ještě nedošlo k zvýšení míry fosforylované verze NF- κ B, ale po 2,5 hodinách (skupina C) je již aktivace patrná, a ta trvá další 1,5 hodiny (skupina D).

Obrázek 19/III., IV. byl pořízen po koinkubaci nádorových buněk s aktivovanými neutrofilů (skupiny E – M). U většiny skupin, bez ohledu na to, zda byl či nebyl použit ligand a jaká forma, bylo dosaženo přibližně stejného signálu fosforylovaného NF- κ B. Výraznější signál NF- κ B byl získán pouze u skupiny G v čase 0 (po přihlednutí k signálu z β -aktinu). Při pohledu na obrázek je možné říci, že touto metodou nelze stanovit rozdíly v rozpoznání volného a vázaného ligandu neutrofilem na úrovni prozánětlivé signalizace.



Obr. 19: Aktivace NF- κ B u neutrofilů. I., III. – fosforylované NF- κ B, II., IV. – β -aktin

Skupina A – neaktivované neutrofilů, *Skupina B* – aktivované neutrofilů (30 minut po zahájení primingu), *Skupina C* – aktivované neutrofilů (2 hodiny a 30 minut po zahájení primingu), *Skupina D* – aktivované neutrofilů (4 hodiny po zahájení primingu), *Skupina E* – B16-F10 + PBS + aktivované neutrofilů (4 hodiny po zahájení primingu), čas 0 minut, *Skupina F*

– B16-F10 + volný laminarin + aktivované neutrofilý (4 hodiny po zahájení primingu), čas 0 minut, *Skupina G* – B16-F10 + laminarin-BAM + aktivované neutrofilý (4 hodiny po zahájení primingu), čas 0 minut, *Skupina H* – B16-F10 + PBS + aktivované neutrofilý (4 hodiny po zahájení primingu), čas 60 minut, *Skupina I* – B16-F10 + volný laminarin + aktivované neutrofilý (4 hodiny po zahájení primingu), čas 60 minut, *Skupina J* – B16-F10 + laminarin-BAM + aktivované neutrofilý (4 hodiny po zahájení primingu), čas 60 minut, *Skupina K* – B16-F10 + PBS + aktivované neutrofilý (4 hodiny po zahájení primingu), čas 90 minut, *Skupina L* – B16-F10 + volný laminarin + aktivované neutrofilý (4 hodiny po zahájení primingu), čas 90 minut, *Skupina M* – B16-F10 + laminarin-BAM + aktivované neutrofilý (4 hodiny po zahájení primingu), čas 90 minut

8. DISKUZE

Tato práce sledovala dva hlavní cíle. Jednak to bylo vyzkoušení několika variant *in vivo* léčby, a jednak studium mechanismů účinné nádorové terapie. K dosažení cílů bylo využito mnoho rozličných metod a přístupů, avšak pomyslnou červenou nit práce tvořila jedna myšlenka, a to terapie nádorových onemocnění založená na instalaci agonistů fagocytárních receptorů na povrch nádorových buněk a současné signální stimulaci agonisty TLR receptorů. V praxi byla tato idea přenesena na tři základní fagocytární ligandy (f-MLF, laminarin, manan) a několik vybraných signálních terapeutik (R-837, volné f-MLF, aktivované neutrofilie). Účinnost fagocytárních ligandů na povrchu nádorových buněk v protinádorové terapii byla v našem kolektivu již několikrát potvrzena. Významným zjištěním byl synergický účinek fagocytárních ligandů v kombinaci s LPS, agonistou TLR4 (Janotová a kol., 2014). Že pro dosažení největšího účinku mají být agonisté fagocytárních receptorů membránově kotvené a ligandy signálních receptorů rozpustné, definovali v roce 2004 Underhill a Gantner (Underhill a Gantner, 2004). Kotvení do buněčné membrány bylo umožněno alifatickým řetězcem olejové kyseliny (kotva -BAM) a vzhledem k intratumorální aplikaci, popřípadě inkubaci pouze s buňkami B16-F10 u *in vitro* pokusů, byl cílem kotev povrch nádorových buněk.

Předložená práce obsahuje tři *in vivo* pokusy, které spojuje stejný fagocytární ligand (manan-BAM). V případě prvního pokusu jsme zvolili jako rozpustný ligand signálních receptorů Imiquimod (R-837). V podstatě nebylo překvapením, že sám o sobě neměl výrazný vliv na růst nádoru. Stejně slabého výsledku jsme se dočkali i ve skupině myši léčených manan-BAM. Tyto výsledky kopírovaly výsledky získané z terapií spojující manan-BAM a LPS, ve kterých jednotlivé samotné složky nebyly příliš účinné. Nicméně kombinace LPS a manan-BAM vedla k vysoce účinnému synergickému účinku (Janotová a kol., 2014). K této synergii při námi použité kombinaci R-837 s manan-BAM nedošlo. R-837 je testován jako náhrada LPS z toho důvodu, že LPS není možné používat v léčbě nádorů člověka vzhledem k faktu, že se jedná o endotoxin. Rozdíly mezi těmito látkami patrně nespočívají jen v tom, že LPS je agonista TLR4, zatímco R-837 je agonistou TLR7. Problém spatřujeme ve slabé stimulaci vrozené imunity prostřednictvím R-837/TLR7. Přestože Imiquimod je testován pro jeho protinádorový účinek v klinických testech (Adams a kol., 2014), výsledky našeho výzkumu nebyly přesvědčující a tuto látku jsme se rozhodli více do terapií nezařazovat.

