

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

**Mechanismy imunitní odpovědi při léčbě rakoviny
kotvením ligandů fagocytárních receptorů na
povrch nádorových buněk**

Diplomová práce

Bc. Marie Auerová

Školitel: RNDr. Jan Ženka, CSc.

České Budějovice 2014

Auerová, M., 2014: Mechanismy imunitní odpovědi při léčbě rakoviny kotvením ligandů fagocytárních receptorů na povrch nádorových buněk. [Mechanisms of the immune response during the cancer treatment with ligands of phagocytic receptors anchored to the surface of malignant cells. Mgr. Thesis, in Czech] - p. , Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

The aim of this thesis was to obtain some insights into mechanisms by which the immune system affects melanoma cells after anchoring agonists of phagocytic receptors (laminarin and f-MLF) to their surface. To verify the hypothesis that innate immune system plays a critical role, *in vivo* experiments were performed on SCID mice. To elucidate the importance of CR3, CD11b-deficient mice were used. In *in vitro* experiments production of inflammatory cytokines in tumor tissue was examined as well as the release of myeloperoxidase from neutrophil granules after incubation with malignant cells.

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

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

V Českých Budějovicích, 22. 11. 2014

.....

Bc. Marie Auerová

Poděkování:

Mé poděkování patří v první řadě školiteli RNDr. Janu Ženkovi, CSc. za profesionální a odborné vedení, jeho lidský a přátelský přístup, cenné rady, otevřenost vůči nápadům k směřování diplomové práce, ochotu kdykoli a s čímkoli pomoci a jeho trpělivost. Rovněž děkuji kolegyním za hladkou týmovou spolupráci a vytvoření příjemného pracovního kolektivu. Velký dík směřuje pracovníkům Oddělení imunologie parazitů Parazitologického ústavu AV ČR v Českých Budějovicích za jejich toleranci a poskytnutí rad, prostředků i samotného pracovního prostředí; další dík patří Mgr. Kotkové za pomoc s myšmi. Na tomto místě bych rovněž ráda poděkovala své rodině i partnerovi za veškerou a nemalou podporu, které se mi od nich během celé doby studia dostávalo.

Obsah

1. Úvod	1
1.1. Historie rakoviny a její léčby.....	2
1.2. Klasifikace nádorů.....	4
1.2.1. Maligní melanom.....	5
1.2.1.1. Myší melanom B16-F10.....	6
1.2.2. Sarkom.....	6
1.2.2.1. Myší sarkom S-180.....	7
1.3. Imunitní systém a imun-surveillance maligních onemocnění.....	7
1.3.1. Získaná imunita versus rakovina.....	8
1.3.2. Vrozená imunita.....	9
1.3.2.1. Buněčné složky.....	9
1.3.2.2. Humorální složky.....	11
1.3.3. Způsoby úniku rakovinných buněk imunitní odpovědi.....	12
1.3.4. Zánět.....	14
1.3.4.1. Cytokiny ovlivňující vznik a rozvoj zánětu.....	14
1.3.5. Rozpoznávací mechanismy vrozené imunity.....	18
1.3.5.1. Toll-like receptory (TLRs).....	19
1.3.5.1.1. LPS a TLR4.....	21
1.3.5.2. Lektinové receptory typu C (CLR).....	22
1.3.5.2.1. Beta glukany, laminarin a dektin-1.....	23
1.3.5.3. Formyl peptidové receptory (FPR) a formyl-methionin-leucin-fenylalanin (f-MLF).....	25
1.3.5.4. Komplementový receptor typu 3.....	26
1.3.6. Mechanismy eliminace patogenů makro a mikrořágy.....	27
1.3.6.1. Fagocytóza a buněčné zabíjení.....	27
1.3.6.2. NETs.....	29
1.3.7. Imunodeficientní myši.....	29
1.3.7.1. SCID myši.....	30
1.3.7.2. Mac-1 (CD11b) ^{-/-} myši.....	30
1.4. Terapie melanomu pomocí fagocytárních ligandů kotvených na povrchu buněk.....	30
1.4.1. Laminarin – BAM.....	31
1.4.2. f-MLF – DOPE.....	31

2. Cíle práce	32
3. Materiál a metody	33
3.1. Chemikálie	33
3.2. Laboratorní zvířata	33
3.3. Buněčné linie	34
3.4. Příprava buněčných linií pro použití <i>in vivo</i>	34
3.5. Transplantace nádorových buněk	34
3.6. Izolace neutrofilů	34
3.7. Sonikace	35
3.8. Měření a výpočet velikosti nádorů	35
3.9. Průměrná redukce nádorového růstu (%)	35
3.10. Počítání plicních metastáz	36
3.11. Statistické vyhodnocení dat	36
3.12. Příprava terapeutických látek	36
3.12.1. Příprava f-MLFG ₆ K – DOPE (+ LPS)	36
3.12.2. Příprava laminarin – BAM + LPS	36
3.13. Pokusy	37
3.13.1. Stanovení koncentrace cytokinů v nádorové tkáni v průběhu léčby laminarin-BAM, LPS a jejich směsí	37
3.13.2. Studium vlivu kotvení f-MLF a synergie s LPS na redukci růstu nádoru u SCID myši	37
3.13.3. Studium léčebného účinku směsi lamirin-BAM+LPS aplikované pulzně na redukci nádorového růstu u SCID myši	38
3.13.4. Studium léčebného účinku směsi laminarin-BAM+LPS aplikované obden na redukci nádorového růstu u SCID myši	38
3.13.5. Studium významu CR3 v redukci nádorového růstu u Mac-1 ^{-/-} myši léčených směsí laminarin-BAM+LPS aplikované každý druhý den	38
3.13.6. Ověření účinnosti terapie na sarkomu S-180 u BALB/c myši	39
3.13.7. Stanovení míry degranulace neutrofilů při interakci s melanomovými buňkami a fagocytárním ligandem pomocí MPO – zavedení a optimalizace metody	39
3.13.7.1. Příprava vzorků pro stanovení aktivity uvolněné MPO po inkubaci neutrofilů s nádorovými buňkami a laminarinem	39
3.13.7.2. Příprava vzorků pro stanovení aktivity MPO uvolněné do mezibuněčného prostoru nádorové tkáně po aplikaci kotveného laminarinu, f-MLF, LPS či jejich směsí .	40
3.13.7.3. Stanovení aktivity MPO	40

4. Výsledky	41
4.1. Stanovení koncentrace cytokinů v nádorové tkáni po aplikaci laminarinu-BAM, LPS a jejich směsi.....	41
4.1.1. Interleukin-1 β	41
4.1.2. Interleukin 6.....	42
4.1.3. Interleukin 8.....	43
4.1.4. Tumor necrosis factor α	44
4.1.5. Interferon γ	45
4.1.6. Transforming growth factor β	46
4.2. Studium vlivu kotvení f-MLF a synergie s LPS na redukci růstu nádoru u SCID myši	47
4.3. Studium léčebného účinku směsi laminarin-BAM+LPS aplikované pulzně na redukci nádorového růstu u SCID myši	49
4.4. Studium léčebného účinku směsi laminarin-BAM+LPS aplikované obden na redukci nádorového růstu u SCID myši	50
4.5. Studium významu CR3 v redukci nádorového růstu u Mac-1 ^{-/-} myši léčených směsí laminarin-BAM+LPS aplikované každý druhý den.....	51
4.6. Ověření účinnosti terapie na sarkomu S-180 u BALB/c myši.....	53
4.7. Stanovení míry degranulace neutrofilů při interakci s melanomovými buňkami a fagocytárním ligandem pomocí MPO – zavedení a optimalizace metody.....	53
4.7.1. Zavedení metody stanovení množství uvolněné MPO indikující interakci neutrofilů s melanomovými buňkami a laminarinem-BAM <i>in vitro</i>	54
4.7.2. Zavedení metody a stanovení aktivity MPO uvolněné do mezibuněčného prostoru nádorové tkáně po aplikaci kotveného laminarinu, f-MLF, LPS či jejich směsí .	55
5. Diskuze	57
6. Souhrn	65
7. Seznam zkratk	66
8. Literatura	68

1. Úvod

2008, 11 600, 20 200, 1 230 000, 7 600 000, 13, 1 - zdánlivě nesourodá čísla, u kterých by jen těžko člověk hledal vzájemné pojítka. Významu tato řada nabyde, když se cifry dají do souvislosti s rakovinou. V roce 2008 zemřelo v České republice s touto diagnózou přibližně 11 600 žen a téměř dvakrát více mužů. V dalších šestadvaceti státech Evropské unie v témže roce počet obětí nádorového bujení dosáhl čísla 1,23 milionu, celosvětově pak této zhoubné chorobě podlehl 7 600 000 lidí. Tento údaj odpovídá 13 % všech úmrtí, a rakovina se tak stala první nejčastější příčinou smrti v rozvinutých zemích (WHO, 2014; Luengo-Fernandez a kol., 2013).

1/3, 22 000 000, 126 000 000 000. Ani tato další čísla nemají optimistický význam. Dle výpočtů provedených na základě britských dat postihne rakovina během života více než jednu osobu ze tří (Sasieni a kol., 2011). V roce 2030 se odhaduje počet nově diagnostikovaných pacientů s nádorovým onemocněním na 22 milionů. Důvodem je stárnutí a růst populace spolu se zvyšujícím se trendem „rakovinu zapříčiňujícího chování“ (např. kouření) v rozvojových zemích (Jemal a kol., 2011; Cancer Research UK, 2012). Pokud věříte, že patříte k těm šťastnějším necelým dvěma třetinám a rakovina se vás netýká, jste na omylu. V roce 2009 dosáhly v Evropské unii náklady na léčbu rakoviny částky 126 miliard eur, každý občan EU se na ní tak podílel průměrnou sumou 102 eur (Luengo-Fernandez a kol., 2013). Ať již přímo či nepřímo tento široký soubor chorob, který je charakterizovaný nekontrolovatelným růstem a tkáňovou invazivitou vlastních abnormálních buněk (Kasper a kol., 2005), má dopad na život nás všech.

Ačkoli se již dlouhé roky celosvětové snahy mnoha specialistů napříč vědou i medicínou upírají k nalezení vhodné léčby, současné možnosti zdaleka nezaručují stoprocentní výsledky a uzdravení. Asi nejdynamičtěji se rozvíjecí směr terapie se soustředí na zapojení imunitního systému do boje proti rakovině. Stejnou cestou se vydal i náš tým. Ve své bakalářské práci jsem se zabývala účinky kotvení laminarinu (strukturou patřící mezi PAMPs) na povrch nádorových buněk, jehož smyslem bylo přilákat a přimět efekторы vrozené imunity, aby maligní buňku (v domnění, že se jedná o patogen) zneškodnily. Provedené pokusy prokázaly, že se tomu tak skutečně děje. Hlavním cílem této magisterské práce je získat alespoň drobný vhled do mechanismů, jakými se tomu tak děje.

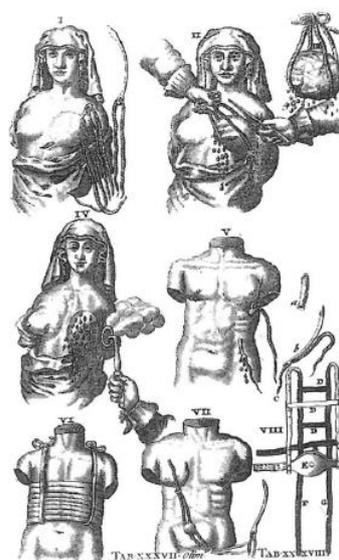
1.1. Historie rakoviny a její léčby

Díky souvislosti vzniku rakoviny s akumulací poruch v genetické informaci je pravděpodobné, že nádorová onemocnění provází člověka od počátku jeho existence; první písemnou zmínku pak můžeme dohledat v egyptském papyru napsaném 2,5 tisíce let před naším letopočtem (Tiwari a Roy, 2012). Důkazy o sužování Egyptů touto chorobou však lze nalézt i mimo starověké svitky – a to přímo na kostech mumií. V relativně nedávné době byla například u ostatků muže starých více než 2000 let diagnostikována rakovina prostaty (Prates a kol., 2011).

Pojmenování nádorového bujení se přisuzuje Hippokratovi (460-375př. n. l.). Tento starověký „otec medicíny“ se spolu s jeho následovníky Aulem Celsem (100–44 př. n. l.) a Claudiem Galenem (131–200 n. l.) domníval, že rakovina je výsledkem nerovnováhy čtyř tělních tekutin – krve, hlenu, žluté a černé žluči (tato teorie přežila své autory o celých tisících let; Hajdu, 2011). Ve svých pracích pak popsali několik typů nádorů a jejich doporučený způsob léčby spočíval v chirurgickém odstranění nádoru a okolní tkáně, vypálení či použití různých mastí a užívání projímadel pro prevenci hromadění žluči (Hajdu, 2004).

První tištěná kasuistika rakoviny byla publikována v roce 1507 v tenoučké knížce pitevních záznamů Antonia Benivieniho (1443-1502). Do konce 16. století se provádění obdukcí stalo rutinní procedurou a spolu s tímto postupem rovněž začalo přibývat záznamů a vědomostí o nádorovém bujení (Hajdu, 2010).

Do stejného století se také datuje první (v letech našeho letopočtu) systematické užití chemikálií k terapeutickým účelům švýcarským lékařem a chemikem Paracelsem (1493-1541). Nejčastěji užívanou složkou jeho chemoterapie byl arsen. V Paracelsově posmrtně vydané knize je též zachycena první souvislost mezi vznikem rakoviny a povoláním (tedy vnějšími příčinami), konkrétně případy rakoviny plic u horníků těžících kovové rudy. Není však překvapením, že i v době renesance hlavním léčebným postupem zůstávalo chirurgické odstranění nádoru. Techniku mastektomie a pooperativní péče německého lékaře J. Sculteta z té doby můžete vidět na ilustraci (obr. 1) vydané v roce 1665 (Hajdu, 2011).



Obr. 1. Ilustrace techniky mastektomie a pooperativní péče dle Scultetuse z jeho knihy *Armamentarium Chirurgicum* (Hajdu, 2011).

Drtivá většina toho, co o rakovině víme, je však podstatně mladší. Od 20. století se lékaři uchýlili k radikálním chirurgickým zákrokům, kdy se pacientům odstranila co největší část postiženého orgánu i s jeho okolím, a užívání chemoterapeutik v obrovských dávkách, které ovšem úspěšně ničily každou dělící se buňku v těle. Roku 1971 podepsal americký prezident Richard Nixon National Cancer Act, kterým přislíbil dlouhodobou finanční podporu Národnímu Institutu pro Rakovinu (Weinhouse, 1972). Porozumění mechanismům nemoci pak vedlo k zlepšení životních vyhlídek pacientů. Drastické metody byly vystřídány šetrnějšími operačními zákroky a ozařováním. Vysmívaná chemoterapie, v minulosti často využívaná jako poslední možnost, však došla také citelné změny a v současnosti se hojně využívá (Tiwari a Roy, 2012).

Čtvrtý a nejmodernější směr (vznikající v 80. letech minulého století), kterým se terapie rakoviny ubírá, vede k tzv. biologické léčbě. Její označení se odvíjí od používání biologických látek; v boji proti nádorovému bujení se jedná zejména o produkty savčího genomu zajišťované technikami molekulární biologie a genetického inženýrství. Základ mnoha těchto produktů vychází z mediátorů imunitní odpovědi a látek aktivních v regulaci růstu a maturace buněk, které se v tělech savců běžně vyskytují (Oldham, 1986). Tyto biologické látky a tzv. modifikátory biologické odpovědi jsou prostředky, jejichž mechanismy účinku zahrnují vlastní fyziologické odpovědi jedince.

Principy těchto mechanismů jsou velmi rozmanité. Mohou vést ke zvýšení pacientovy obranyschopnosti prostředky sloužícími jako efekторы či mediátory protinádorové odpovědi, kterou posilují či obnovují; případně tlumí tu část pacientovy reakce, jež je škodlivá. Mohou stimulovat intenzivnější imunitní odpověď jedince pomocí modifikovaných nádorových buněk či vakcín. Další snižují transformaci a/nebo diferenciaci, případně i maturaci tumorových buněk, interferují s růst-podporujícími faktory a angiogenezi-indukujícími faktory produkovanými samotnými nádory. Využívají biologické molekuly k zaměření a vázání rakovinných buněk, a indukovat tak výraznější cytostatický a cytocidní efekt, plus mnohé další (Oldham a Dillman, 2009).

Při pohledu na předchozí stránku je zřejmé, že se k biologické léčbě upírá mnoho nadějí. Bohužel výsledky jejího samostatného využití nejsou stále uspokojivé a biologická léčba zůstává spíše jako doplňující forma k výše zmíněným a více invazivním metodám terapie rakoviny (Murphy, 2010).

1.2. Klasifikace nádorů

Vzhledem k faktu, že ke změnám vedoucím k rakovině může dojít u celé řady buněčných typů, je počet druhů rakoviny poměrně vysoký. Hanahan a Weinberg v roce 2000 hovořili o více než stovce typů tumorů (Hanahan a Weinberg, 2000), v současné době se dá díky pokročilejším diagnostickým a rozlišovacím metodám uvažovat o ještě vyšším čísle (Hong a Cho, 2006).

Klasicky přetrvává dělení dle biologického chování a histogeneze (Koldová, 2013). První zmíněné zahrnuje tři kategorie:

- a) nádory **benigní** – pomalu rostoucí, ohraničené, nerecidivující se zralými, diferenciovanými buňkami, netvořící metastázy, nebezpečné především svým expanzivním růstem;
- b) nádory **maligní** – s povahou opačnou k předchozí skupině, tedy neohraničené, s rychlým invazivním, infiltrativním až destruktivním růstem, tvořící metastázy, recidivující;
- c) nádory **intermediární** – s vlastnostmi obou skupin; prognóza je lepší než u zhoubných nádorů, ale mohou recidivovat nebo může docházet k jejich generalizaci (Koldová, 2013).

Počet skupin u dělení dle původu nádoru se napříč literaturou liší. Např. Horton a Hills uvádí šest těchto kategorií:

- a) **nádory epiteliálního původu** – zahrnují nejběžnější formy rakoviny:
 - benigní: papilomy, adenomy;
 - maligní: karcinomy z dlaždicovitých buněk, epidermoidní karcinomy, adenokarcinomy a další různé nediferenciované karcinomy;
- b) **nádory nehematopoetické mezenchymální tkáně**:
 - benigní: fibromy, myxomy, lipomy, chondromy, osteomy, benigní osteoklastomy, synoviomy, angiomy, meningiomy, leiomyomy a rabdomyomy;
 - maligní: obecně zvané sarkomy, původem z pojivové tkáně, kostí, cév, mozkových plen a svalů;
- c) **nádory hemopoetických a lymfoidních tkání** – jsou kategorií s individuálními a charakteristickými znaky, např. tvorbou volně cirkulujících buněk;
- d) **nádory nervové tkáně** – jsou různorodou skupinou zahrnující gliomy, nádory plexus chorioideus, periferních nervů, sítnice a nadledvin;

- e) **smíšené nádory** – tedy ty, které se těžko klasifikují (Horton a Hill, 1982), Koldová uvádí, že se jedná o nádory obsahující minimálně dvě nádorové složky z mezenchymu (fibrolipom, angiofibrom) či z mezenchymu a epitelové části (fibroadenom). Bývají zpravidla nezhoubné. Malgíním příkladem je adenosarkom a karcinosarkom (Koldová, 2013);
- f) **teratomy** – jsou poměrně vzácné nádory složené z více tkání, jež jsou odlišné od části těla, ze které vyrůstají.

Koldová seznam rozšiřuje o **germinální nádory** (seminom, dysgerminom, teratom, atd.), **pigmentové melanocytární nádory** (benigní – névy, maligní melanom) **nádor trofoblastu** (choriokarcinom) a **mezoteliom** (Koldová, 2013).

1.2.1. Maligní melanom

Melanom (melanoblastom) je neuroektodermální nádor vznikající maligním zvratem melanocytů (Šlampa a kol., 2007). Z rakovin kůže je melanom třetím nejčastěji se vyskytujícím typem nádoru (Horton a Hill, 1982). K výskytu dochází v drtivé většině případů na kůži, může se však objevit i v oku a vzácněji na sliznicích. Incidence jeho výskytu v posledních letech stoupá, dle Šlampa a kolektivu v ČR před sedmi lety dosahovala hodnoty 12,1/100 000 mužů a 12,8/100 000 žen (Šlampa a kol., 2007).

Již v polovině minulého století vědci zaznamenali významnou korelaci mezi intenzitou výskytu melanomu a dávkou slunečního záření (Lancaster, 1956). Za konkrétního viníka je považováno ultrafialové záření coby iniciátor kancerogeneze. Nejčastěji postihuje bílou rasu (u Asiátů je jeho výskyt řídký, u černochů vzácný) severského typu v oblastech s ozonovou dírou (Vorlíček a kol., 2006).

Onkologové dělí maligní melanom na tři základní typy – povrchově se šířící melanom s nejhorší prognózou, nodulární melanom a lentigo maligna s nejlepší prognózou (Horton a Hill, 1982) považovaný za melanom *in situ* (Šlampa a kol., 2007). Prognóza je dále odhadována podle Clarkova či Breslewova klasifikačního systému (Horton a Hill, 1982) a dalších faktorů jako přítomnost ulcerace, vaskularizace nádoru, infiltrujících lymfocytů, metastáz, atd. (Homsí a kol., 2005).

K šíření melanomu dochází lymfatickou i krevní cestou. První případ metastazování povrchovými lymfatickými cévami zapříčiňuje vznik satelitních ložisek a implantaci melanomových buněk v kůži. Časté jsou i metastázy do okrskových mízních uzlin hlubokými lymfatickými cévami. Kromě nich se však ložiska mohou najít téměř v jakémkoli

orgánu, nejčastěji ovšem v plicích, játrech a mozku (Horton a Hill, 1982). V případě, že dojde u pacienta k nálezům distálních metastáz, je melanom většinou považován za nevléčitelný. Pětileté doby přežití dosáhne méně než 10 % pacientů (Balch a kol., 2001).

1.2.1.1. Myší melanom B16-F10

Rozšířeným modelem pro experimentální výzkumy *in vivo* je myší buněčná melanomová linie B16 získaná před více než 65 lety z chemicky indukovaného tumoru u kmene myši C57BL/6. Jako jeden z podtypů této linie byla v 70. letech odvozena doktorem Fidlerem vysoce metastazující varinta F10. Stala se v laboratořích hojně využívanou díky rychlému růstu *in vivo* (smrt po subkutánní aplikaci může nastat do 2-4 týdnů), silné pigmentaci usnadňující pozorování a vysoce agresivní schopnosti tvořit metastázy v plicích (Herlyn a Fukunaga-Kalabis, 2010).

1.2.2. Sarkom

Pojem sarkom zahrnuje poměrně širokou skupinu mezenchymálních neoplázií, které vznikají v kostech či měkkých tkáních (svaly, šlachy, tuk, fibrózní a synoviální tkáň, cévy, nervy). Jedná se o relativně vzácné zhoubné nádory tvořící méně než 1 % všech malignit. V České republice se ročně vyskytne přibližně 350 případů (Žaloudík, 2006). Sarkomy postihují všechny věkové skupiny, bývají jedním z nejčastěji se vyskytujících typů solidních nádorů u dětí (Kasper a kol., 2005).

Důvodem patogeneze může být expozice chemickým kancerogenům (azbest, dioxiny, atp.), vzácně trauma a zranění, kdy sarkomy vycházejí z jizvení po prodělané operaci, popálení či zlomeniny. Mezi iatrogenní faktory patří radioterapie. Důležitou roli hraje genetická predispozice (Li-Fraumeni syndrom, NF-1, chromosomální translokace t(X,18) (p11,q11). atd.). Kaposiho sarkom je jako jediný vyvolán virem (Kasper a kol., 2005).