Neutrofilů jsou prvními buňkami, jež se objeví v místě zánětu. Taktéž byly pozorovány jako hlavní infiltrát v nádorech (Schmidt a kol., 2005; Friedlender a kol., 2009). Rychlost a efektivita některých použitých terapií (Janotová a kol., 2014) nás vedla k myšlence, že těmi účinnými bojovníky proti nádoru budou právě neutrofilů. Schopnost neutrofilů zabít nádorové buňky byla již několikrát doložena (Cui a kol., 2003; Ackermann a kol., 1989; Gerrard a kol., 1981). Druhý pokus prováděný na myších byl založený na multipotentním účinku rozpustného f-MLF na neutrofilů. Nejlépe je f-MLF charakterizován jako chemoatraktant (Schiffmann a kol., 1975), avšak je popsán i vliv f-MLF na ostatní funkce neutrofilů, například aktivaci, adhezi, oxidativní vzplanutí, degranulaci, fagocytózu a produkci cytokinů (Prossnitz a Ye, 1997). Pokus měl tradiční koncept. Byl tvořen 4 skupinami. Jedné skupině bylo podáváno intratumorálně PBS (kontrola), další dvě dostávaly buď volné f-MLF nebo manan-BAM a čtvrtá skupina byla léčena kombinací vázaného mananu a volného f-MLF. Ani v tomto případě nebylo dosaženo kýžené synergie, co se týká vlivu na růst nádoru. Byl zaznamenán mírný pozitivní vliv na redukci výskytu metastáz, který nebyl statisticky významný. Pokud se ještě vrátím ke vlivu použité terapie na růst nádorů, průměrné hodnoty objemů nádorů ve skupině odhalily, že ve skupině léčené volným f-MLF byly nádory dokonce nepatrně větší než u kontroly. Dokumentují to naměřené hodnoty objemů nádorů ze 14. dne terapie u skupin B, C a D (průměrně $1500 \pm 900 \text{ mm}^3$) a u skupiny A léčené samotným f-MLF (průměrně $2200 \pm 1100 \text{ mm}^3$). Vysvětlení by mohlo spočívat v bipolárním charakteru neutrofilů N1 (protinádorové) a N2 (pronádorové) (Friedlender a kol., 2009). Toto tvrzení je možné prokázat pokusem založeným na sledování množství uvolněných kyslíkových radikálů. N2 neutrofilů produkují této substance jen velmi málo a toto množství působí genotoxicky, tedy pronádorově. Zatímco N1 neutrofilů dosahují významně vyšší produkce, která působí cytotoxicky (Haqqani a kol., 2000). Dr. Friedlender ve svých pokusech opakovaně nacházel velké množství neutrofilů v nádoru. Celková deplece neutrofilů v organismu způsobila snížení růstu nádoru. Důsledkem neutrofilního úbytku bylo to, že nádor postrádal podporující vliv neutrofilní infiltrace. Takto pronádorově působí subpopulace N2. Avšak Friedlender též prokázal, že neutrofilů, které jsou vysoce stimulované a jsou ve stavu N1, dokáží účinně nádorové buňky zabít. Toho se v našem experimentu nepodařilo dosáhnout, a ani kombinace s ligandem podporujícím fagocytózu nevedla k žádanému protinádorovému efektu. Náš základní předpoklad spočíval především ve schopnosti f-MLF působit jako silný chemoatraktant, a tedy dosáhnout s jeho pomocí obdobné infiltrace, jaká je vyvolávána LPS. Infiltrující neutrofilů, dále stimulované f-MLF, pak měly napadnout nádorové buňky

označené pro fagocytózu. Dá se předpokládat, že působení ligandů TLR má systémový přesah. Účinek aplikovaného f-MLF byl nejspíše jen lokální, a tedy nedostatečný.

Pro třetí *in vivo* pokus byla zvolena intratumorální aplikace aktivovaných neutrofilů. Hodinu před aplikací neutrofilů byl do nádoru injikován manan-BAM. Za tu dobu se zakotvil do membrány nádorových buněk a posléze injikované neutrofilily měly zahájit fagocytózu a zabíjení nádorových buněk po kontaktu s kotveným mananem. Množství aplikovaných neutrofilů (2 milióny v jedné dávce) odráženo zjištěný stav v léčeném nádoru (Kovářová, 2015; Jačková, 2015, v přípravě). Terapie pomocí neutrofilů ukázala relativně dobré výsledky. 14. den terapie bylo dosaženo cca 50 % redukce nádorového růstu ve srovnání s kontrolami (samotný manan-BAM, PBS). Dobře ovšem podotknout, že po podání neutrofilů nebylo dosaženo úplného vyléčení žádné myši. Vliv na výskyt metastáz byl minimální. Domníváme se, že jsme sice injikovali dostatečné množství neutrofilů, ale že jejich aktivace a akce v nádoru nebyla dostatečná. Objasnění by se mohlo opírat o priming, který nelze *in vitro* kompletně simulovat. Důležitou součástí aktivace neutrofilů je pro příklad průnik mezi endoteliálními buňkami při přestupu z cévy do tkáně (Lauterbach a kol., 2008).

Optimalizace terapie probíhá na základě hledání vhodného signálního partnera pro osvědčený fagocytární ligand manan. Prozatímni výsledky ukazují na úspěch Resiquimodu, agonistu TLR8 (Kovářová, 2015, v přípravě), a to samotného nebo v kombinaci s některými grampozitivními (LPS neobsahujícími) bakteriemi. Z experimentů rovněž vyplývá, že i v těchto terapiích bude rozhodující roli hrát neutrofilní infiltrace (Ženka, ústní sdělení). Proto jsem se v druhé části zaměřila na studium jejich působení. Prvním úkolem bylo *in vitro* studium jejich cytotoxického vlivu na nádorové buňky.

V této práci byla pro vyhodnocení cytotoxického účinku neutrofilů použita souprava Delfia® EuTDA Cytotoxicity Kit od Perkin&Elmer. Sada dobře obstála při práci s nádorovými buňkami K-526 a NK buňkami (Blomeberg a kol., 1996). Navíc tento systém nabízel vhodné řešení předchozích problémů mých kolegyň. Jejich metody byly založené na počítání úbytku nádorových buněk a nesetkávaly se často s úspěchem. V případě kitu od Perkin&Elmer s narůstající cytotoxicitou měl růst i fluorescenční signál. Hodnoty požadované výrobcem kitu i zjištěné experimentálně (Blomberg a kol., 1996; Saarinen a kol., 2000) nebyly naměřeny ani při opakování pokusu 6krát v různých modifikacích. Shrnuto, problém spočíval ve velmi nízkém maximálním uvolnění fluorescenčního ligandu z lyzovaných buněk a ve vysokém pozadí. Lepších výsledků nebylo dosaženo ani při prodloužení inkubační doby ze dvou na tři hodiny. Problematické výsledky nezpůsobovalo ani kotvení fagocytární-

ho ligandu. Dalo by se říci, že zde došlo ke kombinaci dvou nepříjemných faktorů, a to nízkého vstupu fluorescenčního ligandu do buněk B16-F10 a jeho vysokého uvolnění z nádorových buněk. Výpovědní hodnota tohoto testu se stala téměř nulovou, a tak přidání neutrofilů k nádorovým buňkám neřeklo nic o jejich schopnosti zabít. V plánu bylo i přidání inhibitorů oxidativního vzplanutí a tvorby NETs. Po přidání inhibitorů by mělo docházet k signifikantnímu snížení zabíjení, a tak úbytku fluorescenčního signálu. Velmi nízký naměřený fluorescenční signál bez inhibitorů prakticky vylučoval jejich zařazení do testu. Dále jsem se rozhodla v metodě nepokračovat a v cytotoxickém testu na jiném principu pak pokračovaly kolegyně Kovářová, Jačková, Fáberová, Kumžáková, Glaserová, Štajnerová a Bumbová, jejichž výsledky jsou uvedeny v bakalářských a diplomových pracích z roku 2015.

Cytotoxické testy byly započaty s neutrofilami získanými výplachem břišní dutiny. Celková výtěžnost všech buněk byla dostačující, ale zjištěná čistota byla příliš malá. Další pokusy byly dělány s neutrofilami z kostní dřeně. Tento typ buněk je neaktivovaný. Výskyt neaktivovaných imunocytů v místě zánětu je nemožný, proto byly neutrofilami z kostní dřeně aktivovány cytokiny GM-CSF a TNF- α a nízkomolekulárním laminarinem. Aktivace neboli priming měl vliv na instalaci předpřipravených fagocytárních receptorů na povrch neutrofilů a jejich kostimulaci (Dewas a kol., 2013; Větvička a kol., 1996).

Významnou kapitolou diplomové práce byly buněčné interakce pozorované v reálném čase v invertovaném mikroskopu a zachycené na sadě fotografií. Fotografie navíc umožnily vytvořit film. Neutrofilami jako buňky přirozené imunity rozpoznávají PAMPs pomocí receptorů. Instalace PAMPs na povrch nádorových buněk umožňuje silnou buněčnou interakci.

Před vlastním pokusem bylo provedeno vyhodnocení vlivu ligandu na samotné nádorové buňky i neutrofilami. Buňky byly inkubovány s odmytým i neodmytým, kotveným i volným ligandem, jeho náhradou a PBS. Tento předpokus poskytl informaci o tom, zda daný agonista fagocytárních receptorů shlukuje buňky či ne, což se ukázalo jako důležitá informace pro pozdější práci. Ligandy manan a laminarin, ať už vázané nebo volné, stejně tak jejich nefunkční náhrada lysin, nezpůsobovaly žádné změny v suspenzi buněk. Odlišně se chovalo f-MLF. Nejkomplexnější vliv mělo f-MLFKK-BAM. Kotvená verze f-MLF shlukovala nádorové buňky i neutrofilami do větších klastrů. Položená otázka zněla, zda jsou klastry zprostředkované receptory? Pro vyřešení otázky, jakým mechanismem je tento vliv uskutečňován, byly pokusy s neutrofilami a nádorovými buňkami doplněny o pokus

s erytrocyty, u nichž lze předpokládat, že FPR receptory nemají. Výskyt FPR receptorů na povrchu neutrofilů je zaručený (Liu a kol., 2012; Fu a kol., 2005). FPR receptory byly prokázány i na melanomových buňkách (Boudhraa a kol., 2014; Chakravarti a kol., 2013). Výhradně vázaná variace ligandu umožnila shluknutí buněk, volné f-MLF nikoliv, a to pouze melanomových buněk a neutrofilů. Erytrocyty agregáty nevytvářely. Lze se tedy silně domnívat, že tvorba buněčných klastrů zapříčiněná f-MLFKK-BAM je dána receptorově. Dále jsme měli myšlenku takovou, že f-MLFKK-BAM a f-MLF se váží na odlišné receptory, neboť shluky obou typů buněk vyvolané f-MLFKK-BAM nebyly rozbity ani přidavkem 0,05 mM f-MLF ani 10 × silnějšího 0,5 mM f-MLF. Ani tyto vysoké hladiny volného f-MLF nebyly schopny kompetice. Je známo, že myší buňky nesou alespoň 7 formylpeptidových receptorů s různou afinitou ke krátkým a dlouhým ligandům, přičemž nejméně 4 jsou přímo na neutrofilech (He a kol., 2013; Dufton a Perretti, 2010). K vlivu f-MLF bylo tedy zjištěno, že f-MLFKK-BAM a volný f-MLF jsou rozpoznávány různými receptory.

Mimo tvorby buněčných shluků byla v kultuře neutrofilů pozorována ještě změna tvaru. Změny v morfologii neutrofilů vyvolávalo jak vázané, tak volné f-MLF. Neutrofilové pod vlivem chemoatraktantu, jako je například dobře prostudované f-MLF, podléhají tzv. polarizaci, která se mimo jiné projevuje změnou tvaru z kulatého na podélný a zploštělý. Tato morfologická změna jim umožňuje lepší adhezenci k podkladu. Fyziologicky tímto podkladem bývá stěna cévy nebo tkáň zánětu. Iniciační polarizace trvá jen pár sekund a plně se rozvine za méně než 10 minut. Počátek polarizace je standardně popisován protažením tvaru buňky se směru chemotaktického gradientu nahromaděním F-aktinu v přední části buňky a pokračuje kontrakcí myozinových vláken v zadní části buňky. Prodlužování aktiniových vláken a kontrakce těch myozinových buňce umožňuje pohyb (Ku a kol., 2012; Zigmond a kol., 1981). Výsledky týkající se vlivu f-MLF na tvar neutrofilů potvrdila i americká práce publikovaná v roce 1998 (Adachi a kol., 1998). Stejný proces a především tvar neutrofilů popisuje ve svém článku i tým vědců z Austrálie. Ten otestoval reakci neutrofilů na silný chemoatraktant NAP-2 (neutrophil activating protein), obsahující CXC chemokinovou doménu (Ghasemzadeh a kol., 2013). Ke změně tvaru neutrofilů docházelo i při prodloužení doby primingu neutrofilů na více než 35 minut. Jak dokládá článek Hayashiho a kolektivu, za změnu tvaru může použití cytokinu GM-CSF, přičemž koncentrace a doba inkubace jsou rozhodující (Hayashi a kol., 2003). Standardně používaná doba inkubace 20 minut nevyvolávala změnu tvaru neutrofilů. Nutno poznamenat, že zmíněné morfologické změny nemají nežádoucí vliv na funkci neutrofilů, což bylo testováno v citovaném článku týmu doktora Fumikaty Hayashiho (Hayashi a kol., 2003).