Diagnóza bývá vzhledem k vzácnosti onemocnění problematická. Projevem je často zduření či bulka hmatná pod kůží nebo ve svalech, mechanickými symptomy je tlak, pnutí či pocit skřípnutí svalu nebo nervu (Žaloudík, 2006).

Metastázy nejčastěji pronikají do plic, u určitých typů sarkomů pak do lymfatických uzlin a vzácně do jater a kostí.

Prognostickými faktory jsou histologický stupeň, vztah k fasciálním prostorům a velikost primárního tumoru. Léčení jsou zpravidla pacienti bez metastáz, a to chirurgickým zákrokem

v kombinaci s radio a/nebo chemoterapií. Pacienti v pokročilém stádiu (metastázy, postižené uzliny) zpravidla umírají do jednoho roku (Kasper a kol., 2005).

1.2.2.1. Myší sarkom S-180

Sarkom S-180 transplantovatelný na BALB/c myši má původ v samovolně vzniklém axilárním a epiteliálním nádoru, který byl objeven a zkoumán přesně před sto lety doktorem Woglomem (Zuckerberg, 1973). Charakteristickou vlastností je vysoká rychlost růstu, absence či nízký počet metastáz a možnost občasné spontánní regrese (Jones a kol., 1939).

1.3. Imunitní systém a imun-surveillance maligních onemocnění

Imunitní systém představuje rozsáhlou skupinu buněk a molekul, jejichž hlavním úkolem je obrana organismu před infekcí. Kromě rozpoznání a potlačení patogenních mikroorganismů a pochodů musí být imunitní systém také schopný rozlišit tělu vlastní struktury od cizích či pozměněných. Lze jej rozdělit na dvě základní části – vrozenou (nespecifickou), která vyvolá imunitní odpověď vždy ve stejném rozsahu nehlédíc na počet setkání s infekčním agens, a získanou (specifickou/adaptivní), jejíž míra odpovědi se zvyšuje s opakovanou expozicí mikrobům (Delves a Roitt, 2000). Základní charakteristiky a rozdíly jsou uvedeny v následující tabulce (Tab. 1; Janeway a Medzhitov, 2002).

Tab. 1. Přehled základních rozdílů mezi vrozenou a získanou imunitou (Janeway a Medzhitov, 2002)

	vrozená imunita	získaná imunita
Receptory	fixované v genomu	kódované v genových segmentech, nutné přeskupení
Distribuce	neklonální	klonální
Rozpoznání	buňky jedné třídy jsou identické	buňky jedné třídy jsou rozdílné
	konzervované molekulární vzorce (LPS, LTA, glykany,...)	detailní molekulární struktury (proteiny, peptidy, uhlovodíky)
Rozlišení vlastního a cizího	dokonalé	nedokonalé
Doba působení	okamžitá aktivace efektorů	opožděná aktivace efektorů
Odpověď	kostimulační molekuly cytokiny (IL-1B, IL-6) chemokiny (IL-8)	klonální expanze nebo anergie IL-2 efektorové cytokiny (IL-4, IFN γ)

Hypotéza zapojení imunitního systému do boje s rakovinou, poprvé zmíněná Paulem Ehrlichem (Ehrlich, 1909) a později rozvedená a pojmenovaná jako *immunosurveillance* Burnetem a Thomasem (Burnet, 1970), říká, že imunitní systém dohlíží na buňky podléhající malignímu zvratu a pokud funguje správně, jejich odstraněním předchází rozvoji nádorového onemocnění. Tato přes sto let stará myšlenka byla podpořena pozorováními, kdy imunosuprimovaní lidé a imunodeficientní myši vykazovali větší náchylnost k onemocnění rakovinou; konkrétně typy nádorů asociovanými s virovou infekcí (Jakóbisiak a kol., 2003; Bui a Schreiber, 2007) a chemickou kancerogenezí. Nepřímým důkazem svědčícím pro existenci imunitního dohledu je i samotná přítomnost složitých a důmyslných imunosupresivních mechanismů inicovaných nádory (Hatina, 2005).

Novějším pojmem je tzv. *imunoediting*, který lépe vystihuje duální charakter interakce mezi imunitou a rakovinnými buňkami. V anglickém jazyce se o něm hovoří jako o systému tří E – *elimination, equilibrium, escape*. Immunosurveillance se uplatňuje v první fázi a podílí se na eliminaci nádorů. Během rovnovážného stádia probíhá darwinovská selekce tumorových variant, jež jsou následně schopné úniku a dávají vzniknout odolnějším a progresivněji rostoucím tumorům již na hranici detekovatelnosti. Proces imunoeditingu trvá po celou dobu existence nádoru a tím určuje jeho fenotyp (Dunn a kol., 2002; Ostrand-Rosenberg, 2008).

1.3.1. Získaná imunita versus rakovina

Od 60. let minulého století se v literatuře začínají objevovat zmínky a důkazy o antigenicitě nádorových buněk, která stojí za vyvoláním imunitní odpovědi o různé síle a efektivitě (např. Klein, 1966). Tato antigenicita vzniká na základě produkce proteinů (antigenů), které jsou pozměněny v důsledku mutace, exprimovány v nadměrném množství či na nesprávném místě a v nesprávný čas (jejich produkce je vztažena pouze k určité fázi vývoje organismu; Boon a kol., 1997). Tyto nádorové antigeny jsou tříděny do dvou hlavních skupin:

- a) tumor-specifické antigeny (TSA) – nacházející se pouze v prostředí nádoru a obvykle související s procesem kancerogeneze
- b) tumor-asociované antigeny (TAA) – běžně se vyskytující buněčné proteiny, které jsou z nějakého důvodu u určitého druhu rakoviny exprimovány s vyšší četností (Hatina, 2005).

Antigeny mohou být pomocí MHC-I a MHC-II molekul prezentovány na povrchu antigen prezentujících buněk (dále jen APC). Vzniklé komplexy jsou rozpoznávány T-buněčnými receptory (TCRs), přičemž dochází k aktivaci příslušných T-lymfocytů (Houghton a Guevara-Patiño, 2004). Ty jsou pak hlavními pomocníky a efektorovými buňkami adaptivní imunity. Konkrétně se jedná o cytotoxické CD8⁺ a 2 subpopulace pomocných CD4⁺ T-lymfocytů (Th1 a Th2). Působení Th1 vede díky stimulaci CD8⁺ T buněk k poškození nádorové tkáně, převaha Th2 znamená odklon k humorální imunitní odpovědi pomocí stimulace B-lymfocytů a tvorby protilátek - tento stav zdá se býti kontraproduktivním, neboť aktivované B-buňky a jejich rozpustné produkty se údajně podílí na kancerogenezi (Ostrand-Rosenberg, 2008).

1.3.2. Vrozená imunita

Tato fylogeneticky starší část imunitního systému se v různé míře nachází u všech mnohobuněčných organismů a využívá mechanismy, které jsou neměnně zapsány v genetické informaci již od buněk zárodečné linie. Tyto mechanismy pak slouží k rozpoznání chemických a biologických struktur, jež jsou typické pro patogenní mikroorganismy. Neexistuje zde imunologická paměť, která je doménou adaptivní části imunitního systému (Medzhitov a Janeway, 1997). Imunitní reakce se příliš neliší dle jednotlivých druhů mikroba, jsou však rychlé a veskrze efektivní, sloužící jako první obranná linie při napadení organismu (Akira a kol., 2006).

1.3.2.1. Buněčné složky

Kriticky důležitou úlohu ve složitém soukolí imunitního systému obratlovců hrají bílé krvinky myeloidního původu, které profesionálně pohlcují a ničí patogeny. Spolu s dalšími buňkami svým působením vyvolávají celou škálu reakcí souhrnně označovanou jako zánět. Jsou nezbytné k hojení ran a uzdravení tkáně. Tyto fagocyty se dělí na mononukleární a polymorfonukleární buňky lišící se nejen tvarem jádra ale i dalšími funkcemi (Beutler, 2004; Unanue, 1976).

Mezi *mononukleární fagocyty* patří makrofágy, vznikající přestupem monocytů z krve do tkáně a jejich blízké příbuzné a méně početné dendritické buňky odvozené také od monocytů. Mononukleární fagocyty jsou poměrně velké buňky (15-25 μm v průměru) s nepravidelným povrchem s filopodii a rozmanitým tvarem (Singh, 2006).

Makrofágy jsou hojně rozmístěny po celém těle tak, aby byly v případě vniku infekce do makroorganismu jakoukoli cestou vždy poblíž; tvoří také součást parenchymu důležitých orgánů jako je srdce, mozek, ledviny a játra. Mimo fagocytózu je jejich další velmi důležitou funkcí supervize. Pomocí chemotaktických cytokinů totiž mohou povolat na místo infekce další myeloidní buňky - polymorfonukleáry. Společně s **dendritickými buňkami** zahajují adaptivní imunitní odpověď tím, že prezentují antigen T-lymfocytům pomocí jejich MHC II molekul. Jsou tak nezbytným můstkem k vzniku kompletní imunitní odpovědi (Beutler, 2004; Rosenthal a kol., 1975).

Polymorfonukleární fagocyty zvané též granulocyty (PMN) podle přítomnosti granul v cytoplasmě zahrnují tři typy buněk – neutrofilů, eosinofilů a bazofilů. **Eosinofilům** (1-3 % všech leukocytů) je klasicky přisuzována role v obraně proti mnohobuněčným parazitům. Nové studie však naznačují, že se jedná o pleiotropně multifunkční leukocyty podílející se jak na iniciaci i propagaci mnohých zánětlivých procesů, tak i na modulaci nespecifické i specifické imunity (Rothenberg a Hogan, 2006). **Bazofily** (0-1 %) jsou rovněž důležitými efektorovými buňkami, které vylitím obsahu svých granul přispívají k ochraně proti parazitickým helmintům a k vzniku alergických reakcí (Nakanishi, 2010).

Neutrofilů jsou vysoce pohyblivé a krátce žijící bílé krvinky, v jejichž cytoplasmě se nachází velké množství sekrečních granul. Pro svoji menší velikost (12-15 μm) jsou nazývány také jako mikrofágy. U zdravých jedinců tvoří neutrofilů v periferní krvi 40-80 % všech leukocytů - v absolutních číslech a za normálních podmínek toto procento odpovídá u člověka zhruba $5000/\text{mm}^3$, celkový počet však může být 5-10násobný v případě vážné infekce (Beutler, 2006; Lacy, 2006).

V současné době se jeví, že makrofágy i neutrofilů mohou v boji s rakovinou stát na obou stranách válečné linie. K protinádorovým pochodům patří fagocytóza, ADCC reakce vůči rakovinným buňkám a produkce cytokinů, které působí proti tumorům přímo (TNF, TRAIL) i nepřímo (IL-12, IL-18). Pro účast na rozvoji nádoru hovoří schopnost neutrofilů transformovat normální buňky *in vitro* (Jakóbisiak a kol., 2003) a epidemiologické studie odhalující souvislost mezi chronickým zánětem a výskytem rakoviny (např. Coussens a Werb, 2002).

Přítomnost zánětlivého infiltrátu v nádoru je dlouhodobě známá záležitostí, nicméně k jednoznačným závěrům, zda je to ku prospěchu pacienta či nádoru, se věda stále nedobrala (Jakóbisiak a kol., 2003).

Natural killer (NK) buňky se sice liší od dříve uvedených leukocytů lymfoidním původem společným s T a B lymfocyty, přesto se jejich protinádorové a protivirové účinky řadí mezi mechanismy vrozené imunity (Cerwenka a Lanier, 2001), případně na pomezí nespecifické a specifické imunity (Vivier a kol., 2011). Tvoří přibližně 15 % lymfocytů v krevním řečišti a nacházejí se také v periferních tkáních, jako jsou játra, peritoneální dutina a placenta (Trinchieri, 1989). Úlohou NK buněk je kontrola exprese MHC I molekul prezentujících vlastní antigeny cytosolického původu na povrchu tkáňových buněk. Aby se vyhnuly ataku specifické imunity, u některých nádorů a virových infekcí dochází k zastavení exprese či pozměnění těchto molekul. Jejich absence pak vede u NK buněk k spuštění cytolytických pochodů (Bottino a kol., 2005). Název *natural killers* se odvíjí od schopnosti působit buněčnou smrt (zprostředkovanou nejčastěji absencí MHC I či mechanismem ADCC) rakovinným a virem infikovaným buňkám bez specifické imunizace. NK buňky jsou také producenty řady cytokinů (TNF α , IL-10, IL-3, G-CSF) a chemokinů (CCL molekuly a IL-8), čímž významně napomáhají kolokalizaci dalších hematopoetických buněk v místě zánětu (Vivier a kol., 2011). U zvířecích modelů jsou NK buňky považovány za významné činitele immunosurveillance, u lidí tato funkce stejně jako vliv na prognózu zůstává předmětem diskuze (Jakóbisiak a kol., 2003).

1.3.2.2. Humorální složky

Kromě buněk se na vrozených imunitních reakcích mohou podílet i samotné biomakromolekuly, zejména proteiny. Ty jsou schopné lokalizovat i usmrcovat mikroby, které nebyly fagocytovány. Mezi takové molekuly patří například některé **rozpuštěné receptory rozpoznávající patogeny (PRRs)**.

Významným humorálním efektorovým mechanismem je **komplement** (Beutler, 2004). Komplementový systém je tvořen přibližně čtyřiceti plazmatickými a membránovými glykoproteiny, jejichž funkce se dají shrnout do tří hlavních bodů - 1) vznik membranolytického komplexu narušující integritu cílového mikroorganismu 2) pokrytí patogenu fragmenty komplementových bílkovin, které interagují s receptory na povrchu fagocytů 3) produkce peptidů zprostředkovávajících charakter zánětlivé reakce (Frank, 1988).

Existují studie, které potvrzují aktivaci komplementu proti nádorové masě (např. Niculescu a kol., 1992). K té však nejspíše dochází jen tehdy, pokud se vyvinou a na nádor působí protilátky (Jakóbisiak a kol., 2003).

Dalším důležitým látkovým nástrojem těla jsou **cytokiny** sekretované jak leukocyty, tak i dalšími typy buněk (endoteliální b., fibroblasty apod.). Jedná se o velkou a diverzifikovanou rodinu malých proteinů s molekulovou vahou nejčastěji okolo 10-25 kDa, které slouží jako rozpustné zprostředkovatele inter- i intracelulární komunikace i za hranicemi imunitního systému. Skrze navázání na vysoce afinní receptory na povrchu buněk řídí (auto- i parakrinně) jejich růst, diferenciaci a aktivaci (Haddad, 2002). Tzv. cytokinová signální síť umožňuje udržovat stálé vnitřní prostředí těla (Krejsek a Kopecký, 2004). V rámci imunitní systému se podílí na buněčné signalizaci, vývoji imunitní tkáně a orgánů, zánětu i hojení. Podle druhů produkovaných cytokinů můžeme určit, jakou povahu bude mít imunitní odpověď (Commins, 2010; Haddad 2002).

Odpověď jednotlivých buněk na cytokiny závisí zejména na účastnících se ligandech, specifických receptorech exprimovaných na buněčném povrchu a jednotlivých signalizačních kaskádách, jež jsou aktivovány. Dle charakteru jejich působení vznikaly podskupiny s různými názvy. Rozlišujeme tak interleukiny modulující růst, diferenciaci a aktivaci během imunitní odpovědi; chemokiny s hlavní funkcí nasměrovat imunitní systém do místa zánětu pomocí chemotaxe; interferony (IFN) primárně zprostředkovávající buněčnou odpověď na virovou infekci (Brockner a kol., 2010). Dále se odlišila kategorie transformujících růstových faktorů (TGF), faktorů nekrotizujících nádor (TNF), růstových faktorů krvetvorby (CSF), apod. Tento způsob klasifikace však zůstává arteficiální a velmi přibližný, proto se v současné době vědci přiklánějí k o něco přehlednějšímu (ovšem stejně hrubému) dělení cytokinů na základě jejich funkce, například na cytokiny pro- a protizánětlivé, uplatňující se v humorální/buněčné odpovědi, atd. (Krejsek a Kopecký, 2004; Hořejší a Bartůňková, 2005).

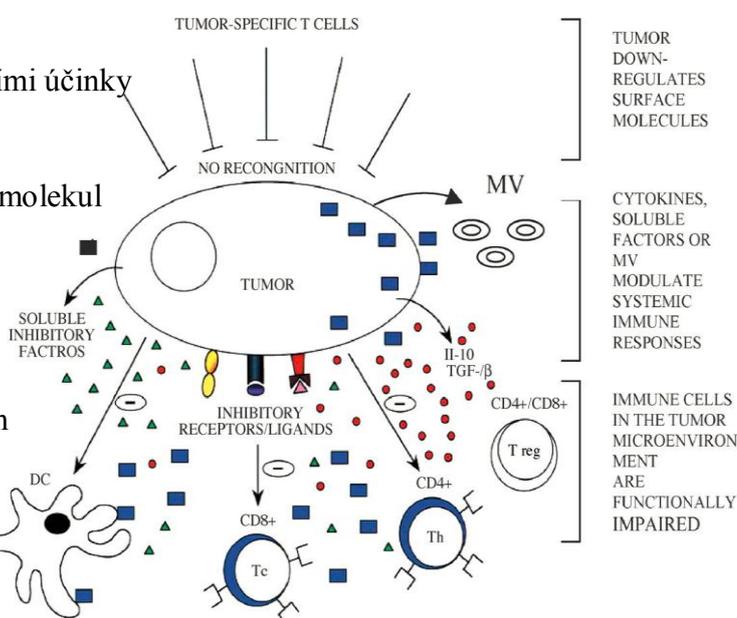
V početných experimentech, kdy se cytokiny podávaly exogenně, byl zjištěn jejich protinádorový potenciál (Parmiani a kol., 2000). Bohužel se stávalo, že co fungovalo v určité dávce u jednoho modelu, mělo u jiného zcela opačný efekt (Jakóbisiak a kol., 2003).

1.3.3. Způsoby úniku rakovinných buněk imunitní odpovědi

Byť se imunitní systém zdá být dobře vybaven pro konfrontaci s vnějším i vnitřním „nepřítelem“, na potlačení rakovinného bujení často nestačí. Důvodem selhání je již zmiňovaná přirozená selekce takových nádorových buněk, které vyvinou důmyslné strategie úniku imunitnímu dohledu. Tyto strategie fungují na dvou základních principech – a) evazi vzniku imunitní odpovědi a b) jejímu potlačení (Jakóbisiak a kol., 2003).

- a) První kategorie zahrnuje vyselektované maligní buňky, jež pozbyly či snížily expresi určitých molekul vedoucích k úspěšné aktivaci lymfocytů. U takových buněk pak dochází nejen k absenci povrchových antigenů, ale také MHC molekul třídy I, kostimulačních molekul a tzv. „danger“ signálů (Khong a Restifo, 2002).
- b) Jak uvádí Jakóbisiak a kol. ve svém článku (Jakóbisiak a kol., 2003), existují pacienti s rakovinou, u nichž, i přes prokazatelnou přítomnost specifických T- lymfocytů a protilátek v krvi i nádorové tkáni, nedochází ke zničení tumorového ložiska. Důvodem může být vyšší rychlost přibývání maligní masy než její likvidace. Další vysvětlení spočívá ve fenotypové odlišnosti buněk nádorové tkáně – imunitní reakce může být cílena pouze na jeden či pár klonů, které se podaří zničit, nicméně většina ostatních přežívá a roste dál. Vyloženě imunosupresivní mechanismy rakovinných buněk pak spočívají v:

- sekreci látek s imunosupresivními účinky (TGF- β , IL-10, PGE₂,...)
- expresi apoptózu navozujících molekul (FasL, RCAS1), které jsou nasměřovány vůči TIL
- snížení exprese Fas receptoru a produkci molekul blokujících T-lymfocyty (např. DcR3), což zajišťuje resistenci k jejich útoku
- zvýšení exprese určitých regulačních proteinů inaktivujících některé složky komplementového systému (Jakóbisiak a kol., 2003).



Obr.2.: Přehled mechanismů úniku nádorové buňky imunitnímu systému (převzato od Whiteside, 2006)

K uvedeným bodům je nutno doplnit zmínku o přítomnosti regulačních (CD4⁺CD25⁺) T-lymfocytů (Wang a Wang, 2008), které běžně brání autoimunitním reakcím, a přítomnost supresorových buněk myeloidní linie, jež mohou v tumorovém mikroprostředí rovněž navodit toleranci antigen-specifických CD8⁺ T-lymfocytů k nádorovým buňkám (Nagaraj a Gabrilovich, 2008). Shrnutí mechanismů vystihuje Obr. 2 (Whiteside, 2006).

1.3.4. Zánět

Zánět je prvotní a nespecifickou odpovědí živé tkáně na její poškození (iritanty, mechanickými i fyzikálními vlivy, traumaty, atp.) a efektivní zbraní schopnou se většinou případů vypořádat s vsudypřítomnými infekčními agens (Kumar a kol., 2004; Sorci a Faivre, 2009). Sestává se z koordinované lokální a systemické mobilizace imunitních, endokrinních a neurologických mediátorů, které mají nasměrovat buňky a další efekторы do místa poškození, vést k eliminaci šíření patogenu, jeho odstranění, obnovení homeostázy a nastartování reparačních pochodů (Kumar a kol., 2004). Projevem těchto dějů jsou typické příznaky zánětu – rubor, calor, dolor, tumor, popsané Celsem již v roce 25 n.l., a *fuctio laesa* doplněná Galenem v 2. století n. l. (Rather, 1971).

Tradičně se v souvislosti se zánětem hovoří o akutní a chronické fázi – ostrá hranice však mezi nimi chybí. Obecně je pro akutní formu zánětu typická infiltrace PMN a odeznění většinou bez následků, zatímco chronická forma bývá spojována s později nastupujícím lymfocytárním a monocytárním infiltrátem a patologií (Ryan a Majno, 1977).

1.3.4.1. Cytokiny ovlivňující vznik a rozvoj zánětu

IL-1. Při svém objevu ve 40. letech 20. století byl díky své schopnosti vyvolat horečku IL-1 nazýván jako endogenní pyrogen (Atkins, 1960). Později byl termín interleukin 1 rozšířen na dvě vzájemně podobné (40% homologie aminokyselin) a vysoce prozánětlivé molekuly, a to IL-1 α a IL-1 β (Lomedico a kol., 1984; Dinarello, 1991).

Jejich systemické účinky se projevují jako typické příznaky infekce – mimo horečku se jedná také o únavu, nechutenství, letargii. Metabolické účinky zahrnují např. sníženou hladinu zinku a železa v krvi, zvýšenou exkreci sodíku a syntézu jaterních proteinů akutní fáze (Dinarello, 1988). V oblasti hematologie působí IL-1 v oběhu neutrofilii, lymfopenii i zvýšenou protinádorovou aktivitu (Ulich a kol., 1987). Důležitou vlastností je aktivace T-lymfocytů pomocí zvyšování produkce IL-2 spolu s expresí receptorů pro IL-2. Účinky na cévní stěnu se projevují zvýšenou leukocytární adhezí, hypotenzí (přispívající k septickému šoku), zvýšenou produkcí PGE₂, atd (Commins a kol., 2010; Dinarello, 1988).

IL-1 jsou masivně produkovány při infekci, zranění či antigenní stimulaci, přičemž hlavním zdrojem bývají mononukleární fagocyty, k syntéze však dochází také u buněk cévní, kožní, mozkové i některých dalších tkání (Commins a kol., 2010).

V současné době je do rodiny IL-1 řazeno 11 peptidů, jejichž hlavní funkce spočívá v řízení zánětlivé odpovědi (Dinarello, 2011).