V oddílu buněčných interakcí bylo pokračováno pokusy s nádorovými buňkami a neutrofilů. Celkově byl testován vliv vázaného ligandu, volné formy a PBS jako kontroly. Výsledky nesporně potvrdily efektivitu terapie založené na kotvení fagocytárních ligandů do membrány nádorových buněk. Ligandy f-MLF, laminarin a manan v *in vivo* terapiích výrazně lépe obstály, pokud byly kotveny do membrány buněk oproti volné verzi ligandu (Janotová a kol., 2014). A stejně tak i při pozorováních v mikroskopu bylo shledáno průměrně 50 % interakcí u kotveného ligandu, zatímco u volného ligandu jen 14 % a kontrola (bez ligandů) činila 5 %. Jinými slovy, neutrofilů projevují desetkrát menší zájem o buňky bez ligandu než s ním. Pozoruhodný objev byl učiněn na poli frustrované fagocytózy. Tento jev je v literatuře popsán v souvislosti s fagocytózou velkých substancí různých tvarů. Jestliže fagocytovaný objekt přesáhne jistou velikost, nezbyvá neutrofilnímu granulocyту nic jiného, než zabít cíl z venku (Wright a kol., 2010; Herant a kol., 2006). Ve vzorcích, kde měly nádorové buňky na svém povrchu instalovány fagocytární ligandy, dosahovala frustrovaná fagocytóza 50 % všech kontaktů. Volný ligand stimuloval neutrofilů k fagocytóze jen velmi málo. Míra frustrované fagocytózy ve vzorcích s volným ligandem průměrně činila jen necelých 7 % z celkového počtu kontaktů. V kontrolní skupině s PBS nebyl téměř tento jev pozorován. Neutrofilů jsou sice asi dvakrát menší než buňky melanomu B16-F10, přesto jsou schopné nádorové buňky s ukotvenými ligandy zabít. To jsem měla možnost sledovat v reálném čase. Interakce buněk vedoucí ke smrti nádorové buňky s laminarin-BAM je na filmována a video je součástí diplomové práce. Tvrdím, že frustrovaná fagocytóza měla v tomto případě významnou roli.

Očekávali jsme, že rozdíly v rozpoznávání volného a vázaného ligandu a v reakci na tyto varianty ligandu se projeví na fosforylaci transkripčního faktoru NF- κ B. Aktivace tohoto faktoru vede k prozánětlivé signalizaci (Kingeter a Lin, 2012). Část pokusu se samotnými neutrofilů potvrdila, že priming vede k fosforylaci NF- κ B a trvá nejméně 4 hodiny. Ze složek použitých pro aktivaci neutrofilů patrně TNF- α nejsilněji aktivoval NF- κ B (Vancurova a kol., 2001), ovšem lze uvažovat i o příspěvku GM-CSF (Ebner a kol., 2003). Použití cytokinů pro aktivaci dávalo významný signál, který navíc trval několik hodin. Z části zahrnující koinkubaci neutrofilů s nádorovými buňkami, ať už s ligandem nebo bez, nevzešly očekávané výsledky, přestože byl pokus opakován dvakrát. Ve vzorcích, do kterých bylo přidáno PBS nebo volný laminarin, nebyl přepokládán výrazný signál oproti vzorkům s laminarin-BAM. Takový vzor se neobjevil. Signál od cytokinů byl ze všech signálů nejsilnější, zatímco přírůstek signálu po rozpoznání ligandu byl velmi malý. Pokus byl v podobném designu proveden s makrofágy PMJ2R (bez primingu cytokiny), kde se výrazný signál ukázal ve

vzorcích s kotveným ligandem, ale volný ligand nevyvolával výraznou aktivaci NF- κ B (Janotová a kol., 2014). Zásadní rozdíl tkví právě v imunitních buňkách. Co se týká produkce cytokinů a obecněji rozvoje prozánětlivé odpovědi, není makrofág jako neutrofil. Makrofágy produkují prozánětlivé elementy v mocném množství. Naopak neutrofil ve srovnání s makrofágem takových úrovní produkce nedosahuje. Tato situace řešena tím, že do místa zánětu namigruje několikanásobně větší počet neutrofilů než makrofágů. Pak jsou neutrofilové schopné se v celku vyrovnat makrofágům z hlediska prozánětlivé reakce (Wright a kol., 2010). Touto metodou jsme nepotvrdili ani nevyvrátili hypotézu, že účinnost terapie založené na neutrofilech závisí na kotvení ligandu do membrány nádorových buněk.

Započatá práce podle teze „kombinace kotvených fagocytárních ligandů a volných rozpustných ligandů“ by měla pokračovat testováním dalších signálních společníků pro osvědčený manan-BAM. Tyto signální ligandy by měly dosahovat stejné účinnosti jako široce testované LPS, avšak další jejich charakteristikou musí být bezpečnost pro člověka. Dále navrhuji prostudovat mechanismy účinné terapie založené na kombinování Resiquimodu, gram pozitivních bakterií a manan-BAM. Tato kombinace přinesla v poslední době výborné výsledky při použití *in vivo* (Jačková, 2015, v přípravě).