IL-6 je další multifunkční cytokin produkovaný v hojné míře mononukleáry (Commins a kol., 2010). Konstitutivně i na základě různých stimulů (mitogeny, viry, IL-1, TNF- α , atd.) jej sekretují také T a B lymfocyty, fibroblasty, keratinocyty, endoteliálními buňkami a v neposlední řadě buňky různých nádorů (Hirano a Kishimoto, 1989). IL-6 může být považován za jeden z indikátorů zánětu, neboť jeho sérové hodnoty jsou za normálního stavu velmi nízké (Ershler, 1993).

Působením IL-6 se B lymfocyty mění ve zralé plasmatické buňky produkující protilátky. Aktivuje rovněž T lymfocyty, působí na jejich růst i diferenciaci (Commins a kol., 2010). Stimuluje růst hematopoetických kmenových buněk, ale také hybridomů, plasmocytomů a myelomů. Naproti tomu tlumí zránění myeloidních leukemických buněk a buněk karcinomu prsu (Hirano a Kishimoto, 1989). Podobně jako IL-1, IL-6 navozuje horečnaté stavy (Commins a kol., 2010) a hraje hlavní úlohu ve stimulaci hepatocelulární syntézy proteinů akutní fáze (Castel a kol., 1989).

IL-8 (neutrophil chemotactic factor). Roku 1987 byl identifikován nový cytokin, jehož působení vede k aktivaci neutrofilů (Yoshimura a kol., 1987). Ta zahrnuje tři stěžejní reakce – a) změnu tvaru neutrofilů, jež je dána aktivací kontraktálního systému, umožňující adherovat k endoteliálním buňkám (IL-8 fungoval obdobně jako jiné známé chemoatraktanty, např. komplementový protein C5a; Baggiolini a Clark-Lewis, 1992); b) exocytózu vedoucí k uvolnění rozpustných proteinů a remodelaci buněčné membrány v důsledku její fúze se zásobními organelami (IL-8 spouští exocytózu specifických granul a sekrečních váčků; v rámci změny biomembrány jeho působením dochází mj. k expresi adhezních molekul CD11b/CD18; Detmars a kol., 1990; Baggiolini a Clark-Lewis, 1992); c) oxidativní vzplanutí charakteristické pro stimulované fagocyty, přičemž interleukin-8 vyvolává rychlou a přechodnou aktivaci NADPH-oxidázy vedoucí ke vzniku superoxidu a peroxidu vodíku (Baggiolini a Clark-Lewis, 1992).

Stejně jako u většiny cytokinů i v případě IL-8 *in vitro* studie prokázaly, že za produkci stojí jak bílé krvinky (monocyty, T-lymfocyty, neutrofilů), tak i buňky mimo krevní řadu (Harada a kol., 1994). Těmi jsou zejména vaskulární endoteliální buňky (Strieter a kol., 1989), kožní fibroblasty, keratinocyty a hepatocyty (Thornton a kol., 1990; Harada a kol., 1994). Z malignit pak nádorové buňky žaludku (Yasumoto a kol., 1992). IL-8 není tvořen konstitutivně, v plasmě jeho hladina vzrůstá na detekovatelné hodnoty za přítomnosti

zánětlivých stimulů, jako jsou LPS, IL-1 a TNF a svého maxima dosahuje po 2 hodinách (Harada a kol., 1994; Strieter a kol., 1989).

TNF. Před téměř čtyřiceti lety při sledování hemoragické nekrózy tumorů způsobené endotoxinem objevila skupina vědců novou molekulu s výraznou onkolytickou aktivitou vůči sarkomu a dalším transplantovaným nádorům. Autoři studie ji pojmenovali dle svého účinku jako *tumor necrosis factor*, přičemž předpokládaným zdrojem určili makrofágy (Carswell a kol., 1975). O deset let později došla jiná skupina vědců k závěru, že kachektin (látka potlačující aktivitu proteinové lipázy a působící ztrátu hmotnosti při infekčních a nádorových onemocněních) je jedna a táž molekula jako TNF (Beutler a kol., 1985).

V následujících letech ke kachexii a schopnosti protinádorové toxicity přibyla celá řada dalších účinků a vlastností. TNF se hlavní měrou podílí na rozvoji septického šoku (Beutler a kol., 1985; Tracey a kol., 1987), na buněčné úrovni se jedná o silný aktivátor neutrofilů zprostředkovávaje jejich adhezi, chemotaxi, degranulaci a respirační vzplanutí (Commins a kol., 2010). Díky svému vlivu na ostatní buňky (fibroblasty, endoteliální buňky, makrofágy, lymfocyty, adipocyty a osteoklasty) účastníci se imunitních reakcí, se TNF řadí mezi cytokiny s ústřední rolí v modulaci akutních a chronických zánětlivých stavů (Strieter a kol., 1988).

I u tohoto cytokinu bylo později zjištěno, že se vyskytuje ve dvou formách, a to jako TNF- α produkovaný mononukleárními řadou (v menší míře také neutrofilů, lymfocyty, NK buňkami, endoteliálními a žírnými buňkami) a TNF- β , tzv. lymfotoksin α , sekretovaný lymfocyty (Commins a kol., 2010).

IFN. Název této rodiny cytokinů byl poprvé použit v roce 1957 pro pojmenování fyziologické látky interferující s virovou replikací (Isaacs a Lindermann, 1957). Na základě receptorové specifity se dělí na IFN typu I až III. Zatímco skupina I a III obsahuje více různých molekul, námi sledovaný interferon- γ je jediným členem druhé kategorie (Gray a Goeddel, 1982; Commins a kol., 2010). V minulosti se předpokládalo, že jeho zdrojem jsou výlučně T lymfocyty a NK buňky (Young, 1996), později byla produkce IFN γ detekována i u B lymfocytů a profesionálních antigen-prezentujících buňek (APC= monocyty/makrofágy, dendritické buňky; Schroder a kol., 2004). Právě IFN γ sekretovaný APC může být důležitý pro vlastní lokální aktivaci i aktivaci buněk v blízkosti v rané obranné reakci proti infekci (Frucht a kol. 2001; Schroder a kol., 2004).

Slabé protivirové účinky IFN γ a původ z T buněk svědčí o tom, že má spíše charakter interleukinu než interferonu (Commins a kol., 2010). Nicméně mezi cytokiny zodpovědnými za buňkami zprostředkovanou imunitu je tím nejdůležitějším (Farrar a Schreiber, 1993). IFN γ navozuje zvýšenou expresi molekul MHC třídy I i II, čímž stimuluje prezentaci antigenu a produkci cytokinů APC. Obdobně jako TNF- α a IL-1 stimuluje funkce mononukleárních fagocytů, granulocytů a NK buněk, vede k jejich zvýšené adhezivitě k endoteliálním buňkám, akumulaci leukocytů v místě infekce a jejich schopnosti zabít cizorodé mikroorganismy (Commins a kol., 2010). Esenciální je také účast IFN γ v obraně proti intracelulárním patogenům (Newport a kol., 1996), relativní novinkou je objev jeho preventivního charakteru působení proti vzniku a rozvoji nádorových onemocnění (Ikeda a kol., 2002).

TGF- β . Na počátku 80. let minulého století byla purifikována a charakterizována rodina peptidů (Frolik a kol., 1983), které neoddiskutovatelně patří k nejvíce pleiotropním cytokinům mající stimulační i inhibiční účinky na mnoho druhů buněk (Sporn a Roberts, 1992). Tři různé savčí izoformy (TGF- β 1-3) jsou produkovány většinou typů buněk nejčastěji v latentní formě, jež pro vykazání biologických účinků vyžaduje aktivaci různými faktory (plasmin, thrombospondin, atd.) (Lawrence, 1996).

Biologický efekt TGF- β spočívá ve stimulaci vzniku fibrózy, formace extracelulární matrix, podpory hojení ran a jizvení. Jedná se o mocný inhibitor B a T_HC lymfocytů, obecně pak brání proliferaci a navozuje buněčnou smrt (Commins a kol., 2010). Předpokládá se, že apoptické buňky produkují TGF- β k zajištění imunosupresivního prostředí, kde nevzniká zánět ani autoimunity ohrožující okolní zdravou tkáň (Chen a kol., 2001). Svým tlumivým efektem na cytotoxicitu mononukleárních a NK buněk je TGF- β antagonistou dějů vyvolaných výše uvedenými prozánětlivými cytokiny. Mezi T_H buňkami existuje skupina T lymfocytů zvaných jako T_{reg(ulační)} buňky, které exprimují na membránu vázaný TGF- β zajišťující velkou část z jejich supresivní aktivity. TGF- β je trvale tvořen v zdravých plicích, kde pomáhá snižovat vznik alergických reakcí, obdobně zajišťuje ve střevech imunitní neodpověď na symbiotické bakterie a potravní alergeny (Commins, 2010).

Dalším z dějů závislých na působení TGF- β je savčí embryogeneze (Heine a kol., 1987); kromě apoptických pochodů tento cytokin také reguluje buněčný cyklus, konkrétně brání buňkám překonat G1 fázi (Hanahan a Weinberg, 2000). Obejitím této vlastnosti, tedy signálních drah pro TGF- β , se nádorové buňky vymykají kontrole a proliferují. Zároveň

tvorí více TGF- β , kterým tlumí imunitní reakce v okolí a navozují angiogenezi (Blob a kol., 2000).

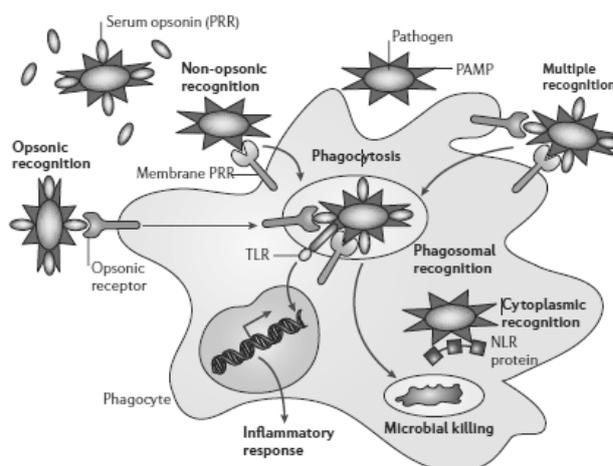
Konkrétně v mikroprostředí nádoru vede produkce TGF- β také k posunu makrofágů a neutrofilů od fenotypu M1 a N1 (vykazující protinádorové účinky) do fenotypu M2 a N2 (s pronádorovými účinky; Fridlender a kol., 2009).

1.3.5. Rozpoznávací mechanismy vrozené imunity

Dlouhou dobu se věřilo, že imunologické odpověď vrozené části imunitního systému je zcela nespecifická. Tato domněnka byla překonána prací imunologa Janewaye Jr., který přišel s konceptem tzv. *pathogen-recognition receptor* (PRRs). Omezený počet těchto receptorů, kódovaných již v zárodečné linii, umožňuje rozlišit mezi vlastní molekulární strukturou a strukturou cizorodých mikroorganismů (Janeway, 1992).

Charakteristickým rysem všech PRRs je rozpoznávání mikrobiálních komponentů známých jako *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs), které jsou pro mikroorganismy esenciální a těžko nahraditelné jinými strukturami (Akira a kol., 2006). Dalším typem molekul aktivujících PRRs jsou *damage-associated molecular patterns* (DAMPs) – látky produkované poškozenými buňkami, jež je vystavují na svém povrchu či uvolňují do okolí (Takeuchi a Akira, 2010).

PRRs jsou neklonální, exprimované na všech buňkách daného typu, nezávislé na imunologické paměti a schopné detekovat patogeny bez ohledu na stádium jejich životního cyklu. V makroorganismu se PRRs mohou vyskytovat a) na povrchu buněk, b) v cytoplasmě a buněčných organelách, c) v séru a tkáňovém moku (Beutler, 2004). Výsledkem jejich základních funkcí je opsonizace, aktivace komplementu a koagulační kaskády, fagocytóza, aktivace prozánětlivých signálních drah a navození apoptózy (Janeway a Medzhitov, 2002) Uvedená fakta jsou ilustrována na Obr. 3 (Brown, 2006).



Obr.3. Metody rekoognice patogenu zprostředkované PRRs (Brown, 2006)

Různé PRRs reagují s určitými PAMPs, vykazují rozdílnou míru exprese, aktivují specifické signální dráhy a vedou k rozličným odpovědím proti danému původci infekce. Základní způsoby vrozeného imunitního rozpoznání jsou vysoce konzervované napříč všemi živočišnými i rostlinnými druhy (Akira a kol., 2006).

Rodina PRRs je velmi početná – obsahuje několik hlavních podskupin lišících se strukturou a/nebo funkcí, jimiž jsou: s membránou asociované *toll-like receptors* (TLRs), *C-type lectin receptors* (CLRs), cytosolové *NOD-like receptors* (NLRs), *RIG-I-like receptors* (RLRs) a *AIM2-like receptors* (ALRs) – viz Tab. 2 (Takeuchi a Akira, 2010).

Tab. 2: Transmembránové a intracelulární PRRs s jejich ligandy (převzato z Takeuchi a Akira, 2010)

PRRs	Lokalizace	Ligand	Původ ligandu
<i>TLR</i>			
TLR1	cytoplazmatická membrána	triacyl lipoproteiny	bakterie
TLR2	cytoplazmatická membrána	lipoproteiny	bakterie, viry, parazité, vlastní
TLR3	endolyzom	dsRNA	viry
TLR4	cytoplazmatická membrána	LPS	bakterie, viry, vlastní
TLR5	cytoplazmatická membrána	flagelin	bakterie
TLR6	cytoplazmatická membrána	diacyl lipoproteiny	bakterie, viry
TLR7(lidský TLR8)	endolyzom	ssRNA	viry, bakterie, vlastní
TLR9	endolyzom	CpG-DNA	viry, bakterie, protozoa, vlastní
TLR10	endolyzom	neznámý	neznámý
TLR11	cytoplazmatická membrána	profilin-like molekula	protozoa
<i>RLR</i>			
RIG-I	cytoplazma	krátká dsRNA, 5' trifosfát dsRNA	RNA viry, DNA viry
MDA5	cytoplazma	dlouhá dsRNA	RNA viry (<i>Picornaviridae</i>)
LGP2	cytoplazma	neznámý	RNA viry
<i>NLR</i>			
NOD1	cytoplazma	iE-DAP	bakterie
NOD2	cytoplazma	MDP	bakterie
<i>CLR</i>			
Dectin-1	cytoplazmatická membrána	β -glukan	houby
Dectin-2	cytoplazmatická membrána	β -glukan	houby
MINCLE	cytoplazmatická membrána	SAP130	vlastní, houby

1.3.5.1. Toll-like receptory (TLRs)

Toll-like receptory savců jsou homologickou rodinou k produktu genu Toll (Akira a kol., 2001), jenž byl poprvé identifikován jako molekula nezbytná pro vývoj embrya u *D. melanogaster*. Nedlouho poté byla objevena také jeho klíčová úloha v rozpoznání houbových infekcí a obraně proti nim (Lemaitre a kol., 1996). Aktivace lidských TLRs

rovněž přispívá k imunitní odpovědi organismu, konkrétně vede k produkci prozánětlivých cytokinů a expresi kostimulačních molekul (Medzhitov a kol., 1997).

Členové rodiny TLRs jsou exprimovány na membránách imunitních buněk s různou intenzitou – od několika stovek u nezralých dendritických buněk, po tisíce u monocytů. Jsou pozorovány také na B lymfocytech a specifických typech T lymfocytů. Lze je detekovat i na buňkách, které nejsou součástí imunitního systému: adipocytech, myocytech či buňkách vaskulárních a intestinálních endotelií (Akira a kol., 2001), dokonce i na nádorových buňkách. Míra exprese TLRs není statická, může být modulovaná v rámci odpovědi na různé stimuly, např. na přítomnost patogenu nebo působení cytokinů a okolního stresu (Akira a kol., 2006).

Strukturně se jedná o transmembránové glykoproteiny I. typu, pro něž je charakteristická extracelulární doména obsahující proměnlivý počet *leucine-rich repeat* (LRR) motivů a cytoplasmatická signalizační doména podobající se intracelulární části receptoru pro interleukin 1 (IL-1R) nazývaná jako TIR (Toll/IL-1R homologní) doména (Bowie a O'Neill, 2000).

Na základě primární struktury mohou být TLRs rozděleny do několika podrodin, z nichž každá rozeznává podobné PAMPs – ligandem podrodin TLR1, TLR2 a TLR6 jsou lipidy, zatímco TLR7, TLR8 a TLR9 vážou nukleové kyseliny. Velmi zajímavou vlastností TLRs je také to, že některé tyto receptory rozpoznávají hned několik vzájemně velmi odlišných ligandů. Příkladem je TLR4, který může být aktivován LPS, fúzním proteinem respiračního syncytiálního viru, fibronectinem, heat-shock proteiny, atd. – přičemž všechny tyto látky jsou rozdílné strukturní povahy (Akira a kol., 2006).

Jak napovídá Tab. 2 TLRs se mohou vyskytovat jak extra-, tak intracelulárně. Mezi první jmenované patří TLRs 1,2,4,5 a 6. Zbytek je k nalezení téměř výlučně ve vnitrobuněčných strukturách, zejména endosomech – to znamená, že před aktivací příslušné signalizační dráhy je nutná internalizace ligandu (Akira a kol., 2006).

Obecně lze říci, že signalizační molekuly TLR drah jsou shodné se signalizačními molekulami pro IL-1R signalizaci (Akira a Takeda, 2004). Stimulace buněk TLR ligandem vede k vzájemné interakci mezi TIR doménami Toll-like receptorů a adaptorovými molekulami (např. MyD88). Výsledkem je spuštění downstreamové signalizační kaskády (zahrnující přenos signálu pomocí kináz IRAK, adaptoru TRAF6 apod., končící uvolněním transkripčního faktoru NF- κ B, který je pak translokován do jádra) a produkce prozánětlivých cytokinů a chemokinů (Martin a Wesche, 2002). Podrobný příklad funkčního schématu je zachycen na Obr. 4 (Anwar a kol., 2013).

1.3.5.1.1. LPS a TLR4

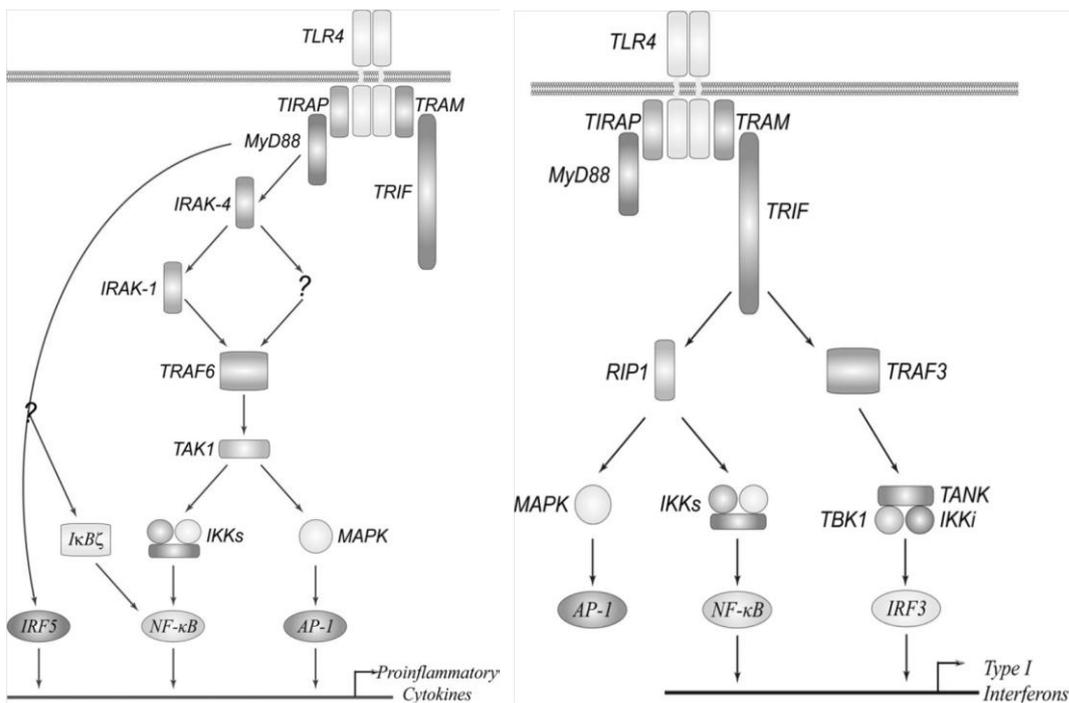
Lipopolysacharidy (= endotoxiny, LPS) jsou pravděpodobně nejvýraznějšími mikrobiálními stimulanty vrozené imunity. Typicky se skládají ze tří částí. První je hydrofobní doména, známá rovněž jako lipid A, zodpovědná za biologickou aktivitu LPS. Zbytek molekuly je hydrofilní a obsahuje neopakující se „jádrové“ oligosacharidy (2. část) a distální polysacharid označovaný jako O-antigen (3. část; Raetz a Whitfield, 2002).

Lipopolysacharidy tvoří vnější vrstvu buněčné stěny Gram negativních bakterií, kde napomáhají její organizaci a stabilitě. Z ní jsou uvolňovány nejen po smrti bakterií, ale také v momentě jejich růstu a dělení (Erridge a kol., 2002).

V případě, že dojde k aktivaci příslušných receptorů na povrchu makrofágů právě lipidem A, je spuštěna tvorba různých mediátorů zánětu (např. TNF- α a IL1- β) a aktivuje se produkce kostimulačních molekul vyžadovaných pro zapojení získané části imunitního systému do odpovědi vůči patogenu. U mononukleárních a endoteliálních buněk lipid A stimuluje produkci tkáňových faktorů (Raetz a Whitfield, 2002). Jak Raetz a Whitfield na základě Drakeových údajů uvádí, tyto synergické děje jsou žádoucí pro odstranění lokální infekce, avšak v případě vážné sepse, kdy dochází k systémové nadprodukcí, mohou tyto prozánětlivé a srážecí faktory vést až k septickému šoku a úmrtí (Raetz a Whitfield, 2002; Drake a kol., 1993).

LPS spouští reakci savčích buněk interakcí s několika různými bílkovinami – jedná se o rozpustný LBP (*LPS binding protein*), CD14 (kotvený glykosylfosfatidylinositolový protein též existující v solubilní formě), rozpustný MD-2 (schopný nekovalentní vazby s TLR4 či přímého formování komplexu s LPS za jeho nepřítomnosti) a TLR4 s výsadním postavením mezi ostatními ((Lizundia a kol., 2008; Lu a kol., 2008).

Po rozpoznání LPS, dochází k oligomerizaci TLR4 a zapojení jeho downstreamových adaptorů skrze interakci s důležitou TIR doménou. TLR4, narozdíl od jiných TLRs, využívá všech pět známých adaptorových proteinů, kterými jsou: MyD88, TIRAP, TRIF, TRAM a SARM. TLR4 signalizace se pak rozchází do dvou drah – na MyD88 závislé a na MyD88 nezávislé (TRIF-dependentní). Obě pokračují reakční kaskádou dalších molekul zachycenou na Obr. 4. MyD88 dependentní signální dráha vede k navození exprese prozánětlivých cytokinových genů, zatímco druhá vrcholí produkcí interferonů typu I (Lu a kol., 2008).



Obr. 4: Schéma signálních drah TLR4. Vlevo MyD88-dependenční, vpravo TRIF-dependenční (převzato od Lu a kol., 2008)

1.3.5.2. Lektinové receptory typu C (CLRs)

Lektiny obecně tvoří početnou skupinu proteinů, jež se vyskytuje napříč všemi nadříšemi od viru po člověka (Sharon, 2008). Jsou zodpovědné za rozpoznání a vysoce afinní vazbu sacharidů volných či obsažených v glykoproteinech, glykolipidech a polysacharidech (Goldstein a Hayes, 1978). Díky jejich vazebné specifitě mohou sloužit jako rozpoznávací molekuly uvnitř buněk, mezi buňkami i mezi celými organismy (Chrispeels a Raikhel, 1991).

Pro rodinu lektinových receptorů typu C je charakteristické, že jejich funkce je podmíněna přítomností Ca^{2+} . CLRs mají společnou alespoň jednu glycid-rozpoznávající doménu obsahující konzervované zbytkové motivy a určující cukernou specifitu daného CLR. Společně tyto receptory dokážou rozpoznat většinu lidských patogenů; manózoové struktury jsou typické pro viry, houby a mykobakterie, fukóza bývá specificky exprimována na určitých bakteriích a helmintech, a glukánové molekuly se nacházejí na povrchu mykobakterií a fungálních mikroorganismů (Geijtenbeek a Gringhuis, 2009). Rozpoznání těchto struktur vede k internalizaci patogenu, jeho degradaci a v případě APC rovněž k prezentaci antigenu (van Kooyk a Rabinovich, 2008).

V současné době CLR rodina obsahuje také proteiny, které, ač mají jednu nebo více oblastí homologních k glycid-rozpoznávající doméně, ne vždy vážou sacharidové struktury (Zelensky a Gready, 2005). S CLRs se můžeme setkat buďto v rozpustné formě nebo ve

formě transmembránových proteinů. Transmembránové CLRy sloužící jako PRRy se dělí do dvou skupin; skupiny I – patřících k rodině manózových receptorů a skupiny II- náležejících k rodině asialoglykoproteinových receptorů obsahující mimo jiné také s dendritickými buňkami asociovaný lektin typu C - dektin 1 (Geijtenbeek a Gringhuis, 2009).

1.3.5.2.1. Beta glukany, laminarin a dektin-1

Biologicky neaktivnější **beta glukany** jsou polysacharidové homopolymery D-glukózových monomerních jednotek vzájemně spojených β -1,3-glykosidickou vazbou (případně 1,4). Vyskytují se v buněčné stěně některých bakterií, hub, plísní, kvasinek, lišejníků, řas i obilovin (Morshed a kol., 2013), jíž dodávají elasticitu a mechanickou odolnost, eventuelně slouží jako zásobní látky (Calderone a Braun, 1991). Jejich nepřítomnost v těle živočichů z nich dělá klasické PAMPs (Brown a Gordon, 2003).

Beta glukany se od sebe liší délkou řetězců a postranním větvením, kde se nejčastěji vyskytují β -1,4 či β -1,6-glykosidické vazby. Typ větvení se zdá být druhově specifický; buněčná stěna bakterií obsahuje první zmiňované, pro houby je typický druhý typ (Chan a kol., 2009). Rozpětí jejich molekulární váhy je různé, od desítek po tisíce kDa (přičemž vyšší biologická aktivita je obecně přičítána spíše beta glukánům s vyšší mol. váhou; Chan a kol., 2009), a záleží na původu. Stejně je to i s rozpustností primárně závislé na struktuře molekuly (Rop a kol., 2009).

V minulé i současné době se nespočet studií zabývalo pozitivním vlivem beta glukánů na buněčnou aktivitu (posílení funkce makrofágů a NKbuněk) a následnou produkci prozánětlivých molekul (Brown a Gordon, 2003), které stimulují imunitní systém a podporují léčbu mnohých onemocnění (Rop a kol., 2009). Na navození těchto dějů se pravděpodobně podílí specifická interakce s několika buněčnými povrchovými receptory jako je komplementový receptor typu 3, laktosylceramid, vybrané scavengerové receptory a dektin-1 (Akramiene a kol., 2007). Ty se mohou nacházet na makrofágách, neutrofilech, dendritických buňkách, a poddruhu T lymfocytů (Williams a kol., 2003), mimo imunitní systém také na epiteliálních buňkách (Ahren a kol., 2001), fibroblastech (Kougias a kol., 2001) a buňkách hypofýzy (Breuel a kol., 2004).

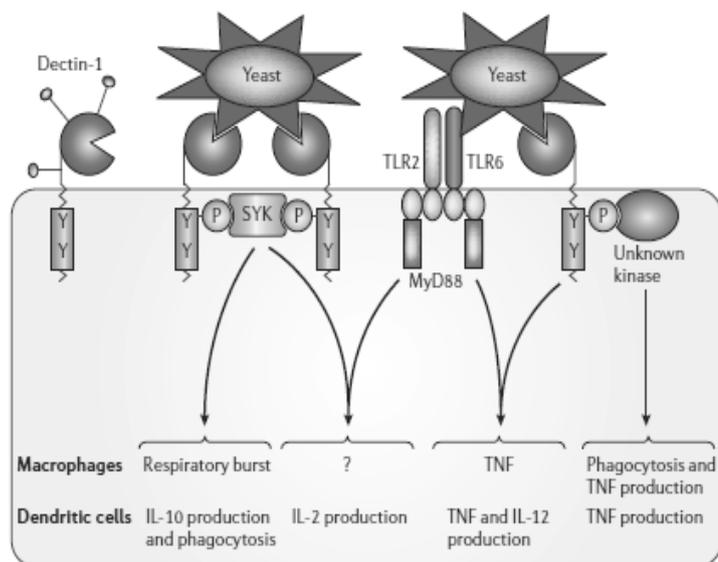
Kromě nápomoci v potlačení infekčních agens (Rondanelli a kol., 2009) beta glukany z obilovin také snižují cholesterol (např. Wood, 1990; Bell a kol., 1999), pozitivně ovlivňují krevní cukr u pacientů s diabetem (Pick a kol., 1996), beta glukánové doplňky stravy

vyrobené z hub jsou často doporučovány k užití při léčbě či prevenci rakoviny (Mayell M., 2001; Kobayashi a kol., 2004).

Laminarin slouží jako zásobní polysacharid hnědých řas, zejména rodu *Laminariae*, z něhož se také nejčastěji získává. Ve vodě rozpustný laminarin druhu *Laminaria digitata* je β -1,3-D-glukan obsahující přibližně 25 glukosylových zbytků s relativně malým množstvím β -1,6- postranních řetězců (Read a kol., 1995). Jakožto velmi krátký beta glukan (< 5-10 tis. MW) je laminarin považován za biologicky neaktivní (Gordon a Brown, 2003; Miyanishi a kol., 2003).

Dektin-1. Jak vypovídá jeho pojmenování zmíněné v předešlé kapitole, dektin-1 byl původně považován za receptor specifický pro dendritické buňky (Ariizumi a kol., 2000). Nyní je známa jeho exprese na mnoha dalších typech buněk včetně mononukleárů, neutrofilů a subsetu T-lymfocytů (Taylor a kol., 2002) – intenzita se pak odvíjí od typu tkáně (nejvyšší můžeme logicky sledovat v plicích a střevech) a stimulace (u myši např. cytokinové, steroidní, mikrobiální; Willment a kol., 2003; Brown, 2006). Přestože beta glukanových receptorů existuje na leukocytech více, dektin-1 se jeví být tím hlavním na povrchu dendritických buněk a makrofágů (Brown, 2006).

Jako u prvního non-TLR PRR bylo u dektinu-1 prokázáno, že po specifickém rozpoznání rozpustných i partikulárních β -1,3- a/nebo β -1,6-glukanů a zymosanu (Brown a Gordon, 2001) zprostředkovává vlastní intracelulární signalizaci (Brown, 2006). Dochází k produkci rozličných cytokinů a chemokinů - u určitých prozánětlivých cytokinů (např.



Obr. 5: Přenos signálu z aktivovaného dektinu-1 a příklad jeho účinků na makrofágy a dendritické buňky (převzato z Brown, 2006).

TNF, IL-12) však musí být společný signál i od TLR (Gantner a kol., 2003), indukci oxidativního vzplanutí (Underhill a kol., 2006) a pozření ligandu pomocí fagocytózy a pravděpodobně i endocytózy (Brown a kol., 2006). Přenosu signálu vyvolaného

aktivovaným dektinem-1 a příklady jeho účinků na makrofágy a dendritické buňky jsou na obrázku 5 (Brown, 2006).

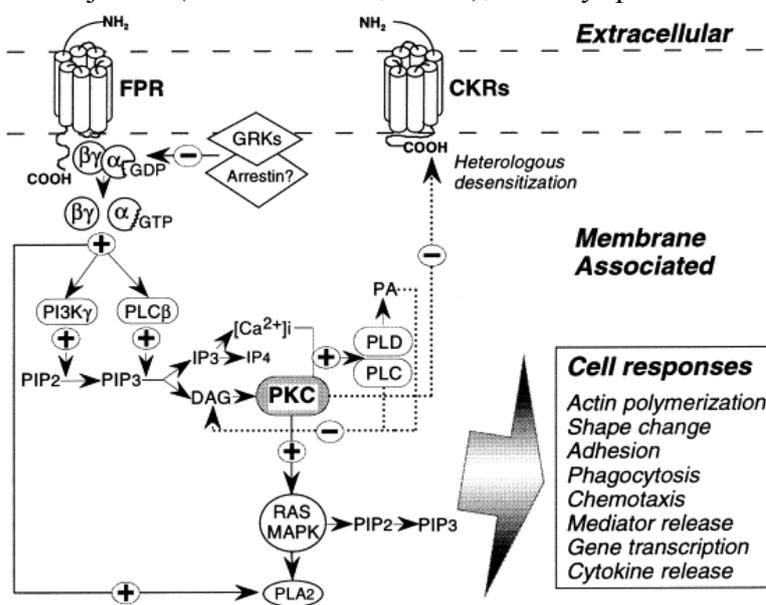
Experimenty Taylora a kolektivu potvrdily, že dektin-1 hraje rovněž důležitou roli v buněčné odpovědi neutrofilů proti neopsonizovaným fungálním patogenům (Taylor a kol., 2006).

1.3.5.3. Formyl peptidové receptory (FPRs) a formyl-methionin-leucin-fenylalanin (f-MLF)

Dalším typem transmembránových PRRs jsou tzv. formyl peptidové receptory, popsané poprvé v roce 1976 jako oblasti na povrchu neutrofilů s vysokou afinitou k N-formyl-methionin-leucin-fenylalaninu (Showell a kol., 1976), prototypu N-formylovaných bakteriálních peptidů. Patří do rodiny receptorů spřažených s G proteinem podílejících se na imunitních procesech (Le a kol., 2002). U člověka jsou známy 3 druhy FPRs (FPR, FPRL1, FPRL2) lišící se ligandy a mírou exprese na povrchu různých bílých krvinek, rodina myších FPRs (fpr1, fpr-rs1, fpr-rs2, fpr-rs3, fpr-rs4, ...) je ještě početnější (Migeotte a kol., 2006).

Kromě zmíněných neutrofilů a monocytů, jsou FPRs exprimované na mnoha dalších buňkách mimo krevní řadu (viz. Migeotte a kol., 2006), např. na povrchu astrocytů, hepatocytů, kde je jejich funkce nejasná (Panaro a kol., 2006), Efekty po navázání

příslušného ligandu na leukocytární FPRs jsou ovšem dobře popsány a zahrnují zejména změny tvaru buňky značící chemotaxi (Fernandez-Segura a kol., 1995), spuštění produkce prozánětlivých cytokinů IL-1a, IL-1b a IL-6 u lidských mononukleárních z periferní krve (Arbour a kol., 1996) či vyvolání fagocytózy a



Obr. 6: Signální dráhy aktivovaného FPR (převzato z Le a kol., 2001)

oxidativního vzplanutí (Panaro a kol., 2006). Přehled signálních drah aktivovaného FPR je znázorněn na obrázku 6 (Le a kol., 2001).

Ligandy FPRs jsou N-formylované peptidy, které mohou být endogenního či exogenního původu. Endogenní N-formylované peptidy pochází z mitochondrií, a signalizují tak poškození buněk tkáně. V případě exogenních látek se jedná o rozsáhlou skupinu peptidů uvolňovanou bakteriemi (Fu a kol., 2006), neboť prokaryotická proteosyntéza se začíná vždy od N-formylmetioninu (Adams a Capecchi, 1966).

Kromě N-formylovaných peptidů izolovaných přímo z bakterií (f-MLF např. z *E. coli*), poslouží k aktivaci FPRs také uměle syntetizované a neformylované peptidy, příkladem může být Trp-Lys-Tyr-Val-D-Met (WKYMVm; Le a kol., 1999) či His-Phe-Tyr-Leu-Pro-Met-NH₂ (HFYLPM; Bae a kol., 2003). c) Neformylovanými endogenními agonisty FPRs a tedy i chemoatraktanty jsou také např. katepsin G (Sun a kol., 2004) a annexin 1 (Walther a kol., 2000).

1.3.5.4. Komplementový receptor typu 3

Komplementový receptor typu 3 (označovaný také jako CR3, CD11b/CD18, Mac-1, α M β 2) je heterodimerní transmembránový glykoprotein nacházející se na povrchu polymorfonukleárních a mononukleárních fagocytů, NK buněk a nepočteném subsetu B a T lymfocytů.

S molekulami CR4 (CD11c/CD18) a LFA-1 (CD11a/CD18) patří do rodiny leukocytárních β_2 -integrinů se společným CD18 β -řetězcem a jedním z tří typů CD11 α -řetězce na CD18 nekovalentně vázaným. Jedná se o molekuly s intercelulární adhezní funkcí a membránové receptory se schopností signalizace (Ross a Větvička, 1993).

CR3 interaguje s rozmanitými ligandy od komplementového fragmentu iC3b, intercelulární adhezní molekuly 1 (ICAM-1), přes fibrinogen až po β -glukany (shrnuto v Marth a Kelsall, 1997).

Literatura uvádí, že při aktivaci CR3 fragmenty iC3b, které opsonizují povrch patogenu bez přítomných polysacharidových struktur, dochází pouze k adhezi fagocytů a NK buněk k danému povrchu. V momentě, kdy se jedná např. o bakterii či kvasinku s buněčnou stěnou s β -glukany, je spuštěn proces fagocytózy, degranulace a oxidativního vzplanutí (Větvička a kol., 1996). Větvička a kol. ve svém výzkumu také zjistili, že rozpustné β -glukany mohou pomocí stimulace CR3 neutrofilů a NK buňky jaksi předaktivovat tak, že je později cytotoxický efekt vyvolán i u opsonizovaných buněčných struktur bez karbohydrátů např. nádorové buňky a erytrocyty s iC3b (Větvička a kol., 1996).

1.3.6. Mechanismy eliminace patogenů makro a mikrofágy

V momentě, kdy se buňky imunitního systému dostanou do místa infekce a pomocí výše uvedených molekul a dějů rozpoznají cizorodé struktury, nastává proces jejich potírání. V případě granulocytů a makrofágů je nástrojem eliminace především fagocytóza (Sorci, 2009). Poměrně nově se v případě neutrofilů hovoří také o tzv. neutrofilních extracelulárních pastích (NETs; Brinkmann a kol., 2004).

1.3.6.1. Fagocytóza a buněčné zabíjení

Proces buněčného rozpoznání a pohlcení určité částice o průměru větším než 0,5 μm (Flannagen a kol., 2009), na konci 19. století poprvé popsal ruský doktor Ilja Mečnikov při pozorování průhledné larvy mořské hvězdice. Po dalších pokusech s trnem došel k hypotéze, že nově pojmenované fagocyty by mohly hrát důležitou roli v obranných mechanismech, tkáňové homeostáze a procesu zánětu i u lidí (Mečnikov, 1905; Stuart a Ezekowitz, 2005).

Kontakt fagocytu s mikroblem vyvolá vznik intracelulárních signálů, které spouští mnoho různých dalších procesů. Dochází k přeskupení aktinových vláken cytoskeletu (Kaplan, 1977) tak, že nastane extenze či vchlípení membrány a internalizaci částice (Underhill a Ozinsky, 2002). Mění se úroveň produkce a pohybu vezikulů, které splýváním s cytoplazmatickou membránou zvětšují její povrch a obsahují látky, jež se podílí na degradaci obsahu nově vznikajícího fagosomu (Aderem, 2002). Aktivuje se apoptóza a mechanismy mikrobiálního zabíjení, vytváří se cytokiny i chemokiny a vznikají molekuly nutné k prezentaci antigenu pro adaptivní imunitu, čímž fagocytóza funguje jako most mezi oběma druhy imunity (Aderem, 2002; Underhill a Ozinsky, 2002).

Při svém vzniku a dozrávání získává fagozom mnohé mikrobicidní vlastnosti (Flannagen a kol., 2009). Dochází k acidifikaci fagosomálního lumen pomocí V-ATPázy translokující vodíkové protony skrze membránu (Beyenbach a Wiczorek, 2006). Kyselé prostředí nejen zabraňuje mikrobiálnímu růstu, ale rovněž vytváří pH optimum pro mnohé hydrolytické enzymy fagocytů. Vodíkový gradient z prostředí vytlačuje také bakteriální živiny, usnadňuje produkci superoxidu NADPH oxidázou a přítomnost H^+ umožňuje vznik složitějších reaktivních forem kyslíku (Flannagan a kol., 2009).

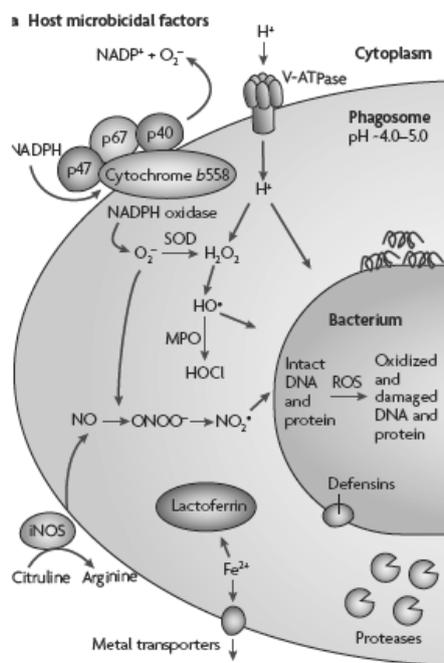
Hlavním nástrojem zabíjení patogenů u profesionálních fagocytů je **produkce reaktivních forem kyslíku (ROS) a dusíku (RNS)**; Flannagan a kol., 2009). Aktivní NOX2 NADPH oxidáza přemísťuje elektrony z NADPH v cytosolu na molekulární kyslík, přičemž

uvolňuje O_2^- do vnitřku fagozomu (Quinn a Gauss, 2004). Tam bývá superoxid přeměněn na peroxid vodíku, který může dále reagovat s dalším O_2^- za vzniku hydroxylových radikálů a singletového kyslíku (Minakami a Sumimotoa, 2006). Druhý způsob produkce toxických sloučenin kyslíku využívá enzym obsažený v azurofilních granulech neutrofilů a lyzosomech monocytů – myeloperoxidázu (MPO). Ta se uvolňuje do fagolyzosomů i do okolí buňky a katalyzuje přeměnu H_2O_2 v kyselinu chlornou (až 50x účinnější než peroxid) a chloraminy. Z HOCl může dále vznikat ještě reaktivnější hydroxylový radikál a singletový kyslík (Racek, 2008).

Oxid dusný a reaktivní formy dusíku (RNS) z něj odvozené jsou pak prominentními antimikrobiálními nástroji makrofágů (Flannagan a kol., 2009). NO syntáza (NOS2) slouží jako dimer – první podjednotka převádí elektron z NADPH na FAD, z něho na FMN a posléze na hem sousední podjednotky za vzniku $\cdot NO$ a citrulinu z L-argininu a kyslíku (Stuehr, 1999; Flannagan a kol., 2009). Oxid dusný, syntetizovaný na cytoplasmatické straně fagozomu, difunduje membránou a v lumen po setkání s ROS může spontánně, či zprostředkovaně přes katalyzátory, podléhat přeměně v RNS jako např. radikál oxidu dusičitého ($\cdot NO_2$), nitroxyl (NO^\cdot), peroxyinitrit ($ONOO^\cdot$), oxid dusitý (N_2O_3), atd. ROS a RNS jsou vysoce toxické, neboť působí inaktivaci cílových proteinů, oxidativními pochody poškozují lipidy a nevratně ničí DNA (Flannagan a kol., 2009).

Ničící arzenál pak doplňují **antimikrobiální proteiny a peptidy**. V zásadě se dělí do dvou kategorií – látky zamezující růstu patogenu a látky narušující jeho integritu. První skupina plní svůj účel omezováním dostupnosti základních živin a to pomocí tzv. scavengerových molekul nebo vkládáním transportérů do fagozomální membrány. Tyto pochody byly lépe popsány u neutrofilů, jejichž cytoplasma obsahuje specializovaná granula (azurofilní, specifická a terciární) a sekreční vāčky, které po stimulaci vypouští svůj obsah do fagozomu i do okolí buňky (Borregaard a kol., 1995; Flannagan a kol., 2009). Kromě bakteriostatických látek najdeme uvnitř granul i

proteiny a peptidy způsobující permeabilitu buněčné stěny a membrány (defensiny,



Obr. 7: Mechanismy určené k degradaci obsahu fagozomu (převzato z Flannagan a kol., 2009)

cathelicidiny), nebo hydrolyzující uhlovodíky (např. lysozym, β -glukuronidáza), lipidy (fosfolipáza A2) a proteiny (katepsiny, Flannagan a kol., 2009). Přehled mechanismů eliminace patogenu je uveden na obr. 7 (Flannagan a kol., 2009).

Výše zmiňovaná **myeloperoxidáza** se jeví také jako klíčový enzym pro ničení extracelulárních cílů, které nemohou být fagocytovány. Následky uvolnění myeloperoxidázy do okolí buňky se odvíjí od jejího přilnutí k cílové struktuře. Pokud fagocyty aherují pevně k povrchu cizorodé či opsonizované částice, dochází mezi nimi k vytvoření kapsy oddělené od extracelulárního prostředí, do níž je MPO uvolňována spolu s H_2O_2 , což simuluje podmínky panující uvnitř fagozomu. Druhý případ toxického působení MPO vzniká při jejím úniku do extracelulární tekutiny, např. před uzavřením fagozomu, v momentě kdy dojde k lýze leukocytu, nebo pokud je buňka vystavena velkému množství rozpustných stimulů (Klebanoff, 2005).

1.3.6.2. NETs

K fagocytóze a degranulaci, hlavním antimikrobiálním strategiím neutrofilů, přibylo před 10 lety objevené formování tzv. *neutrophil extracellular traps* (Brinkmann a kol., 2004). Spočívá ve vypuštění obsahu jádra do okolí buňky (stimulované PMA, IL-8 či LPS), přičemž tento děj může trvat v závislosti na druhu stimulace minuty i hodiny a klíčovou roli v jeho iniciaci hrají ROS (Papayannopoulos a Zychlinsky, 2009). NETs jsou tvořeny vlákny dekonzenzovaného chromatinu, histony a proteiny uvolněné z primárních (elastáza, katepsin G, myeloperoxidáza), sekundárních i terciárních granul (laktoferrin, gelatináza), které jim dodávají toxický potenciál (Brinkmann a kol., 2004). Jejich vysoká koncentrace vede k zneškodnění a zabíjení patogenů a zároveň brání jejich šíření.

NETs se zdají být účinné vůči grampozitivním i negativním bakteriím, houbám i parazitům. Je možné, že rovněž sehrávají důležitou roli i v boji proti nefagocytovatelným patogenům, jako jsou hyfy hub a helminti (Papayannopoulos a Zychlinsky, 2009).

1.3.7. Imunodeficientní myši

K zjišťování a porozumění nejrůznějších mechanismů imunitního systému na úrovni buněk i molekul se využívají myši imunodeficientní modely. Od přirozeně se vyskytujících imundeficientních myší se věda s postupem času a rozvojem nových metod dostala k imunodeficientním vzniklými či navozenými mutacemi, transgenozou či metodami genetického inženýrství (Belizário, 2009).