9. ZÁVĚR

V oblasti hledání vhodné náhrady LPS bylo zjištěno následující:

- Imiquimod (R-837) ani 5 mM volné f-MLF nejsou vhodnými signálními partnery pro fagocytární ligand manan-BAM v *in vivo* terapii.
- Intratumorální aplikace aktivovaných neutrofilů v kombinaci s manan-BAM snižuje nádorový růst, avšak nevede k úplnému vyléčení.

V oblasti studia mechanismů účinné protinádorové terapie bylo zjištěno následující:

- Delfia® EuTDA Cytotoxicity Kit nemůže být doporučen pro stanovení cytotoxicity při použití nádorových buněk B16-F10.
- Fagocytární ligand f-MLFKK-BAM shlukuje nádorové buňky i neutrofilů do klastrů. Toto shlukování je zprostředkováno receptorově. Volné f-MLF a f-MLFKK-BAM se vážou na odlišné receptory.
- Fagocytární ligandy f-MLFKK-BAM, laminarin-BAM a manan-BAM se výrazně podílí na tvorbě buněčných interakcí mezi nádorovými buňkami a neutrofilů. Jev frustrované fagocytózy byl pozorován převážně ve vzorcích s kotveným fagocytárním ligandem.
- Na úrovni aktivace transkripčního faktoru NF- κ B se nepodařilo zaznamenat rozdíl v rozpoznávání volného a vázaného ligandu u aktivovaných neutrofilů. Priming cytokiny způsobuje významnou fosforylaci NF- κ B.

10. SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

ACKERMANN, M. F., LAMM, K. R., WIEGAND, G. W., LUSTER, M. I., 1989: Antitumor activity of murine neutrophils demonstrated by cytometric analysis. *Cancer Research*. 49, 528 – 532.

ADAMS, S., NOVIK, R., ORATZ, D., AXELROD, J., SPEYER, A., TIERSTEN, J. D., GOLDBERG, N., BHARDWAJ, D., UNUTMAZ, S., DEMARIA, S., FORMENTI, S., 2014: Clinical Trial Evidence of the Antitumor Activity of Topical Imiquimod for Breast Cancer Skin Metastases. *Journal of Clinical Oncology*. 32, 3204 – 3205.

ADACHI, Y., KINDZELSKII, A. D., COOKINGHAM, G., SHAYA, S., MOORE, E. C., TODD, R. F., PETTY, H. R., 1998: Aberrant Neutrophil Trafficking and Metabolic Oscillations in Severe Pyoderma Gangrenosum. *Journal of Investigative Dermatology*. 111, 259 – 268.

ADEREM, A., UNDERHILL, D. M., 1999: Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annual Review of Immunology*. 17, 593 – 623.

BLOMBERG, K., HAUTALA, R., LÖVGREN, J., MUKKALA, V. M., LINDQVIST, C., ÅKERMAN, K., 1996: Time-resolved fluorometric assay for natural killer activity using target cells labelled with a fluorescence enhancing ligand. *Journal of Immunologica Methods*. 193, 199 – 206.

BOUDHRAA, Z., RONDEPIERRE, F., OUCHCHANE, L., KINTOSSOU, R., TRZECIAKIEWICZ, A., FRANCK, F., KANITAKIS, J., LABELLE, B., JOUBERT-ZAKEYH, J., BOUCHON, G., PERROT, B. F., MANSARD, S., PAPON, J., DECHELOTTE, P., CHEZAL, P. J., MIOT-NOIRAUT, E., BONNET, A., D'INCAN, B., DEGOUL, F., 2014: Annexin A1 in primary tumors promotes melanoma dissemination. *Clinical & Experimental Metastasis*. 31, 749 – 760.

BRANZK, N., LUBOJEMSKA, A., HARDISON, S. E., WANG, Q., GUTIERREZ, M. G., BROWN, G. D., PAPAYANNOPOULOS, V., 2014: Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens: Is immunity the second function of chromatin? *Nature Immunology*. 15, 1017 – 1025.

BRINKMANN, V., RICHARD, U., GOOSMANN, C., FAULER, B., UHLEMANN, Y., 2004: Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 303, 1532 – 1535.

BRINKMANN, V., ZYCHLINSKY, A., 2012: Neutrophil extracellular traps: Is immunity the second function of chromatin?. *The Journal of Cell Biology*. 198, 773 – 783.

BELLORA, F., CASTRICONI, R., DONDERO, A., CARREGA, P., MANTOVANI, A., FERLAZZO, G., MORETTA, A., BOTTINO, C., 2014: Human NK cells and NK receptors. *Immunology Letters*. 161, 168 – 173.

BEUTLER, B., 2004. Innate immunity: an overview. *Molecular Immunology*. 40, 845-859.

CANNON, A. C., LOBERIZA, F. R., 2014: Review of Antibody-Based Immunotherapy in the Treatment of Non-Hodgkin Lymphoma and Patterns of Use. *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia*. 15, 129 – 128.

CUI, Z., WILLINGHAM, M. C., HICKS, A. M., ALEXANDER-MILLER, M. A., HOWARD, T. D., HAWKINS, G. A., MILLER, M. S., WEIR, H. M., DU, W., DELONG, C., 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, 6682 – 6687.

DALLEGRI, F., OTTONELLO, L., BALLESTRERO, A., et al., 1991: Tumor cell lysis by activated human neutrophils: analysis of neutrophil-delivered oxidative attack and role of leukocyte function-associated antigen 1. *Inflammation*. 15, 15 – 30.

DARRASSE-JÈZE, G., BERGOT, A. S., DURGEAU, A., BILLIARD, F., SALOMON, B. L., COHEN, J. L., KLATZMANN, D., 2009: Tumor emergence is sensed by self-specific CD44^{hi} memory Tregs that create a dominant tolerogenic environment for tumors in mice. *The Journal of Clinical Investigation*. 119, 2648 – 2662.

DAVIDSON, A., 2011: Thioglycollate Induced Peritonitis. Bio-protocol, Bio101: e84. <http://www.bio-protocol.org/e84>

DE GRUIJL, F. R., VAN KRANEN, H. J., MULLENDERS, L. H. F., 2001: UV-induced DNA damage, repair, mutations and oncogenic pathways in skin cancer. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 63, 19 – 27.