1.3.7.1. SCID myši

Označení SCID je zkratkou pro *severe combined immunodeficiency* a znamená vážný nedostatek funkčních buněk získané imunity. Jejich vzácná recesivní mutace (*Prkdc^{scid}*, 16. chromozom) má negativní vliv na rekombinaci genů antigenních receptorů, čímž přerušuje raný vývoj buněk B a T linie. Pro SCID myši je tak typická velmi nízká či téměř nedetekovatelná hladina imunoglobulinů v séru. Ostatní hematopoetické buňky se vyvíjí a fungují správně. V současné době existují tři kmeny SCID myši – C57BL/6, Balb/c a CB-17 (Bosma a Carroll, 1991; Belizário 2009). Poslední jmenované byly použity v této práci.

SCID myši jsou rutinně využívány v mnoha výzkumech týkajících se základních imunitních pochodů i složitějších dějů. Kvůli jejich postižení nedochází k odmítnutí transplantovaných štěpů. Umožňují také růst alogenních i xenogenních nádorů. Díky nepřítomnosti lymfocytů, lze po porovnání se zdravými jedinci odlišit hranici vrozené a získané imunitní odpovědi (Bosma a Carroll, 1991).

1.3.7.2. Mac-1 (CD11b) ^{-/-} myši

Kmen myši deficientních pro integrin α M byly vyvinuty pomocí cíleného nahrazení exonu 1 *Itgam* genu vektorem jiných genů u myšího kmene C57BL/6J. Informace o příslušném receptoru, jehož je proteinová podjednotka CD11b součástí, jsou uvedeny v kapitole Komplementový receptor 3. Neutrofilů z těchto transgenních myši vykazují poruchy adhezivní, fagocytózy řízené iC3b a homotypické agregace. Schopnost degranulace je snížena. Využití spočívá ve studiu imunitní odpovědi vůči patogenům a v získávání imunokompetentních buněk (Lu a kol., 1997).

1.4. Terapie melanomu pomocí fagocytárních ligandů kotvených na povrchu buněk

Inspirací k tomuto způsobu terapie byl objev SR/CR myši profesorem Cui (Cui a kol., 2003), které dokážou rozpoznat a likvidovat nádorové bujení pomocí buněk vrozené imunity (konkrétně PMN, makrofágy a NK buňky; Hicks a kol., 2006). Od bodu zjištění jejich potenciálu vedl krok k nápadu označit maligní buňky PAMPs tak, aby buňky v domněnku, že se jedná o infekční agens, zaútočily na (za běžných podmínek pro vrozenou imunitu nenápadnou) nádorovou masu. Dalším důležitým objevem byla pro zajištění

synergie účinku nutnost aktivace signálních PRR společně s aktivací fagocytárních receptorů polem ligandů o vhodné hustotě (Underhill a Gantner, 2004). Kromě kotvených agonistů fagocytárních receptorů je tak v terapii používáno také LPS.

1.4.1. Laminarin – BAM

Laminarin byl kotvený pomocí *biocompatible anchor for cell membrane (BAM)* - molekuly, na jejímž jednom konci se nachází olejová skupina sloužící jako hydrofóbní kotva prostupující buněčnou membránou, aniž by ji poškodila. Druhý konec je tvořen polyethylenglykolem (PEG) zvyšujícím hydrofilitu s reaktivní skupinou na konci, na níž je možno vázat další látky (Kato a kol., 2004).

Terapie laminarin-BAM v kombinaci s LPS v *in vivo* pokusech vedla až k 90,2% redukci nádorového růstu oproti kontrolám. Rovněž výsledky histologie po této terapii ukázaly statisticky významnou redukci nádorové tkáně. V *in vitro* pokusech s makrofágy PMJ2R (aktivovanými LPS) došlo k 41% snížení počtu melanomových buněk s ukotveným laminarinem na svém povrchu (Janotová a kol., 2014).

1.4.2. f-MLF – DOPE

V dalších pokusech bylo použito f-MLF kotvené pomocí BAM a DOPE (*dioleoylphosphatidylethanolamine* - látka svou strukturou podobná BAM, liší se však přítomností druhého alifatického řetězce).

Terapií tímto ligandem v kombinaci s LPS bylo dosaženo obdobných (leč o něco slabších) výsledků jako v případě léčby laminarinem (viz Janotová a kol., 2014).

2. Cíle práce

- Stanovit hladiny cytokinů IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , INF- γ a TGF- β v průběhu terapie melanomu B16-F10 pomocí kotveného laminarinu, LPS a jejich kombinace.
- Ověřit předpoklad, že používaná terapie melanomu B16-F10 je skutečně založena na mechanismech a buňkách vrozené imunity - využití SCID myši.
- Porovnat účinnost aplikace kotveného laminarinu + LPS obden s pulsním režimem léčby u SCID myši.
- Zjistit roli CR3 u myši s melanomy B16-F10 léčených laminarinem kotveným pomocí BAM ve spojení s LPS – využití Mac-1^{-/-} myši.
- Ověřit účinnost imunoterapie založené na instalaci ligandů fagocytárních receptorů na povrch nádorových buněk i u jiného typu nádoru, než dosud testovaného melanomu – studovat terapii sarkomu 180 transplantovaného BALB/c myším.
- Určit míru degranulace neutrofilů při interakci s melanomovými buňkami s kotveným fagocytárním ligandem pomocí MPO – zavést a optimalizovat *in vitro* a *in vivo* metody.

3. Materiál a metody

3.1. Chemikálie

- **BAM** – Biocompatible anchor for cell membrane, Mw 4000 (NOF Europe, Belgie)
- **DNáza I** (Roche Diagnostics)
- **DOPE** - N-(Succinimidyl-oxyl-glutaryl)-L- α -phosphatidylethanolamin, Dioleoyl (NOF Corporation, Japonsko)
- **EDTA** – kyselina ethylendiamintetraoctová (Sigma Aldrich)
- **ELISA kity** (IL-1 β , IL-6, INF- γ , TGF- β , TNF- α – eBioscience, IL-8 - R&D systems)
- **FCS** – Fetal Calf Serum (Sigma Aldrich)
- **Fluid Thioglycollate Medium** (Difco)
- **f-MLF** - N-formyl-methionin-leucin-fenylalanin (Sigma- Aldrich)
- **Laminarin** z *L. Digitata* (Sigma Aldrich)
- **Liberáza DL** (Roche Diagnostics)
- **LPS** z *E. coli* (Sigma Aldrich)
- **Myeloperoxidase (MPO) Fluorometric Activity Assay Kit** (Sigma Aldrich)
- **RPMI 1640** (Sigma Aldrich)
- **Trypanová modř** (Sigma Aldrich)
- **Trypsin** (Sigma Aldrich)

3.2. Laboratorní zvířata

V experimentech byly používány samice myši kmene BALB/c, C57BL/6N, Mac-1^{-/-} (C57BL/6N) a SCID (C.B17/Icr-scid).

Oba kmeny imunokompetentních myši byly objednány z Charles River Laboratories, ve zvěřinci Parazitologického ústavu AV ČR v Českých Budějovicích pak byly chovány za standardních podmínek s fotoperiodou 12/12 a s neomezeným přístupem k vodě a granulované potravě. Terapie byla zahájena ve stáří 8 týdnů v případě myši kmene C57BL/6N, myši BALB/c byly v momentu začátku léčby 9 týdnů.

Kmeny imunodeficientních myši pocházely z vlastního chovu PaÚ BC AV ČR v Českých Budějovicích (SCID myši byly původně získány z Charles River Laboratories, chovné páry Mac-1^{-/-} byly laskavě poskytnuty Dr. Chavakisem z Univerzitní kliniky C. G. Caruse v Drážďanech), kde byly odchovány za standardních podmínek ve sterilním prostředí v IVC (Air Handling Solutions; Tecoplast, Italy) s HEPA filtry. Během pokusů byly drženy v izolátorech (BEM Znojmo, ČR) s HEPA filtry, přístup ke sterilní komerční granulované

stravě a sterilní vodě nebyl omezen. Léčba byla započata přibližně v 8-10. týdnu života myši.

3.3. Buněčné linie

V experimentech užití buněčné linie myšního melanomu B16-F10 a myšního sarkomu S-180 byly darem prof. Říhové z Mikrobiologického ústavu AV ČR, Praha.

Kultivace buněk obou linií probíhala v RPMI 1640 obsahujícím 10% FCS s přídavkem 1 % antibiotik, 1 % glutaminu a 0,1 % merkaptoetanolu při teplotě 37° C v atmosféře nasycené vodními parami obsahující 5 % CO₂.

3.4. Příprava buněčných linií pro použití *in vivo*

Po odstranění kultivačního média byly narostlé nádorové buňky B16-F10 důkladně a šetrně promyty pomocí sterilního pufovaného fyziologického roztoku (PBS). Následovala trypsinizace pomocí 0,5 ml trypsinizační směsi (0,02 % trypsin a 0,02 % EDTA v PBS). Za účelem dalšího uvolnění adherovaných buněk proběhla 5 minutová inkubace v termostatu při 37° C. Trypsinizační reakce byla zastavena přidáním média RPMI 1640 s 10% FCS, v němž došlo k rozvolnění buněk Pasteurovou pipetou. Po centrifugaci (10 min, 4° C, 150G) a vylití séra došlo k naředění buněk na požadový objem přidáním RPMI 1640, tentokrát bez FCS. Roztok s B16-F10 se smíchal v poměru 1:1 s trypanovou modří a množství buněk bylo po chvíli spočítáno v Bürkerově komůrce. Dle zjištěného počtu se pak suspenze naředila na potřebnou koncentraci 4 mil. buněk/ml.

Při přípravě sarkomových buněk S-180 mohl být díky absenci adhezivity ke stěně kultivační nádoby vynechán bod trypsinizace. Vše ostatní bylo provedeno stejně jako v případě buněk melanomových.

3.5. Transplantace nádorových buněk

Pro transplantaci buněk bylo nejprve nutné oholit srst myši na pravém boku asi do poloviny zad. Do této partiny pak bylo subkutánně aplikováno 0,1 ml melanomové (B16-F10 s RPMI 1640) či sarkomové (S-180 s RPMI 1640) suspenze obsahující 400 000 buněk.

3.6. Izolace neutrofilů

Izolaci neutrofilů z myšního peritonea předcházela příprava 3% thioglykolátového média (0,3 g Fluid Thioglycollate Medium + 10 ml deionizované vody). Roztok měl modrou

barvu, která se po převaření v mikrovlnné troubě (1-2 min) změnila na růžovou. Po zchlazení byl roztok přefiltrován do uzavíratelné nádoby obalené alobalem, aby se zabránilo přístupu vzduchu a světla. Roztok byl uložen do lednice. Přes noc se v nádobě oddělily dvě vrstvy - vrchní růžová a žlutá u dna.

Každé myši pak byly intraperitoneálně injikovány 2 ml žlutě zbarveného média a ponechaly se působit. Za 4,5 - 5 hodin byla myš vykrvena a usmrcena cervikální dislokací. Vychlazené PBS bylo vstříknuto do peritonea, lehkým poklepáním se docílilo propláchnutí a následně byla tekutina odebrána do zkumavky. Bylo přilito další chlazené PBS a následovala centrifugace (20 - 40 min podle ohraničení peletu) ve 4 °C při 250 G. Pelet byl opatrně rozsuspenzován v přidávaném RPMI 1640 s 10% FCS doplněném na 1 ml. Buňky byly spočítány v Bürkerově komůrce.

3.7. Sonikace

Za použití přístroje HIELSCHER VP200S došlo k ozvučování dané suspenze v ledové lázni 10 x 10 s, přičemž po každé sonikaci se suspenze chladila po dobu 20 s.

3.8. Měření a výpočet velikosti nádorů

Měření velikosti nádoru bylo prováděno v průběhu terapie každý druhý den pomocí speciálního kaliperu. Dle Inaby a kol. byl největší rozměr nádoru (délka) označen písmenem A, nejmenší (výška směrem od těla) písmenem B. Objem nádoru byl vypočítán dosazením hodnot do vzorce $V = \pi/6 AB^2$ (Inaba a kol., 1986).

3.9. Průměrná redukce nádorového růstu (%)

K výpočtu redukce nádorového růstu (ve srovnání s kontrolou) byl použit následující vzorec:

$$\frac{(\text{průměrný objem nádorů v kontrolní skupině} - \text{průměrný objem nádorů v léčené skupině}) \times 100}{\text{průměrný objem nádorů v kontrolní skupině}}$$

Redukce nádorového růstu byla spočítána ze zjištěných objemů nádorů ve 4., 6., 8., 10., 12., a 14. den od zahájení léčby. Těchto šest cifer pak posloužilo k výpočtu průměrné hodnoty, jež v procentech udává „průměrnou redukci nádorového růstu“.

3.10. Počítání plicních metastáz

Vypitvané plíce byly zakonzervovány v 4% roztoku formaldehydu. Pod binolupou se následně zjistil počet metastatických ložisek (černých teček různé velikosti).

3.11. Statistické vyhodnocení dat

Statistické vyhodnocení dat bylo provedeno v programu R. K zjištění statistické významnosti byla použita analýza rozptylu (ANOVA) doplněná post-hoc Tukeyovým testem. V případě, že data nesplňovala podmínky normality výběrů a homogenitu rozptylů, byla data zlogaritmována. Pokud tato úprava nepomohla, byl použit neparametrický Kruskal-Wallisův test.

Analýza přežití byla vypracována v programu STATISTICA 12 pomocí Kaplan-Meierova testu.

3.12. Příprava terapeutických látek

3.12.1. Příprava f-MLFG₆K – DOPE (+ LPS)

Příprava tohoto terapeutika spočívala ve smíchání 6 ml 1mM DOPE v PBS se stejným objemem 1mM f-MLFGGGGGG-K. Reakce probíhala 1 h při pokojové teplotě. Výsledný roztok byl sterilizován filtrací skrze póry o průměru 0,22 μm .

3.12.2. Příprava laminarin – BAM + LPS

Pro připojení biokompatibilní kotvy (BAM) bylo nutné nejprve provést redukční aminaci laminarinu. Ta spočívala v pětidenním redukování roztoku laminarinu kyanoborohydridem sodným (pH 7,5; 50 °C, prostředí octanu amonného). Roztok byl dále přes noc dialyzován ve střevě MWCO 3500 proti PBS (4 °C, stále míchání; Torosantucci a kol., 2005).

K navázání molekuly BAM na aminoskupinu laminarinu došlo při pH 7,3 dle metody Katoa a kol., 2004. Nakonec byl roztok dialyzován za stejných podmínek jako po aminaci. Výsledkem byl 0,2 mM roztok laminarin-BAM v PBS. Směsi LPS bylo docíleno přidáním LPS na finální koncentraci 0,5 mg/ml.

3.13. Pokusy

3.13.1. Stanovení koncentrace cytokinů v nádorové tkáni v průběhu léčby laminarin-BAM, LPS a jejich směsi

Tento experiment byl proveden na 39 samicích myši C57BL/6N. Dvanáctý den po transplantaci 400 tis. buněk melanomu B16-F10 byly myši rozděleny do čtyř terapeutických skupin (A, B, C, K) po devíti kusech. Každé myši se změřila velikost nádoru, do nějž bylo následně jednorázově aplikováno 50 μ l léčiva. U zbývajících třech myši sloužících jako negativní kontrola byla nejprve zaznamenána velikost jejich nádorů, pak byly myši usmrceny a nádor jim byl vyjmut. Usmrcení a odebrání nádorů probíhalo rovněž po 12, 24 a 48 hodinách vždy u třech myši z každé skupiny.

Nádory byly posléze očištěny studeným médiem RPMI 1640 bez séra a nastříhány na malé dílky, které byly vloženy do zkumavek s 1 ml sterilního RPMI 1640 bez séra s Liberázou DL (0,33mg/ml) a DNázou (0,2 mg/ml). Po 1 hodině inkubace (mírné protřepávání, 37° C), byly vzorky 10 minut centrifugovány (160G, 4 °C). Supernatant byl odebrán a uložen do mrazničky (– 80 °C) až do doby stanovení koncentrace cytokinů metodou ELISA (imunoenzymatická reakce detekující antigen/cytokin ve vzorku) pomocí komerčně dodaných kitů. Samotné testy se pak prováděly přesně dle instrukcí v příložených návodech.

Použitá terapeutika v jednotlivých skupinách:

- **A:** LPS (0,5 mg/ml) v PBS
- **B:** 0,2 mM laminarin-BAM v PBS
- **C:** 0,2 mM laminarin-BAM + LPS (0,5 mg/ml) v PBS
- **K:** kontrolní – PBS

3.13.2. Studium vlivu kotvení f-MLF a synergie s LPS na redukcii růstu nádoru u SCID myši

Experiment byl prováděn na 16 samicích SCID myši, které se 12. den po transplantaci 400 tisíc melanomových buněk B16-F10 rozdělily do 4 skupin (A, B, C a K) po 4 jedincích. Ve stejný den byla zahájena terapie. Pulzní intratumorální podání 50 μ l terapeutika/myš probíhalo ve dnech 0, 1, 2,...8, 9, 10,...16,17,18,...24, 25, 26 a velikost nádoru se měřila obden. Druhým sledovaným údajem byla doba přežití po ukončení terapie.

Použitá terapeutika v jednotlivých skupinách:

- **A:** 0,5 mM fMLFG₆K-DOPE
- **B:** 0,5 mM fMLFG₆K-DOPE+LPS (0,5 mg/ml)
- **C:** LPS (0,5 mg/ml) v PBS
- **K:** kontrolní PBS

3.13.3. Studium léčebného účinku směsi lamirin-BAM+LPS aplikované pulzně na redukci nádorového růstu u SCID myši

V tomto pokusu bylo použito deset samic SCID myši s transplantovaným melanomem B16-F10. Dvanáct dnů od transplantace se myši rozdělily do dvou stejných skupin (A, K) a bylo jim poprvé intratumorálně aplikováno 50 µl příslušného roztoku/myš. Shodná aplikace probíhala dále ve dnech 1, 2,...8, 9, 10,...16, 17, 18 a 24, 25, 26. Kromě velikosti nádorů měřené každý druhý den byla sledována také doba přežití po ukončení terapie.

Použitá terapeutika v jednotlivých skupinách:

- **A:** 0,2 mM laminarin-BAM + LPS (0,5 mg/ml) v PBS
- **K:** kontrolní – PBS

3.13.4. Studium léčebného účinku směsi laminarin-BAM+LPS aplikované obden na redukci nádorového růstu u SCID myši

V dalším experimentu bylo zahrnuto sedm samic SCID myši, jimž byl transplantován melanom B16-F10. Po dvanácti dnech byly myši rozřazeny do dvou skupin (A, K), přičemž skupina A čítala tři jedince, zatímco skupina K čtyři. Intratumorální aplikaci 50 µl příslušného roztoku/myš prováděné 0., 2., 4., 6., 8. a 10. den vždy předcházelo změření velikosti nádoru.

Použitá terapeutika v jednotlivých skupinách:

- **A:** 0,2 mM laminarin-BAM+LPS (0,5 mg/ml) v PBS
- **K:** kontrolní – PBS

3.13.5. Studium významu CR3 v redukci nádorového růstu u Mac-1^{-/-} myši léčených směsí laminarin-BAM+LPS aplikované každý druhý den

I tento pokus začínal transplantací 400 tis. melanomových buněk B16-F10, tentokrát ovšem každé z 11 samic myši Mac-1^{-/-}. Dvanáctý den od transplantace následovalo rozdělení do tří skupin (skupina A a K po 4 myších, skupina B po 3 myších) a zahájení léčby spočívající v šesti intratumorálně a obden aplikovaných dávkách 50 µl příslušného

roztoku/myš (tedy 0., 2., 4., 6., 8. a 10. den). Ve stejné dny byla měřena i velikost nádoru až do 14. dne. Po něm byly myši usmrceny a z vypitvaných plic se zjišťoval počet metastáz.

Použitá terapeutika v jednotlivých skupinách:

- **A:** 0,2 mM laminarin-BAM+LPS (0,5 mg/ml) v PBS
- **B:** LPS (0,5mg/ml) v PBS
- **K:** kontrolní – PBS

3.13.6. Ověření účinnosti terapie na sarkomu S-180 u BALB/c myši

Následující pokus zahrnoval 18 samic myši kmene BALB/c, jimž bylo ve stáří 8 týdnů transplantováno 400 tis. sarkomových buněk S-180. Dvanáctý den od transplantace se myši rozřadily do tří skupin po šesti myších (A, B, K). Stejný den se také započala léčba obnášející i.t. injekci 50 µl terapeutika/myš. 2., 4., 6., 8. 10. den od zahájení terapie dostaly myši další dávky léčebné látky a byla jim měřena velikost nádorů. Měření se provádělo rovněž ve 12. a 14. den, kdy došlo k usmrcení myši a vypitvání jejich plic za účelem analýzy počtu metastáz.

Použitá terapeutika v jednotlivých skupinách:

- **A:** 0,2 mM laminarin-BAM+LPS (0,5 mg/ml) v PBS
- **B:** LPS (0,5 mg/ml) v PBS
- **K:** kontrolní – PBS

3.13.7. Stanovení míry degranulace neutrofilů při interakci s melanomovými buňkami a fagocytárním ligandem pomocí MPO – zavedení a optimalizace metody

3.13.7.1. Příprava vzorků pro stanovení aktivity uvolněné MPO po inkubaci neutrofilů s nádorovými buňkami a laminarinem

Melanomové buňky B16-F10 ošetřené stejným způsobem jako pro transplantaci (viz kapitola 3.4) byly naředěny na výslednou koncentraci 500 tis. buněk/ml média s FCS. 100 µl této suspenze (50 tis. buněk) bylo napipetováno do sedmi jamek destičky s V dnem. Do třech jamek bylo přidáno 100 µl roztoku 0,2 mM laminarin-BAM + médium s FCS, zatímco k dalším třem bylo doplněno 100 µl roztoku PBS+ médium s FCS. Po třicetiminutové inkubaci (37 °C, 5% CO₂ atmosféra) byla destička po dobu dvou minut stáčena (4 °C, 424G), aby mohl být odstraněn supernatant.

Ke každé z výše zmíněných šesti jamek se přidalo 200 µl suspenze neutrofilů (1,25 mil. neutrofilů/ml média s FCS – izolace a příprava viz kapitola 3.6), přičemž k 7. jamce bylo přidáno 200 µl média s FCS. Do dosud nevyužitých dalších třech jamek bylo napipetováno po 200 µl stejné suspenze neutrofilů. Následovalo jemné rozsuspendování (pipeta se širokým otvorem) obsahu všech jamek a proběhla dvouhodinová inkubace (CO₂ termostat, 37 °C). Z každé jamky bylo odebráno a na černou destičku přeneseno 50 µl supernatantu. V dalších pěti jamkách této destičky bylo připraveno 50 µl supernatantu sonikovaných B16-F10 (1 jamka), 50 µl supernatantu sonikovaných neutrofilů (po 3 jamkách) a 50 µl MPO Assay Buffer+Master reaction Mix (1 jamka) vypovídající o intenzitě pozadí. Posledním krokem bylo samotné stanovení aktivity MPO.

3.13.7.2. Příprava vzorků pro stanovení aktivity MPO uvolněné do mezibuněčného prostoru nádorové tkáně po aplikaci kotveného laminarinu, f-MLF, LPS či jejich směsí

Supernatanty připravené pro stanovení hladiny cytokinů (viz kapitola 3.13.6) byly využity i v tomto pokusu. Kromě vzorků získaných po aplikaci laminarinu, se analyzovaly také vzorky po i.t. injekci 0,5 mM f-MLFKK-BAM a směsí 0,5mM f-MLFKK + LPS (0,5 mg/ml). Princip jejich získání byl zcela shodný jako v případě „laminarinových“ supernatantů. Stanovení aktivity MPO pak proběhlo dle přiloženého návodu.

3.13.7.3. Stanovení aktivity MPO

K zjištění enzymatické aktivity uvolněné myeloperoxidázy byla použita souprava Myeloperoxidase (MPO) Fluorometric Activity Assay Kit (Sigma Aldrich). Principem testu je schopnost MPO katalyzovat tvorbu HClO reagující s aminofenyl fluoresceinovým substrátem za vzniku fluoresceinu ($\lambda_{ex} = 485 / \lambda_{em} = 525$ nm). Test byl proveden zcela dle pokynů přiloženého návodu, k změření fluorescence poslužil přístroj Tecan (40 minut s 60s intervaly).

Aktivita MPO se spočítala dle vzorce:
$$\text{MPO aktivita} = \frac{B \times \text{diluční faktor vzorku}}{\text{reakční čas} \times V}$$

B= množství (pmol) fluoresceinu uvolněného mezi časem $T_{\text{na začátku}}$ a $T_{\text{na konci}}$
reakční čas= $T_{\text{na začátku}} - T_{\text{na konci}}$ (min)
V= objem vzorku (ml)

Výsledek je pak udáván v pmol/min/ml označovaných také jako µU/ml. Jedna jednotka (U) MPO tak odpovídá množství enzymu, které za minutu a při pokojové teplotě oxiduje MPO substrát k získání 1 µmol fluoresceinu.

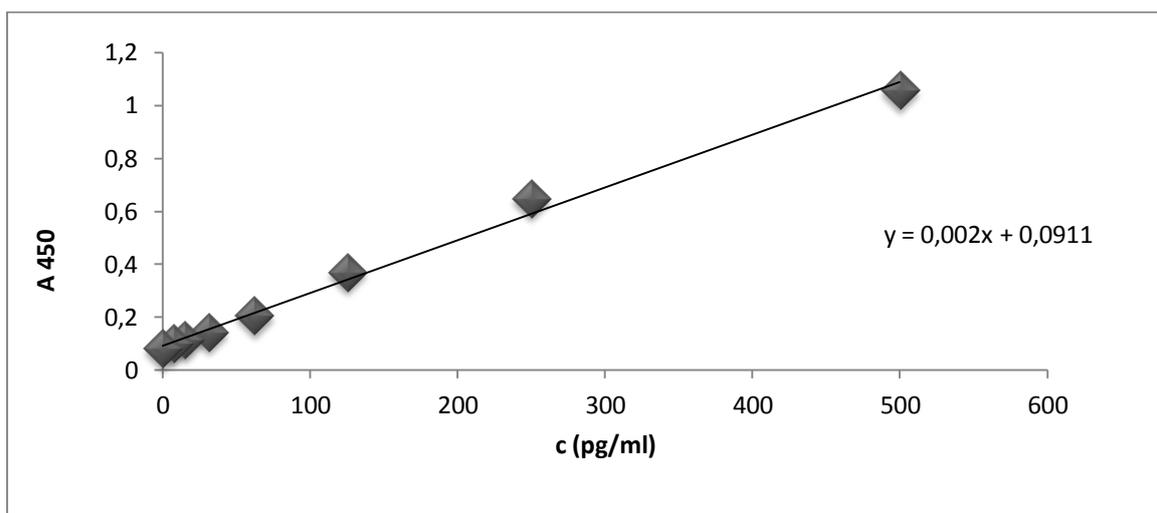
4. Výsledky

4.1. Stanovení koncentrace cytokinů v nádorové tkáni po aplikaci laminarinu-BAM, LPS a jejich směsi

Záměrem této série pokusů bylo zjistit, jak se mění hladiny jednotlivých cytokinů (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , IFN γ a TGF- β) v nádorové tkáni v závislosti na použitém terapeutiku a čase v rozmezí 0 – 48 hodin. Pro každé stanovení byla nejdříve sestrojena kalibrační přímka a z příslušné rovnice regrese vypočteny hledané koncentrace cytokinů. Ty byly později vztaženy k 1 mm³ nádorové masy.

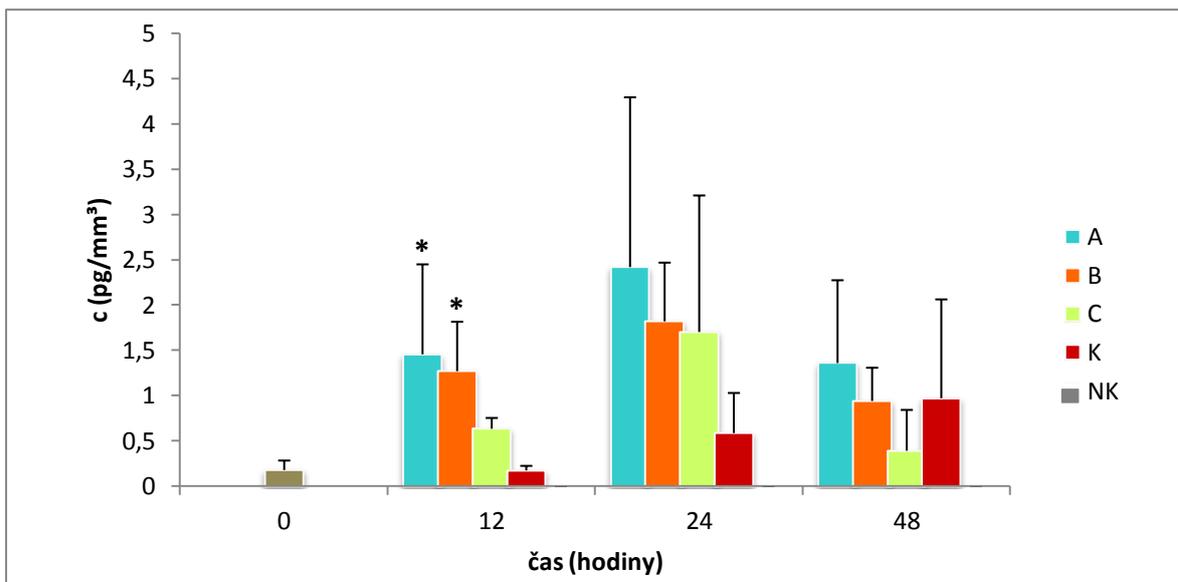
4.1.1. Interleukin-1 β

Koncentrace IL-1 β byly vypočteny pomocí rovnice regrese uvedené v grafu s kalibrační přímkou (Obr. 8).



Obr. 8: Kalibrační přímka pro stanovení IL-1 β

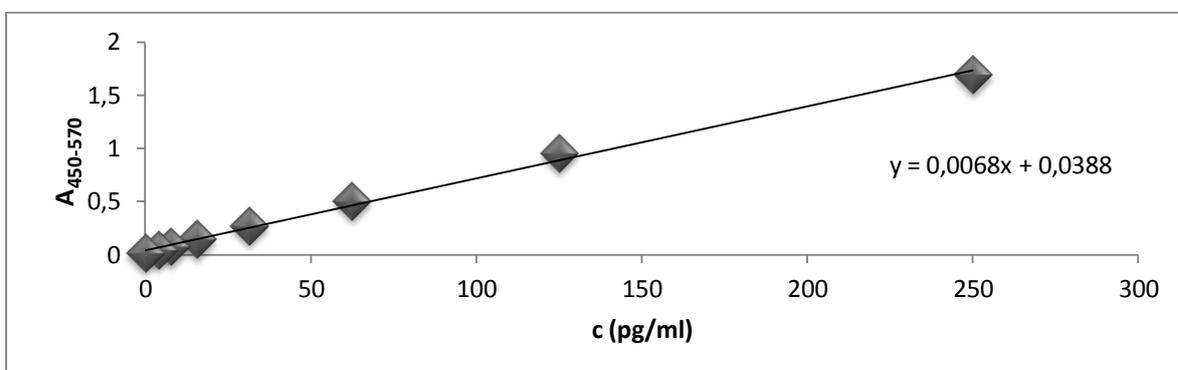
Zjištěné hladiny IL-1 β v průběhu 48 hodin od aplikace léčiva jsou uvedeny v následujícím grafu (Obr. 9). Nejvyšší koncentrace v celém časovém rozmezí dosahovala skupina A (LPS), kde byl již po 12 hodinách zaznamenán statisticky významný nárůst oproti kontrolní skupině. K výrazně vyššímu a statisticky významnému zvýšení hladiny IL-1 β došlo po 12 hodinách také u skupiny B (laminarin-BAM). Z grafu se jeví, že do 24 hodin se koncentrace u všech léčebných látek zvyšovala, poté klesala. V 48 hodině byla koncentrace IL-1 β u skupiny C (laminarin-BAM+LPS) dokonce nižší než v kontrolní skupině K.



Obr. 9: Koncentrace IL-1 β v nádorové tkáni měřená během 48 hodin od aplikace terapeutik *A* – LPS, *B* – laminarin-BAM, *C*-laminarin-BAM+LPS, *K* – kontrola, *NK*-negativní kontrola
Hladina statisticky významného rozdílu vůči kontrole: * P < 0,05

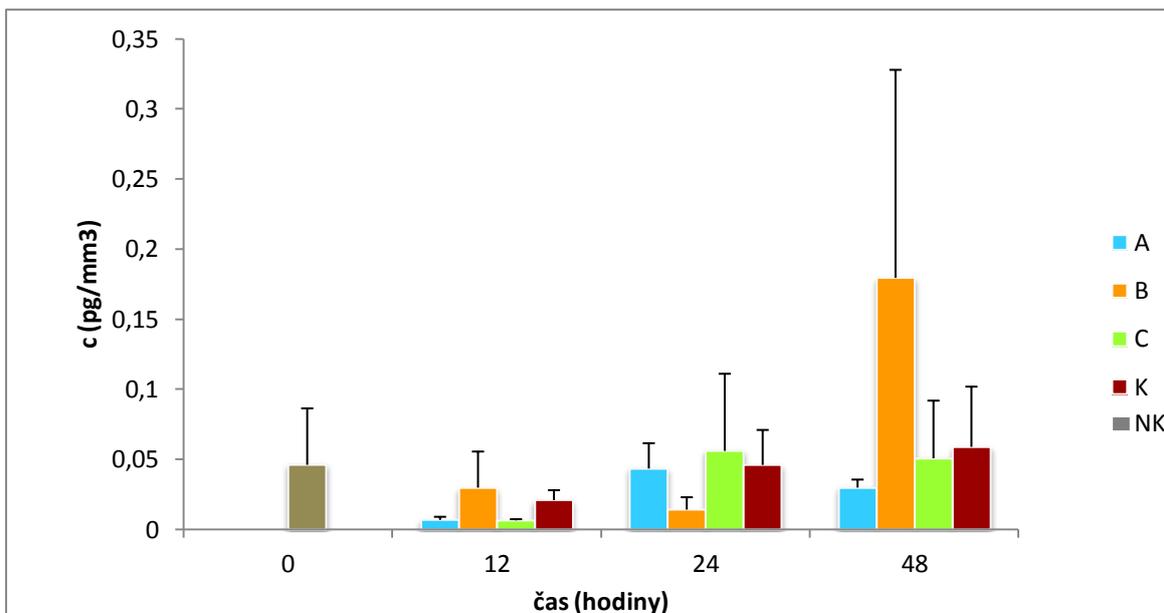
4.1.2. Interleukin 6

Koncentrace IL-6 byly vypočteny z regresní rovnice kalibrační přímky zobrazené na Obr. 10.



Obr. 10: Kalibrační přímka pro stanovení koncentrace IL-6

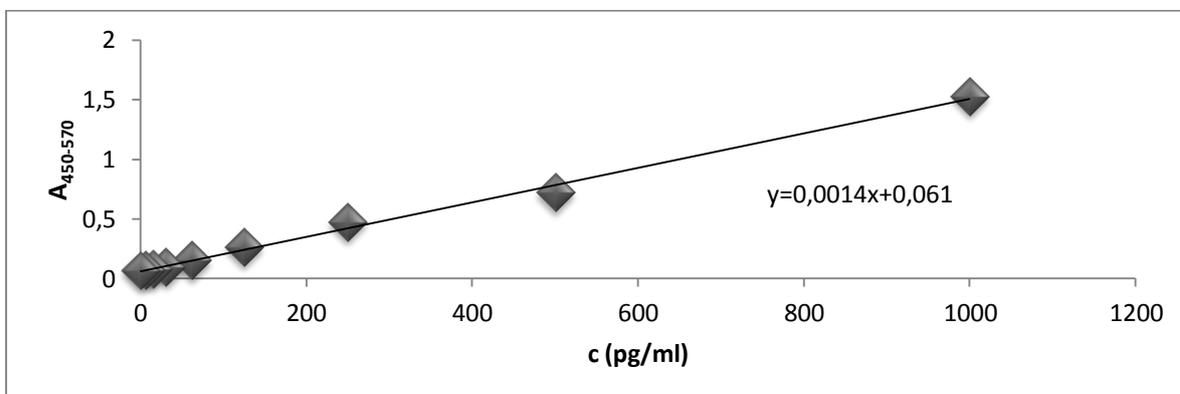
Z dalšího grafu (Obr. 11) je zřejmé, že koncentrace IL-6 nereflektovala způsob a průběh terapie, pouze u terapie laminarinem-BAM (skupina B) došlo po 48 hodinách k výraznému zvýšení jeho hladiny.



Obr. 11: Koncentrace IL-6 v nádorové tkáni měřená během 48 hodin od aplikace terapeutik *A – LPS, B – laminarin-BAM, C-laminarin-BAM+LPS, K – kontrola, NK-negativní kontrola*

4.1.3. Interleukin 8

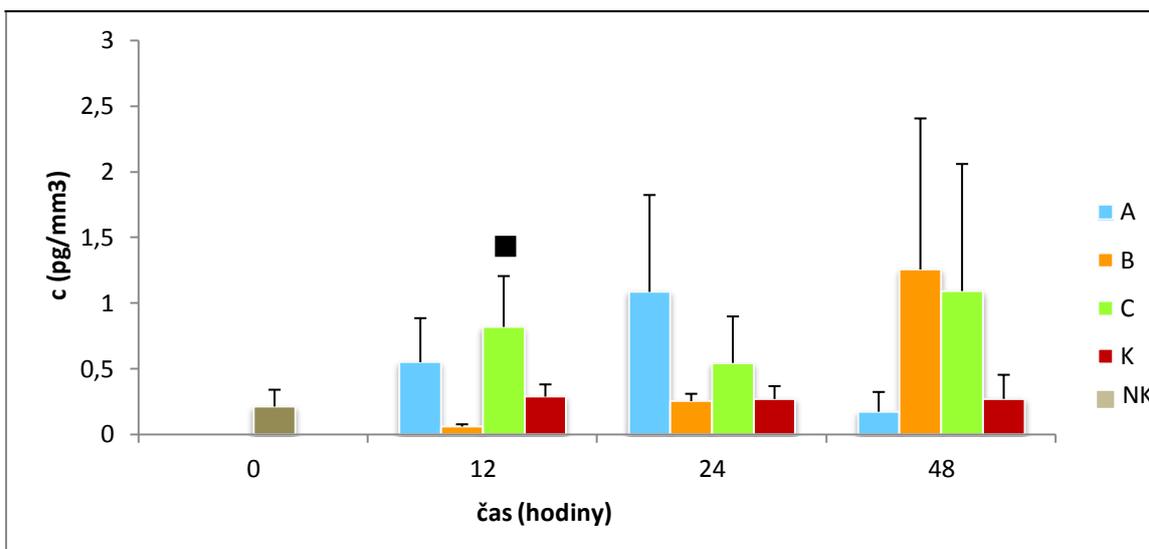
K výpočtu koncentrací IL-8 byla použita rovnice regrese uvedená v grafu s kalibrační přímkou (Obr. 12).



Obr.12 : Kalibrační přímkou pro stanovení koncentrace IL-8

Naměřené koncentrace IL-8 po 12, 24 a 48 hodinách od aplikace léčebných látek zobrazuje Obr. 13. Zatímco v kontrolní skupině K nedochází v časovém rozmezí k výraznějším změnám hladiny tohoto cytokinu, u ostatních skupin je možné pozorovat jisté výkyvy. Ve 12. a 24. hodině graf naznačuje zvýšené koncentrace u skupiny A (LPS) a C (laminarin-BAM+LPS), přičemž koncentrace IL-8 u druhé jmenované skupiny je po 12 hodinách statisticky významně vyšší než u myši léčených samotným laminarinem-BAM (skupina B).

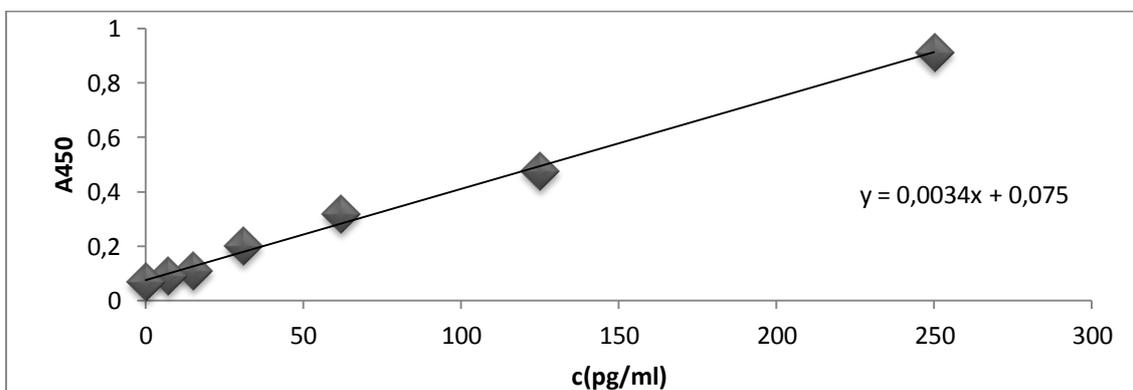
Ve 48. hodině klesá koncentrace IL-8 u skupiny A, kdežto u skupiny C oproti předchozímu měření v čase 24 hod roste téměř dvojnásobně a ve skupině B dokonce trojnásobně.



Obr. 13: Koncentrace IL-8 v nádorové tkáni měřená během 48 hodin od aplikace terapeutik *A – LPS, B – laminarin-BAM, C-laminarin-BAM+LPS, K – kontrola, NK-negativní kontrola*
Hladina statisticky významného rozdílu vůči skupině B: ■ $P < 0,05$

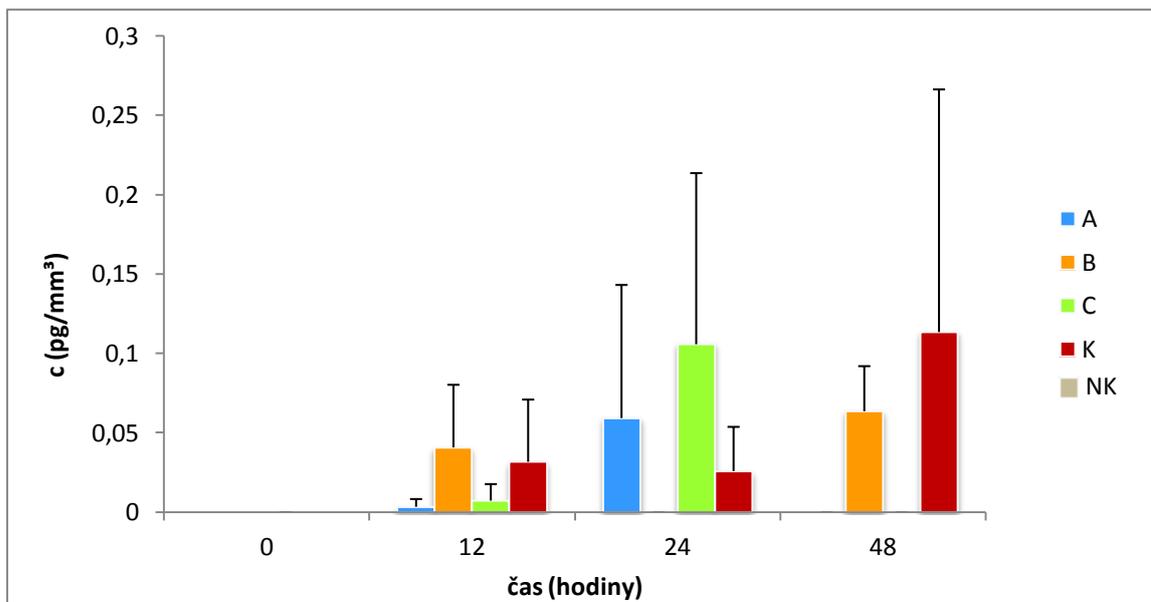
4.1.4. Tumor necrosis factor α

Také k určení koncentrace TNF- α byla nejprve sestrojena kalibrační přímka a z její rovnice regrese (Obr. 14) bylo vypočteno množství cytokinu v nádorové tkáni.



Obr.14 : Kalibrační přímka pro stanovení koncentrace TNF- α

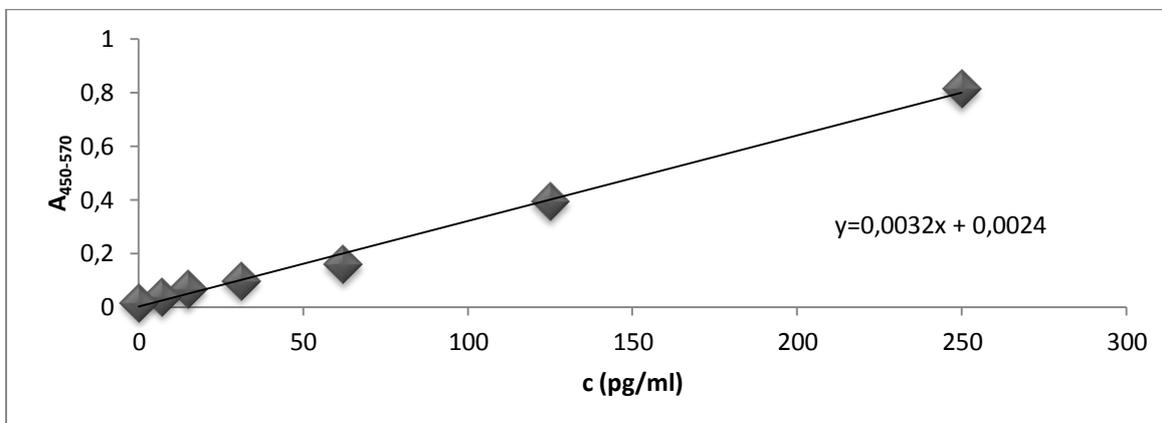
Jak ukazuje Obr. 15, v tomto pokusu byly koncentrace TNF- α velmi nízké a zjištěny na samé hranici detekčních možností soupravy. Jakékoli podrobné hodnocení je tak vyloučeno.