DEWAS, C., DANG, P. M., GOUGEROT-POCIDALO, M. A., EL-BENNA, J., 2003: TNF- α Induces Phosphorylation of p47^{phox} in Human Neutrophils: Partial Phosphorylation of p47^{phox} Is a Common Event of Priming of Human Neutrophils by TNF- α and Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor. *The Journal of Immunology*. 171, 4392 – 4398.

DI CARLO, E., BASTHOLT, L., GEERTSEN, P., CHRISTENSEN, I. J., LARSEN, S., GEHL, J., VON DER MAASE, H. ALBELDA, S. M., 2005: The intriguing role of polymorphonuclear neutrophils in antitumor reactions: a prognostic model. *Blood*. 97, 339 – 345.

DUFTON, N., PERRETTI, M., 2010: Therapeutic anti-inflammatory potential of formylpeptide receptor agonists. *Pharmacology*. 127, 175 – 188.

DUNN, G. P., OLD, L. J., SCHREIBER, R. D., LORD, E., ROBERT, J., FERLAZZO, G., MORETTA, A., BOTTINO, C., 2004: The Immunobiology of Cancer Immunosurveillance and Immunoediting. *Immunity*. 21, 137 – 148.

EBNER, K., BANDION, A., BINDER, B. R., MARIN, R. de, SCHMIDT, J. A., 2003: GM-CSF activates NF- κ B via direct interaction of the GMCSF receptor with I- κ B β kinase. *Blood*. 102, 192 – 199.

FLEHINGER, B. J., KIMMEL, M., MELAMED, M. R., 1992: The effect of surgical treatment on survival from early lung cancer. Implications for screening. *CHEST Journal*. 101, 1013 – 1018.

FRIDLENDER, Z. G., SUN, J., KIM, S., KAPOOR, V., CHENG, G., LING, L., WORTHEN, G. S., ALBELDA, S. V., 2009: Polarization of Tumor-Associated Neutrophil Phenotype by TGF- β : “N1” versus “N2” TAN. *Cancer Cell*. 16, 183 – 194.

FU, H., KARLSSON, J., BYLUND, J., MOVITZ, C., KARLSSON, A., DAHLGREN, C., 2005: Ligand recognition and activation of formyl peptide receptors in neutrophils. *Journal of Leukocyte Biology*. 79, 247 – 256.

GAZI, U., MARTINEZ-POMARES, L., 2009: Influence of the mannose receptor in host immune responses. *Immunobiology*. 214, 554 – 561.

GERRARD, T. L., COHEN, D. J., KAPLAN, A. M., 1981: Human neutrophil-mediated cytotoxicity to tumor cells. *Journal of National Cancer Institute*. 66, 483 – 488.

CHAKRAVARTI, N., PEDDAREDDIGARI, V. G. R., WARNEKE, C. L., JOHNSON, M. M., OVERWIJK, W. W., HWU, P., PRIETO, V. G., 2013: Differential Expression of the G-Protein-Coupled Formyl Peptide Receptor in Melanoma Associates With Aggressive Phenotype. *The American Journal of Dermatopathology* 35, 184 – 190.

GHASEMZADEH, M., KAPLAN, I., ALWIS, S. M., SCHOENWAEELDER, K. J., ASHWORTH, E., WESTEIN, E., HOSSEINI, H. H., SALEM, R. SLATTERY, S. R., MCCOLL, M. J., HICKEY, Z. M., RUGGERI, Y., YUAN, Y., JACKSON, S. P., 2013: The CXCR1/2 ligand NAP-2 promotes directed intravascular leukocyte migration through platelet thrombi. *Blood*. 121, 4555 – 4566.

GHIRAN, I., BARBASHOV, S. F., KLINKSTEIN, L. B., TAS, S. W., JENSENIUS J. C., NICHOLSON-WELLER, A., 2000: Complement Receptor 1/Cd35 Is a Receptor for Mannan-Binding Lectin. *Journal of Experimental Medicine*. 192, 1797 – 1808.

HATINA, J., 2005: Tumour immunology – present status and lessons from the 1st international conference on basic and clinical immunogenomics. *Klinická onkologie*, 18, 119 – 125.

HAQQANI, A. S., SANDHU, J. K., BIRNBOIM, H. C., 2000: Expression of Interleukin-8 Promotes Neutrophil Infiltration and Genetic Instability in Mutatect Tumors. *Neoplasia*. 2, 561 – 568.

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*. 21, 668 – 675.

HAYASHI, F., MEANS, T. K., LUSTER, A. D., 2003: Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood*. 102, 2660 – 2669.

HAYNES-GILMORE, N., BANACH, M., EDHOLM, E. S., LORD, E., ROBERT, J., FERLAZZO, G., MORETTA, A., BOTTINO, C. 2014: a critical role of non-classical MHC in tumor immune evasion in the amphibian *Xenopus* model. *Carcinogenesis*. 35, 1807 – 1813.

HE, H.Q., LIAO, D., WANG, Z.G., WANG, Z. L., ZHOU, H.C., WANG, M.W., YE, R.D., 2013: Functional Characterization of Three Mouse Formyl Peptide Receptors. *Molecular Pharmacology*. 83, 389 – 398.

HERANT, M., HEINRICH, V., DEMO, M., 2006: Mechanics of neutrophil phagocytosis: experiments and quantitative models. *Journal of Cell Science*. 119, 279 – 289.

HICKS, A. M., RIEDLINGER, G., WILLINGHAM, M. C., ALEXANDER-MILLER, M.A., VON KAP-HERR, C., PETTENATI, M. J., SANDERS, A. M., WEIR, M. H., DU, W., KIM, J., SIMPSON, A. J. G., OLD, L. J., CUI, Z., 2006: Transferable anticancer innate immunity in spontaneous regression/complete resistance mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 103, 7753 – 7758.

CHAN, T., WILTROUT, R. H., WEISS, J. M., 2011: Immunotherapeutic modulation of the suppressive liver and tumor microenvironments. *International Immunopharmacology*. 11, 879 – 889.