Obr. 15: Koncentrace TNF- α v nádorové tkáni měřená během 48 hodin od aplikace terapeutik *A – LPS, B – laminarin-BAM, C-laminarin-BAM+LPS, K – kontrola, NK-negativní kontrola*

4.1.5. Interferon γ

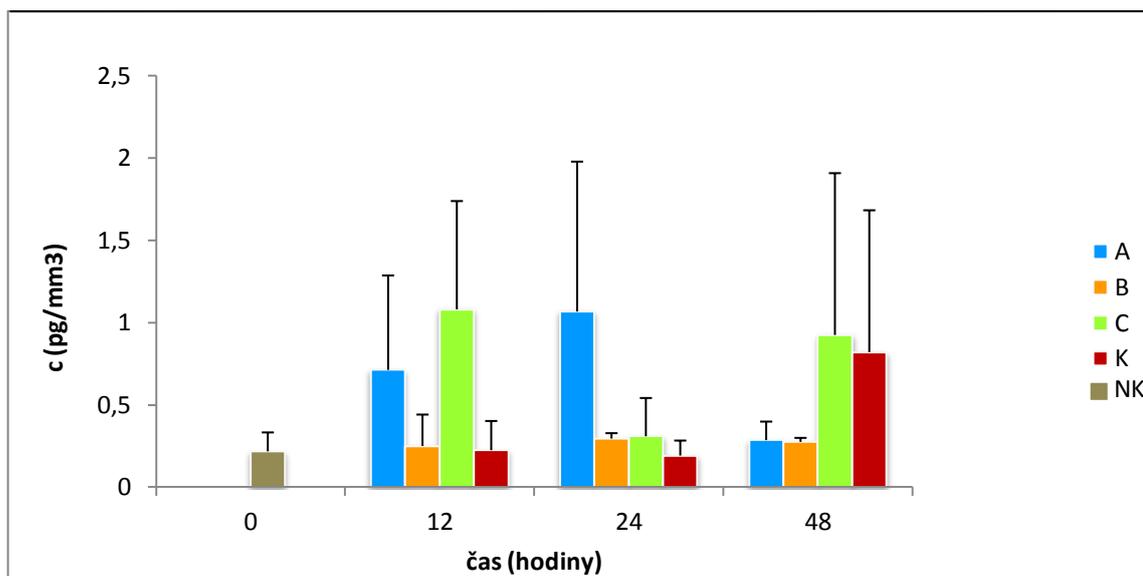
Na níže uvedeném grafu (Obr. 16) je znázorněna kalibrační přímka s regresní rovnicí, která byla použita pro výpočet koncentrace IFN γ .



Obr. 16 : Kalibrační přímka pro stanovení koncentrace IFN- γ

Z grafu (Obr. 17) s výslednými koncentracemi INF- γ naměřenými během 48 hodin od aplikace terapeutika se zdá, že na jejich zvýšení měla vliv léčba samotným LPS (skupina A), zejména po 12 a 24 hodinách, a laminarinem-BAM+LPS (skupina C) po 12 hodinách. U této skupiny dochází během 24. hodiny k poklesu hladiny INF- γ , ovšem po dalších 24 hodinách hladina opět vzrůstá na hodnotu blízkou kontrolní skupině K. Ve skupině A (LPS) v tento čas koncentrace IFN- γ klesá zhruba na polovinu své předchozí hodnoty. Hodnoty u skupiny

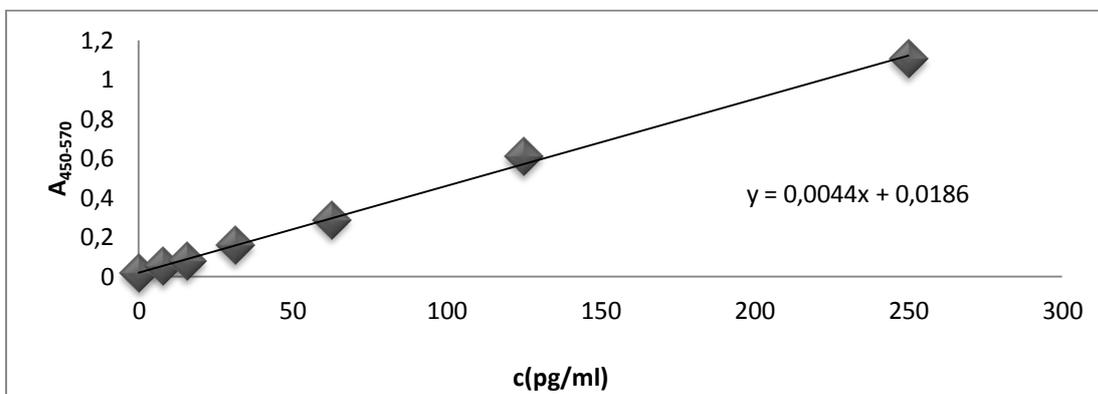
B (laminarin-BAM) pak zůstávají po 12 a 24 hodinách zhruba stejné a na úrovni kontrolní skupiny, avšak narozdíl od skupiny K se v 48. hodině nezvyšují.



Obr. 17: Koncentrace IFN- γ v nádorové tkáni měřená během 48 hodin od aplikace terapeutik *A* – LPS, *B* – laminarin-BAM, *C*-laminarin-BAM+LPS, *K* – kontrola, *NK*-negativní kontrola

4.1.6. Transforming growth factor β

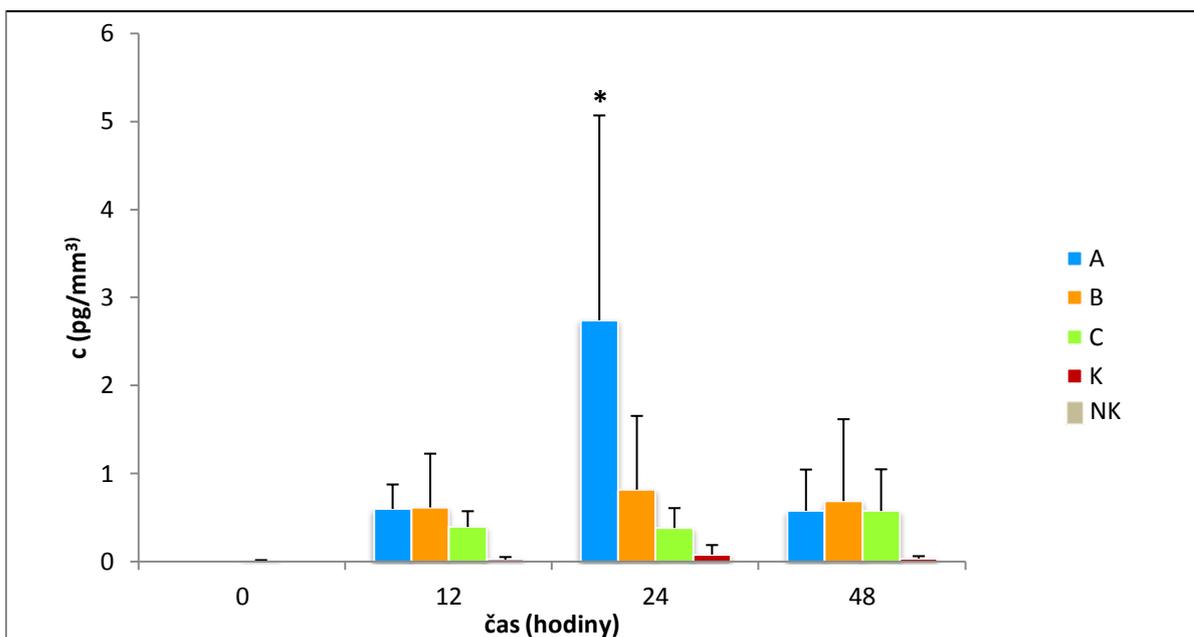
Poslední ze série kalibračních přímek nutných pro stanovení hladiny cytokinů v nádorové tkáni je zobrazena i s rovnicí regrese na Obr. 18. Podle ní byla počítána koncentrace TGF- β .



Obr. 18: Kalibrační přímka pro stanovení koncentrace TGF- β

Hladiny TGF- β zjištěné během 48 hodin od aplikace léčebných látek jsou znázorněny na Obr. 19. Nejpatrnější a statisticky významný nárůst koncentrace tohoto cytokinu nastal v 24. hodině po aplikaci LPS (skupina A). Zvýšené hodnoty oproti kontrole (skupina K) byly rovněž zaznamenány jak u samotného kotveného laminarinu (skupina B), tak i směsi obou

předešlých látek (skupina C). Kromě výkyvu u skupiny A (LPS) v 24. hodině dosahovaly koncentrace ve všech časech měření a u všech léčebných skupin podobných hodnot.

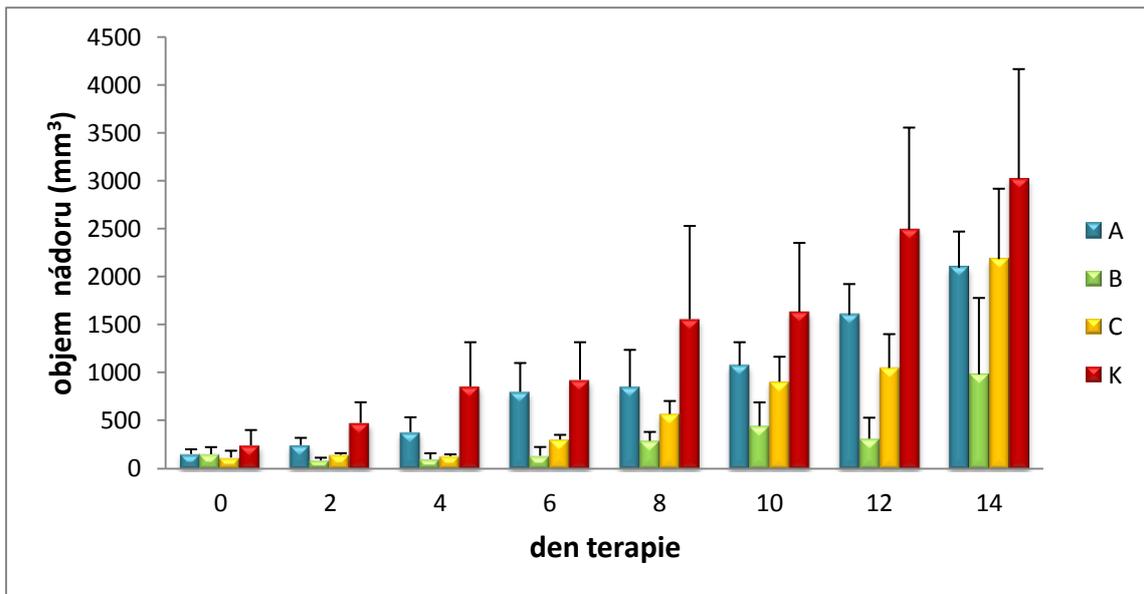


Obr. 19: Koncentrace TGF- β v nádorové tkáni měřená během 48 hodin od aplikace terapeutik **A** – LPS, **B** – laminarin-BAM, **C**-laminarin-BAM+LPS, **K** – kontrola, **NK**-negativní kontrola
Hladina statisticky významného rozdílu vůči kontrole: * $P < 0,05$

4.2. Studium vlivu kotvení f-MLF a synergie s LPS na redukci růstu nádoru u SCID myší

Cílem tohoto pokusu bylo zjistit účinnost a rozdíly v působení kotveného f-MLF, LPS a jejich směsi v případě, kdy jedincům chybí efekторы adaptivní části imunitního systému. Ověřoval se tak předpokládaný zásadní vliv vrozené imunity.

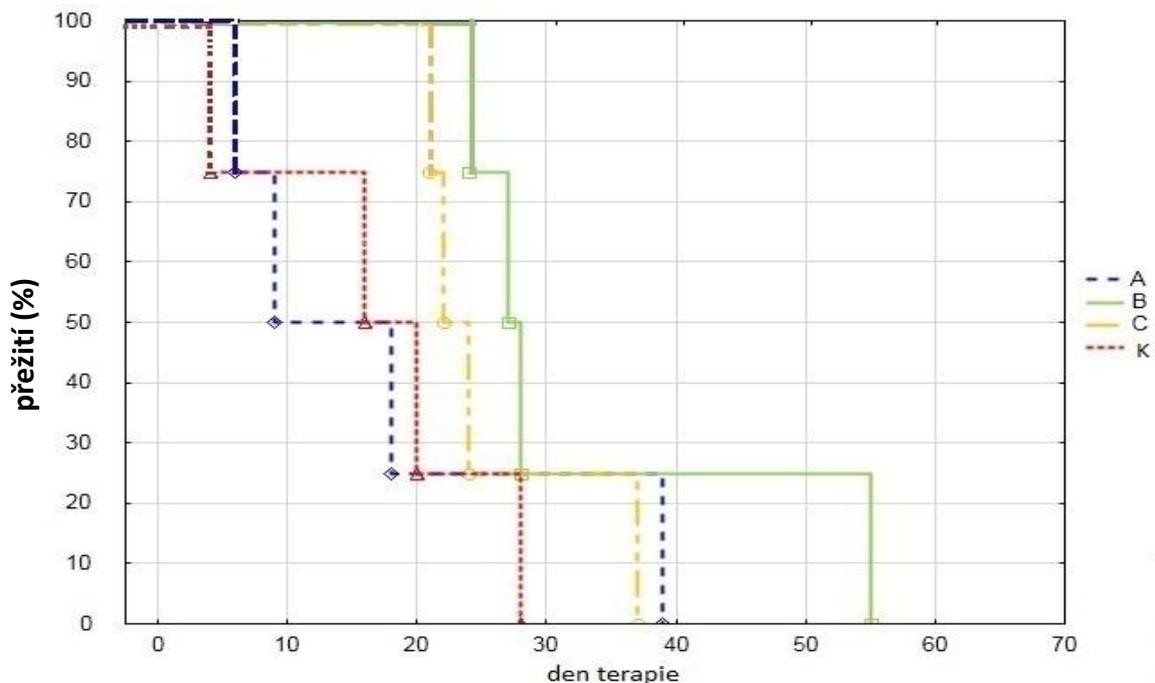
Z výsledného grafu (Obr. 20) vyplývá, že směs f-MLF a LPS (skupina C) vykazuje (stejně jako u imunokompetentních myší) nejvýraznější terapeutické účinky. Oproti samotnému f-MLFG₆K-DOPE (skupina A; 37,6 %) a samotnému LPS (skupina C; 59,3 %) byla u směsi f-MLFG₆K-DOPE s LPS (skupina C) zaznamenána průměrně 80,7% redukce nádorového růstu.



Obr. 20: Vliv terapie na velikost nádorů u SCID myši

A - *f-MLFG₆K-DOPE*, **B** - *f-MLFG₆K-DOPE + LPS*, **C** - *LPS*, **K** - kontrola *PBS*

Další graf (Obr. 21) zachycuje dobu přežití jednotlivých skupin. Myši léčené LPS (skupina C) přežily průměrně 26 dnů, myši, jimž byla aplikována směs LPS s *f-MLFG₆K-DOPE* (skupina B) žily průměrně 33,5 dne, což bylo téměř dvakrát déle než u kontrolní skupiny K (s průměrnou dobou přežití 17 dnů) a skupiny A léčených samotným *f-MLFG₆K-DOPE* (18 dnů). Tento rozdíl však nebyl statisticky významný.



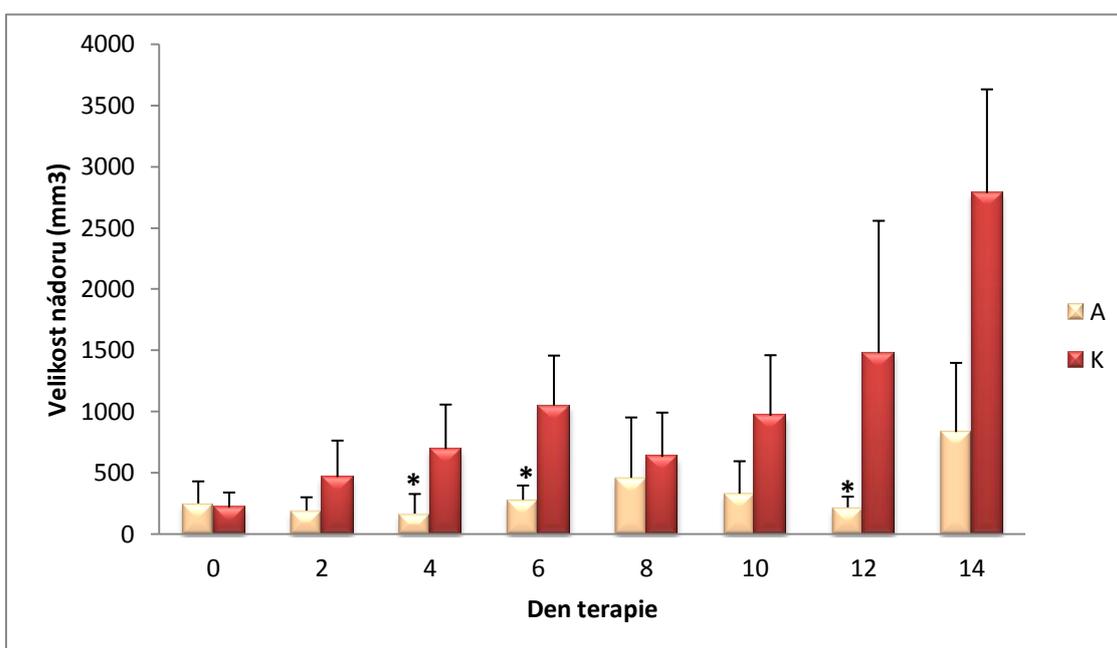
Obr. 21: Vliv terapie na dobu přežívání SCID myši

A - *f-MLFG₆K-DOPE*, **B** - *f-MLFG₆K-DOPE + LPS*, **C** - *LPS*, **K** - kontrola *PBS*

4.3. Studium léčebného účinku směsi laminarin-BAM+LPS aplikované pulzně na redukci nádorového růstu u SCID myši

I v tomto pokusu byly sledovány léčebné účinky terapeutika u myši s defektem specifické imunity a ověřovala se důležitost nescifické části imunitního systému. Terapeutikem byla směs laminarin-BAM + LPS (skupina A) porovnávaná s kontrolní skupinou (skupina K).

U myši skupiny A je z grafu (Obr. 22) zřejmá výrazná redukce (průměrně 65,3 %) nádorového růstu. Čtvrtý, šestý a dvanáctý den léčby tato redukce dosáhla statistické významnosti.

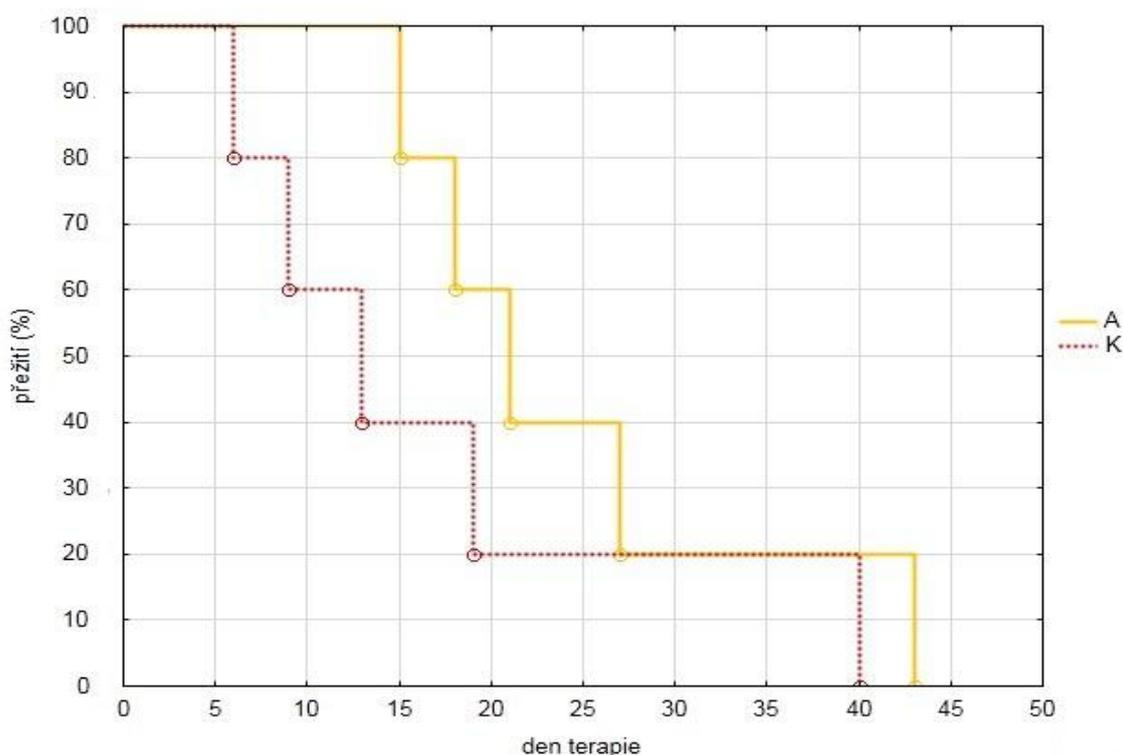


Obr. 22: Vliv pulzní terapie na velikost nádorů u SCID myši

A - laminarin-BAM + LPS, K – kontrola, PBS

Hladina statisticky významného rozdílu vůči kontrole: * P< 0,05

Obr. 23 vypovídá o dobách přežití obou skupin. Ač myši léčené terapeutickou směsí (skupina A) přežívaly delší dobu (24,8 dne x 17,4 dne), statisticky významného rozdílu vůči kontrole (skupina K) nebylo dosaženo.



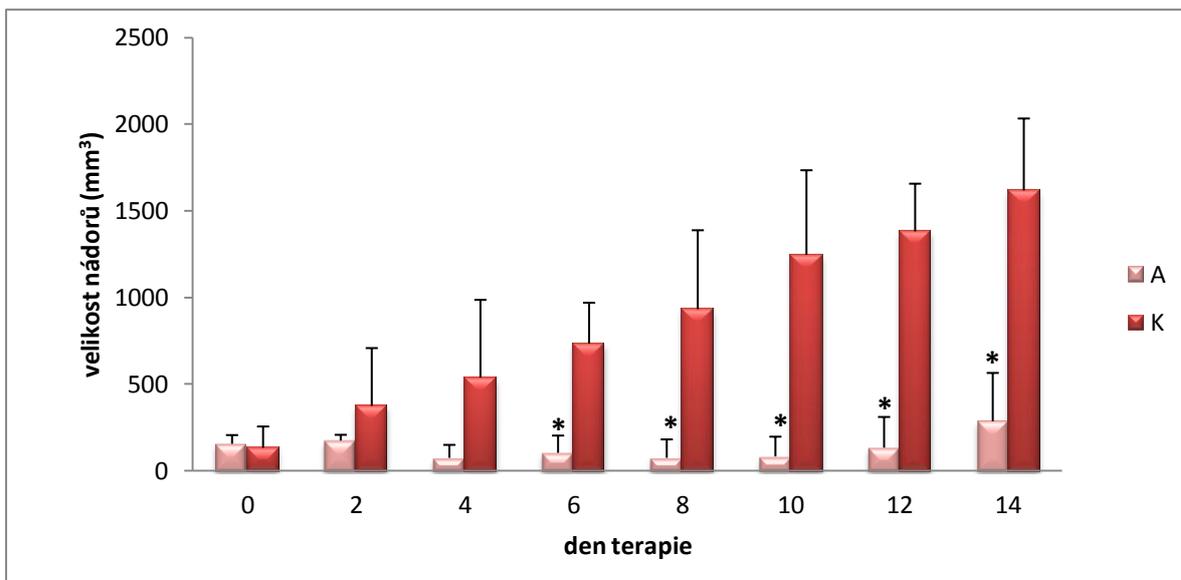
Obr. 23: Vliv terapie na dobu přežívání SCID myší

A – laminarin-BAM + LPS, **K** – kontrola, PBS

4.4. Studium léčebného účinku směsi laminarin-BAM+LPS aplikované obden na redukci nádorového růstu u SCID myší

Náplní dalšího experimentu bylo opět ověřit terapeutický účinek směsi kotveného laminarinu s LPS u myší s těžkou kombinovanou imunodeficiencí (SCID, skupina A) porovnáním s kontrolními myšmi, jimž byl aplikován pufrovaný fyziologický roztok (PBS, skupina K). Navíc bylo zjišťováno, zda se výsledky při aplikaci léčiva každý druhý den budou lišit od výsledků pulzní terapie užití v předchozím pokusu.