CHAO, M. P., JAISWAL, S., WEISSMAN-TSUKAMOTO, R., ALIZADEH, A. A., GENTLES, A. J., VOLKMER, J., WEISKOPF, K., WILLINGHAM, S. B., RAVEH, T., PARK, C. Y., MAJETI, R., WEISSMAN, I. L., 2010: Calreticulin Is the Dominant Pro-Phagocytic Signal on Multiple Human Cancers and Is Counterbalanced by CD47. *Science Translational Medicine*. 2, 91 – 96.

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, online.

JONES, G. H., BALLOU, C.E., 1969 : Studies on the Structure of Yeast Mannan. *The Journal of Biological Chemistry*. 244, 1043 – 1051.

JUBE, S., RIVERA, Z. S., BIANCHI, M. E., POWERS, A., WANG, E., PAGANO, I., PASS, H. I., GAUDINO, G., CARBONE M., YANG, H., 2012: Cancer Cell Secretion of the DAMP Protein HMGB1 Supports Progression in Malignant Mesothelioma. *Cancer Research*, 72, 3290 – 3301.

KATO, K., ITOH, C., YASUKOUCHI, T., NAGAMUNE, T., 2004: Rapid protein anchoring into the membranes of mammalian cells using oleyl chain and poly(etyleneglykol) derivatives. *Biotechnology Progress*. 20, 897 – 904.

KAZURA, J. W., DE BRITO, P., RABBEGE, J., AIKAWA, M., 1985: Role of granulocyte oxygen products in damage of *Schistosoma mansoni* eggs in vitro. *Journal of Clinical Investigation*. 75, 1297 – 1307.

KESSELRING, R., THIEL, A., PRIES, R., FICHTNER-FEIGL, S., BRUNNER, S., SEIDEL, P., BRUCHHAGE, K. L., WOLLENBERG, B., 2014: The complement receptors CD46, CD55 and CD59 are regulated by the tumour microenvironment of head and neck

cancer to facilitate escape of complement attack. *European Journal of Cancer*. 50, 2152 – 2161.

KIMURA, Y. K., CHIHARA, C., HONJOH, K., TAKEUCHI, S., YAMAUCHI, H., YOSHIKI, S., FUJIEDA, SADA, K., 2014: Dectin-1-mediated Signaling Leads to Characteristic Gene Expressions and Cytokine Secretion via Spleen Tyrosine Kinase (Syk) in Rat Mast Cells. *Journal of Biological Chemistry*. 289, 31565 – 31575.

KINGETER, L. M., LIN, X., 2012: C-type lectin receptor-induced NF- κ B activation in innate immune and inflammatory responses. *Cellular and Molecular Immunology*. 9, 105 – 112.

KIM, R., EMI, M., TANABE, K., 2007: Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology*. 121, 1 – 14.

KU, C. J., WANG, Y., WEINER, O., ALTSCHULER, S. J., WU, L. F., 2012: Evolving cross-talk in the neutrophil polarity network. *Cell*. 149, 1073 – 1083.

LABROUSSE, A., MEUNIER, E., REKORD, J., LABERNADIE, A., BEDER, A., VIEU, C., SAFTA, T., MARIDONNEAU-PARINI, I., 2011: Frustrated phagocytosis on micro-patterned immune complexes to characterize lysosome movements in live macrophages. *Frontiers in Immunology*. 2, 51.

LAUTERBACH, M., O'DONNELL, P., ASANO, K., MAYADAS, T. N., 2008: Role of TNF priming and adhesion molecules in neutrophil recruitment to intravascular immune complexes. *Journal of Leukocyte Biology*. 83, 1423 – 1431.

LEE, J. Y., KIM, Y. J., KIM, H. J., KIM, Y. S., PARK, W. 2012: Immunostimulatory Effect of Laminarin on RAW 264.7 Mouse Macrophages. *Molecules*. 17, 5404 – 5411.

LEE, L. F., HELLENDALL, R. P., WANG, Y., HASKILL, J. S., MUKAIDA, N., MATSUSHIMA, K., ET AL., 2000: IL-8 reduced tumorigenicity of human ovarian cancer in vivo due to neutrophil infiltration. *Journal of Immunology*. 164, 2769 – 2775.

LI, J., PIAO, Y. F., JIANG, Z., CHEN, L., SUN, H. B., 2009: Silencing of signal transducer and activator of transcription 3 expression by RNA interference suppresses growth of human hepatocellular carcinoma in tumor-bearing nude mice. *World Journal of Gastroenterology*. 15, 2602 – 2608.

LIU, M., CHEN, K., YOSHIMURA, T., LIU, Y., GONG, W., WANG, A., GAO, J. L., MURPHY, P. M., WANG, J. M., 2012: Formylpeptide receptors are critical for rapid neutrophil mobilization in host defense against *Listeria monocytogenes*. *Scientific Reports*. 2, 11 – 15.

MCGARY, C. T., MIELE, M. E., WELCH, D. R., 1995: Highly metastatic 13762NF rat mammary adenocarcinoma cell clones stimulate bone marrow by secretion of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor/interleukin-3 activity. *The American Journal of Pathology*. 147, 1668 – 1681.

MEDEMA, J. P., DE JONG, J., PELTENBURG, L. T. C., VERDEGAAL, E. M. E., GORTER, A., BRES, S. A., FRANKEN, K. L. M. C., HAHNE, M., ALBAR, J. P., MELIEF, C. J. M., OFFRINGA, R., 2001: Blockade of the granzyme B/perforin pathway through overexpression of the serine protease inhibitor PI-9/SPI-6 constitutes a mechanism for immune escape by tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 98, 11515 – 11520.

MEDZHITOV, R., JANEWAY, C. A., 1997: Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Current Opinion in Immunology*. 9, 4 – 9.

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.

O'SULLIVAN, T., SADDAWI-KONEFKA, R., VERMI, W., KOEBEL, C. M., ARTHUR, M., WHITE, J. M., UPPALURI, R., ANDREWS, D. M., NGIOW, S. F., TENG, M. W. L., SMYTH, M. J., SCHREIBER R. D., BUI, J. D., 2012: Cancer immunoediting by the innate immune system in the absence of adaptive immunity. *Journal of Experimental Medicine*. 209, 1869 – 1882.

OVERWIJK, W.W., RESTIFO, N.P., 2001: B16 as a Mouse Model for Human Melanoma. *Current Protocols in Immunology*. 39, 1 – 29.

PROSSNITZ, E. R., YE, R. D., 1997: The N-formyl peptide receptor: a model for the study of chemoattractant receptor structure and function. *Pharmacology & Therapeutics*. 74, 73 – 102.

ROGERS, N. C., SLACK, E. C., EDWARDS, A. D., NOLTE, M. A., SCHULZ, O., SCHWEIGHOFFER, E., WILLIAMS, D. L., GORDON, S., TYBULEWICZ, V. L., BROWN, G. D., SOUSA, C. R., 2005: Syk-Dependent Cytokine Induction by Dectin-1 Reveals a Novel Pattern Recognition Pathway for C Type Lectins. *Immunity*. 22, 507 – 517.

SAARINEN, K., KIVISTÖ, K., BLOMBERG, K., PUNNONEN, K., LEINO, L., 2000: Time-resolved fluorometric assay for leukocyte adhesion using a fluorescence enhancing ligand. *Journal of Immunological Methods*. 236, 19-26.

SATO, Y., GOTO, Y., NARITA, N., HOON, D. S. B., WANG, E., PAGANO, I., PASS, H. I., GAUDINO, G., CARBONE, M., YANG, H., 2009: Cancer Cells Expressing Toll-like Receptors and the Tumor Microenvironment. *Cancer Microenvironment*. 2, 205 – 214.

SCOTT, A. M., WOLCHOK, OLD, J., 2012: Antibody therapy of cancer. *Nature Reviews Cancer*. 12, 278 – 287.

SCHIFFMANN, E., CORCORAN, B. A., WAHL, S., 1975: N-Formylmethionyl Peptides as Chemoattractants for Leucocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 72, 1059 – 1062.

SCHMIDT, H., BASTHOLT, L., GEERTSEN, P., CHRISTENSEN, I. J., LARSEN, S., GEHL, J., VON DER MAASE, H., ALBELDA, S. M., 2005: Elevated neutrophil and

monocyte counts in peripheral blood are associated with poor survival in patients with metastatic melanoma: a prognostic model. *British Journal of Cancer*. 93, 273 – 278.

SIEGEL, R., NAISHADHAM, D., JEMAL, A., 2013: Cancer statistics. *CA: a Cancer Journal for Clinicians*, 63, 11 – 30.

SMOLLER, B. R., 2006: Histologic criteria for diagnosing primary cutaneous malignant melanoma. *Modern Pathology*. 19, 34 – 40.

STASSEN, M., VALEVA, A., WALEV, I., SCHMIDT, E., 2006: Activation of mast cells by streptolysin O and lipopolysaccharide. *Methods of Molecular Biology*. 315, 393 – 403.

TAKAHASHI, K., EZEKOWITZ, R. A. B., 2005: The Role of the Mannose-Binding Lectin in Innate Immunity. *Clinical Infectious Diseases*. 41, 440 – 444.

TANG, D., KANG, R., COYNE, C. B., ZEH, H. J., LOTZE, M. T., 2012: PAMPs and DAMPs: signal 0s that spur autophagy and immunity. *Immunological Reviews*. 249, 158 – 175.

UNDERHILL, D.M., GANTNER, B., 2004: Integration of Toll-like receptor and phagocytic signaling for tailored immunity. *Microbes and Infection*. 6, 1368 – 1373.

UNDERHILL, D. M., 2005: Dectin-1 activates Syk tyrosine kinase in a dynamic subset of macrophages for reactive oxygen production. *Blood*. 106, 2543 – 2550.

VÁCOVÁ, N., 2013. Studium možnosti použití formylmethioninových peptidů v protinádorové terapii. České Budějovice. Bakalářská práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. Vedoucí práce Jan Ženka.

VANCUROVA, I., MISKOLCI, V., DAVIDSON, D., 2001: NF- κ B Activation in Tumor Necrosis Factor α -stimulated Neutrophils Is Mediated by Protein Kinase C delta. Correlation to nuclear I- κ B α . *Journal of Biological Chemistry*. 276, 19746 – 19752.

VETVICKA, V., THORNTON, B. P., & ROSS, G. D. (1996). Soluble beta-glucan polysaccharide binding to the lectin site of neutrophil or natural killer cell complement receptor type 3 (CD11b/CD18) generates a primed state of the receptor capable of mediating cytotoxicity of iC3b-opsonized target cells. *Journal of Clinical Investigation*. 98, 50 – 61.

WILLINGHAM, S. B., VOLKMER, J. P., GENTLES, A. J., SAHOO, D., DALERBA, P., MITRA, S. S., WANG, J., CONTRERAS-TRUJILLO, H., MARTIN, R., COHEN, J. D., LOVELACE, P., SCHEEREN, F. A., CHAO, M. P., WEISKOPF, K., TANG, C., IWEISSMAN, I. L. 2012: The CD47-signal regulatory protein alpha (SIRP- α) interaction is a therapeutic target for human solid tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 109, 6662 – 6667.

WOODFIN, A., VOISIN, M. B., IMHOF, B. A., DEJANA, E., ENGELHARDT, B., NOURSHARGH, S., 2009: Endothelial cell activation leads to neutrophil transmigration as supported by the sequential roles of ICAM-2, JAM-A, and PECAM-1. *Blood*. 113, 6246 – 6257.

WRIGHT, H. L., MOOTS, R. J., BUCKNALL, R. C., EDWARDS, S. W., 2010: Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. *Rheumatology*. 49, 1618 – 1631.

ZIGMOND, S. H., LEVITSKY, H. I., KREEL, B. J., 1981: Cell polarity: an examination of its behavioral expression and its consequences for polymorphonuclear leukocyte chemotaxis. *Journal of Cell Biology*. 89, 585 – 592.