Následující graf (Obr. 24) jasně prokazuje snížení velikosti nádorů u myší v léčené skupině, a to průměrně o 83,3 % oproti kontrolní skupině. Od šestého do čtrnáctého dne je tato redukce statisticky významná.



Obr. 24: Vliv terapie na velikost nádorů u SCID myši aplikované obden

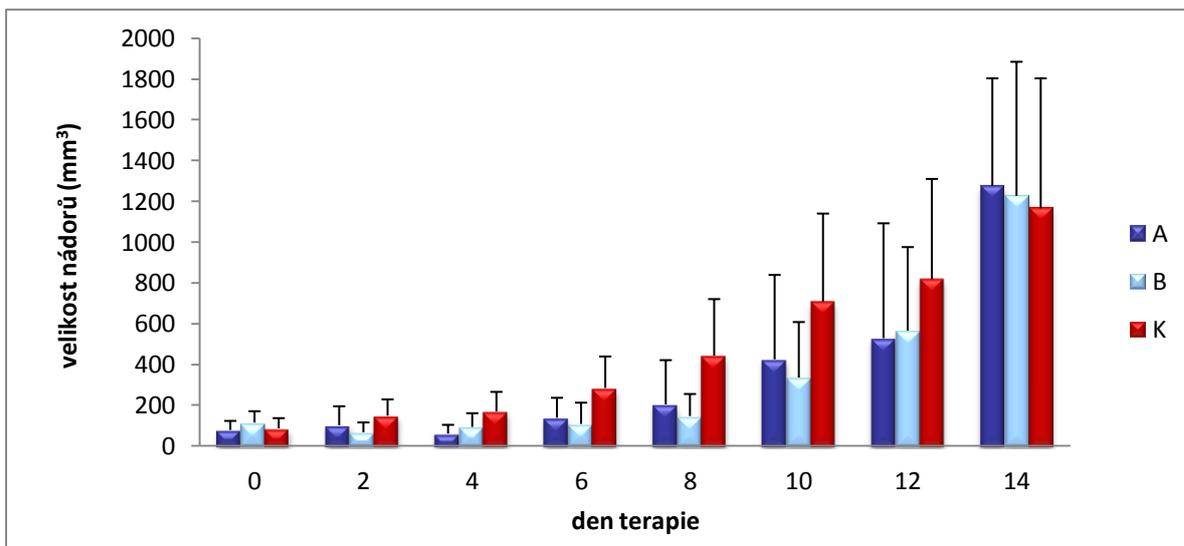
A - laminarin-BAM + LPS, K – kontrola, PBS

Hladina statisticky významného rozdílu vůči kontrole: * $P < 0,05$

Dále byl v tomto pokusu sledován výskyt a intenzita metastázování. Plicní metastázy se vyskytly u 66,6 % myši v kontrolní skupině K, s intenzitou 2 metastázy na myš. Myši léčené laminarinem-BAM + LPS (skupina A) byly bez nálezu.

4.5. Studium významu CR3 v redukci nádorového růstu u *Mac-1*^{-/-} myši léčených směsí laminarin-BAM+LPS aplikované každý druhý den

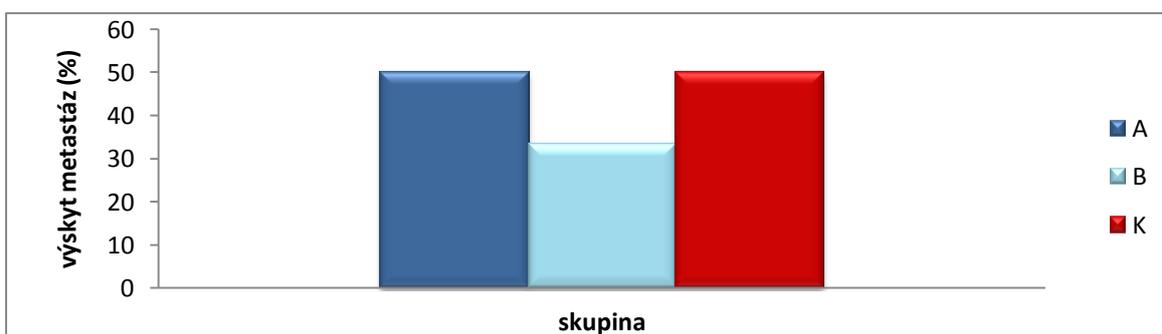
Čtvrtý pokus byl prováděn za účelem objasnění mechanismů vrozené imunity, konkrétně uplatnění komplementového receptoru 3 v redukci nádorového růstu při léčbě směsí laminarinu-BAM+LPS. Myším s poruchou exprese CR3 byla obden aplikováno terapeutikum (skupina A), LPS (skupina B) a PBS (skupina K). Výsledná průměrná redukce byla vyšší u skupiny B (43,5 %) než u skupiny A (37,9 %). U ani jedné ze skupin však nedošlo ke statisticky významnému zmenšení nádorů. Detailní údaje jsou zobrazeny na následujícím grafu (Obr. 25).



Obr. 25: Vliv terapie na velikost nádorů u $Mac-1^{-/-}$ myši

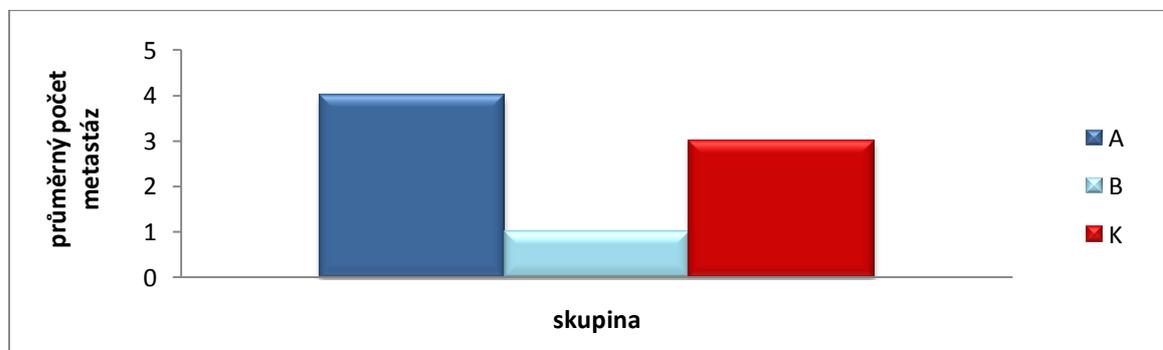
A - laminarin-BAM + LPS, B- LPS, K – kontrola, PBS

Stejně jako v předešlém pokusu se po ukončení experimentu sledoval výskyt metastáz. Níže uvedené grafy dokládají procentuální zastoupení metastáz u jednotlivých skupin myši (Obr. 26) a průměrný počet metastáz u myši, kde se metastázy objevily (Obr. 27).



Obr. 26: Procentuální zastoupení výskytu metastáz u $Mac-1^{-/-}$ myši

A - laminarin-BAM + LPS, B- LPS, K – kontrola, PBS

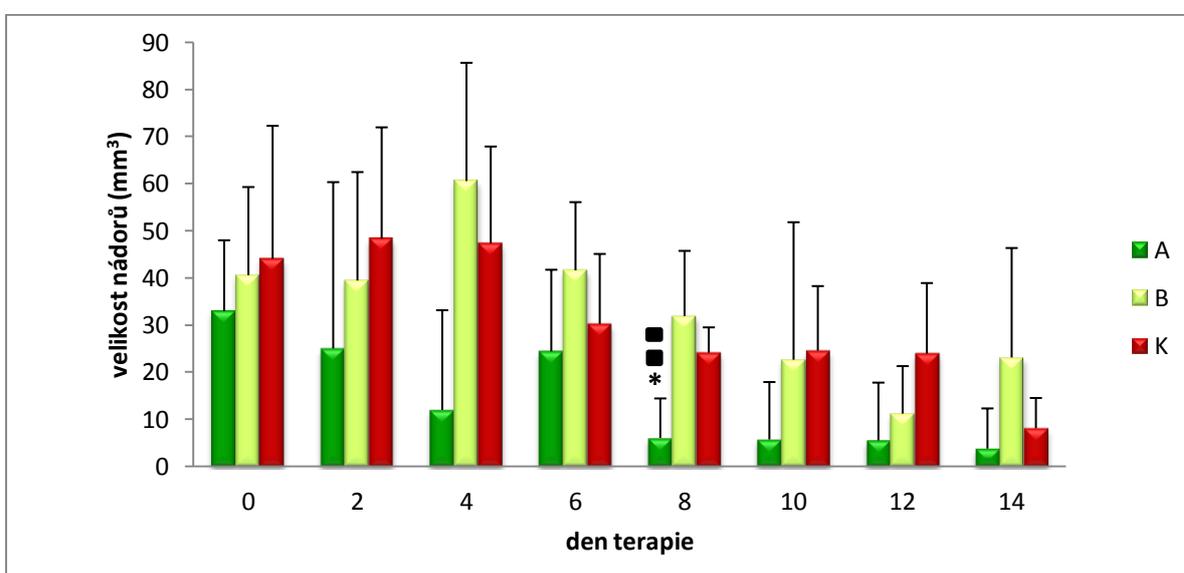


Obr. 27: Průměrný počet metastáz zjištěný u $Mac-1^{-/-}$ myši s detekovanými metastázami

A - laminarin-BAM + LPS, B- LPS, K - kontrola

4.6. Ověření účinnosti terapie na sarkomu S-180 u BALB/c myši

Poslední ze série *in vivo* pokusů měl za cíl ověřit účinnost léčby i u jiného nádoru než námi dosud používaného melanomu. Myším BALB/c tak byl transplantován sarkom S-180, který je rovněž poměrně agresivní, může však u něj docházet k spontánní regresi (tak jako u kontrolní skupiny K). Příslušný graf (Obr. 28) zachycuje redukci nádorové masy u myši léčených laminarin-BAM+LPS (skupina A), která byla osmý den terapie statisticky významná jak vůči kontrolní skupině (skupina K), tak i myším, jimž bylo aplikované samotné LPS (skupina B).



Obr. 28: Vliv terapie na sarkom S-180 u BALB/c myši

A - laminarin-BAM + LPS, B- LPS, K – kontrola, PBS

Hladina statisticky významného rozdílu vůči skupině K: * P < 0,05

Hladina statisticky významného rozdílu vůči skupině B: ■■ P < 0,01

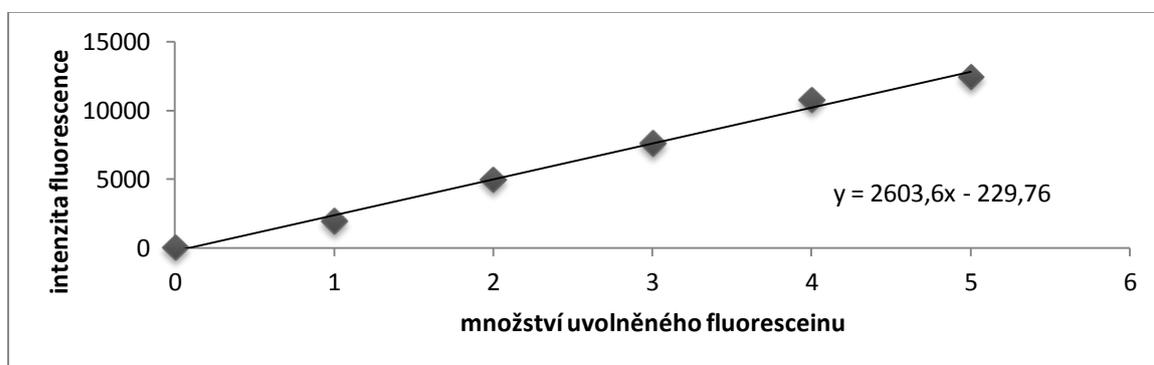
4.7. Stanovení míry degranulace neutrofilů při interakci s melanomovými buňkami a fagocytárním ligandem pomocí MPO – zavedení a optimalizace metody

Záměrem následujících dvou pokusů bylo zjistit, zda při interakci PMN s melanomovými buňkami dochází k degranulaci či exocytóze primárních granul za účelem zničení nádorových buněk. Jako ukazatel tohoto procesu byla vybrána myeloperoxidáza uvolněná do extracelulárního prostředí, jejíž množství se v obou experimentech stanovovalo.

4.7.1. Zavedení metody stanovení množství uvolněné MPO indikující interakci neutrofilů s melanomovými buňkami a laminarinem-BAM *in vitro*

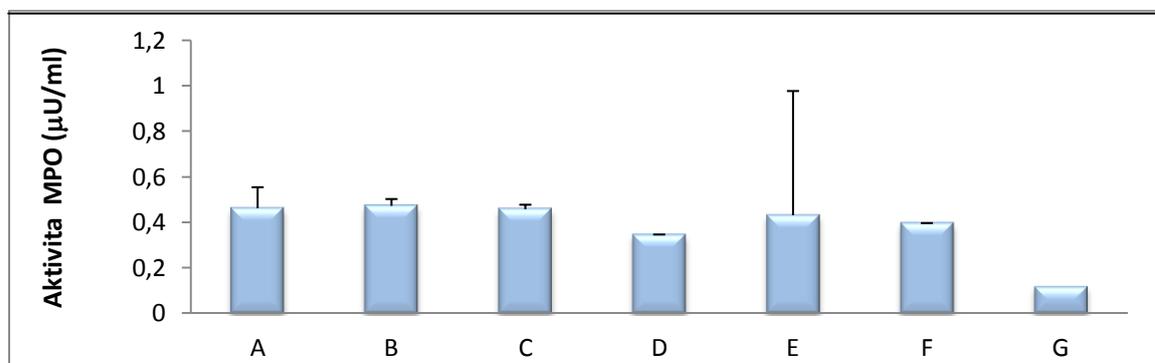
Jak již bylo zmíněno, v tomto pokusu bylo cílem ověřit (pomocí detekce uvolněné MPO) možnou degranulaci a exocytózu azurofilních granul při *in vitro* kontaktu neutrofilů s nádorovými buňkami B16-F10, které ne/měly na svůj povrch kotvený laminarin. Sledovalo se také množství MPO uvolněné samotnými ne/sonikovanými nádorovými buňkami, a samotnými ne/sonikovanými neutrofilů.

Výpočtu množství enzymové aktivity opět předcházelo sestrojení kalibrační přímky (Obr. 29) vypovídající o množství uvolněného fluoresceinu.



Obr. 29: Kalibrační přímka pro stanovení uvolněné MPO v *in vitro* pokusu

Výsledky pokusu jsou zobrazeny v grafu (Obr. 30). V případě prvních třech skupin (A – neutrofilů + nádorové buňky s laminarinem-BAM, B – neutrofilů + nádorové buňky, C samotné nádorové buňky) se uvolnilo takřka stejné množství MPO, zbylé tři skupiny (D – samotné neutrofilů, E – sonikované nádorové buňky, F – sonikované neutrofilů) vykazovaly hodnoty o něco nižší, přičemž nejmenší množství resp. množství enzymatické aktivity MPO bylo zaznamenáno u samotných neutrofilů (D).



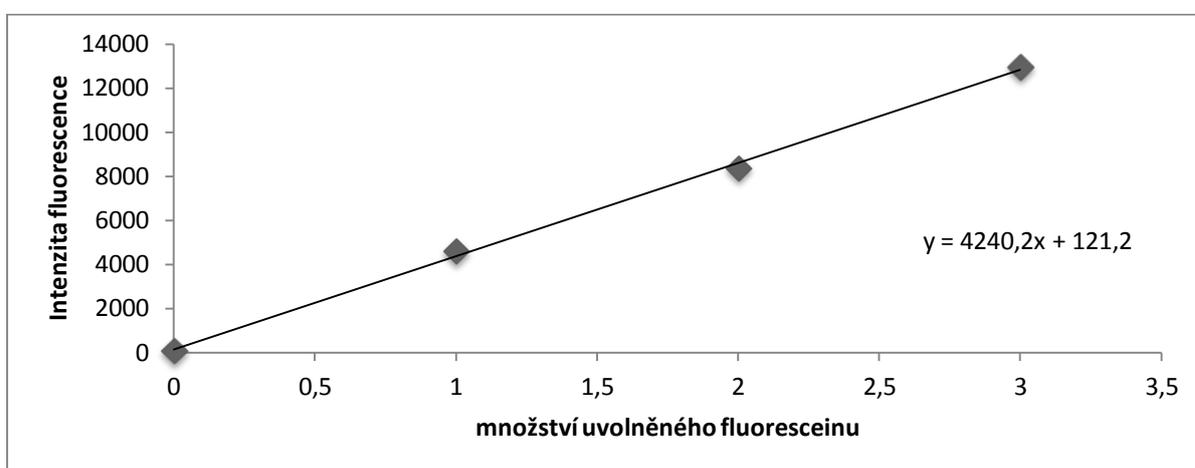
Obr. 30: Množství enzymové aktivity MPO zjištěné při interakci neutrofilů s melanomovými buňkami a laminarinem-BAM *in vitro*

A-neutrofily+nádorové buňky s laminarinem-BAM, B- neutrofily+ nádorové buňky, C- samotné nádorové buňky, D-samotné neutrofily, E- sonikované nádorové buňky, F- sonikované neutrofily, G- kontrola-pufr+master mix

4.7.2. Zavedení metody a stanovení aktivity MPO uvolněné do mezibuněčného prostoru nádorové tkáně po aplikaci kotveného laminarinu, f-MLF, LPS či jejich směsí

V závěrečném experimentu bylo zjišťováno, zda dochází k uvolňování MPO do extracelulárního prostoru nádorové tkáně během 48 hodin od aplikace laminarinu-BAM, f-MLF-BAM, LPS či jejich směsí.

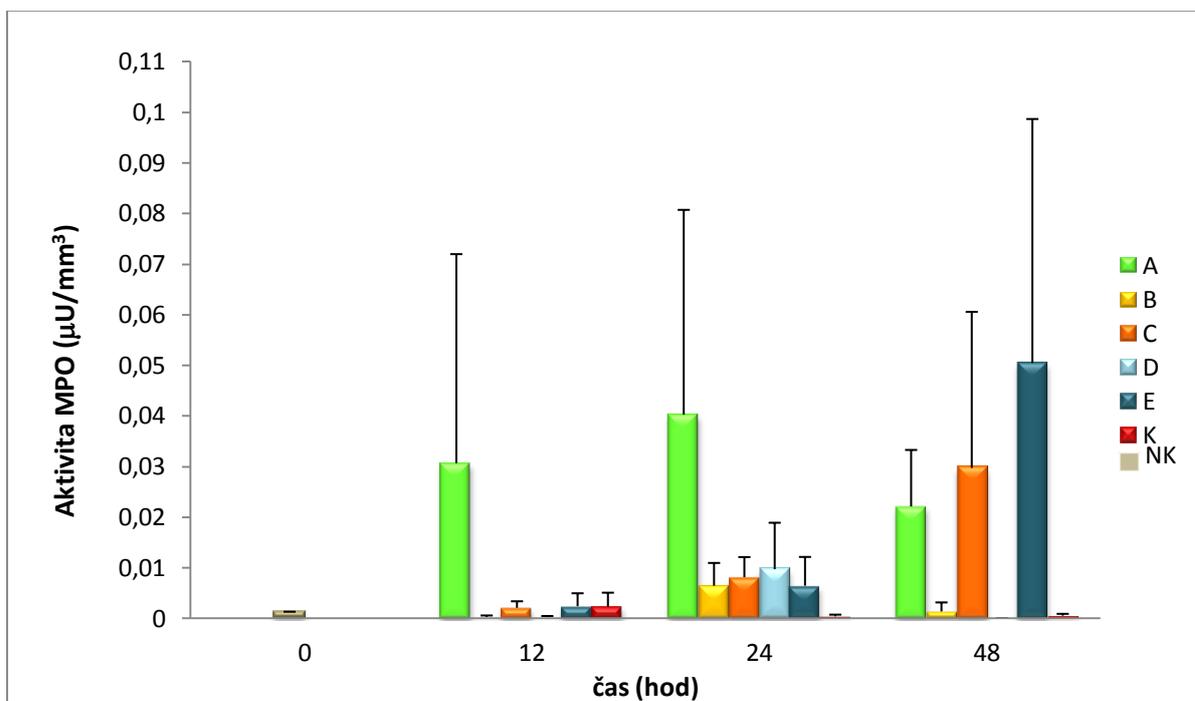
Kalibrační přímka s regresní rovnice, podle níž byly provedeny další výpočty, je uvedena na Obr. 31.



Obr. 31: Kalibrační přímka pro stanovení MPO uvolněné do extracelulárního prostoru nádorové tkáně

Z grafu (Obr. 32) zachycujícího výsledky měření MPO uvolněné v nádorové tkáni po 12, 24 a 48 hodinách od aplikace terapeutik vyplývá, že samotné LPS (skupina A) je velmi silným stimulantem exocytózy primárních granul, a to ve všech časech měření, přičemž nejvyšší množství enzymatické aktivity MPO bylo zjištěno v čase 24. hod. Podobný charakter dynamiky degranulace byl zaznamenán také u skupin léčených samotným f-MLF-BAM (skupina B) a laminarinem BAM (skupina D) ovšem s daleko nižšími hodnotami aktivity uvolněné MPO. U skupin léčených směsí kotveného fagocytárního ligandu a LPS (f-MLF - skupina C; laminarin - skupina E) bylo nejvyšší množství MPO zaznamenáno ve 48. hodině, kdy u obou skupin došlo k několikanásobnému zvýšení oproti hodnotám v čase 24 hod (skupina C téměř 4x, skupina E víc než 8x). Zajímavé je také srovnání s kontrolou. Ve 12. hodině od aplikace terapeutik se léčebné skupiny svými výslednými hodnotami

(s výjimkou skupiny A) od kontrolní skupiny K příliš nelišily, po dalších 12 hodinách bylo zvýšení aktivity MPO u všech terapeutických skupin v porovnání s kontrolou minimálně 16násobné. Po 48 hod od aplikace samotných kotvených fagocytárních ligandů dochází opět ke snížení enzymatické aktivity MPO zhruba na úroveň kontroly, zatímco skupiny obsahující LPS jsou cca 40x, 60x a 100x vyšší.



Obr. 32: Množství enzymové aktivity MPO uvolněné do extracelulárního prostředí nádorové tkáně během 48 hod od aplikace terapeutik

A - LPS, **B** - *f*-MLF-BAM, **C** - *f*-MLF-BAM + LPS, **D** - laminarin-BAM, **E** - laminarin-BAM + LPS, **K** - PBS, kontrola, **NK** - negativní kontrola

5. Diskuze

Výzkum v rámci této diplomové práce byl prováděn s cílem přispět k objasnění mechanismů imunitní odpovědi, jež se uplatňují při léčbě rakoviny kotvením ligandů fagocytárních receptorů na povrch nádorových buněk.

Vzhledem k předpokladu, že je tato terapie založena na využití mechanismů nespecifické části imunitního systému a spočívá v cíleném vyvolání zánětlivých pochodů nasměrovaných proti nádorovým buňkám, byly nejprve sledovány hladiny cytokinů souvisejících se zánětem.

Účelem experimentů s imunodeficientními myšmi bylo potvrdit (vyvrátit) určité mechanismy, o nichž předpokládáme, že se podílí na dobrých výsledcích léčby. Hlavním smyslem pokusů, kde se používaly SCID myši, tak bylo potvrzení klíčové role vrozené imunity. Experimenty s myšmi s knockoutovaným genem pro CR3 vypovídaly o důležitosti tohoto receptoru v léčbě rakoviny laminarinem-BAM.

Léčba sarkomu na myších BABL/c nás měla ujistit o tom, že tato terapie má obecnější účinnost a funguje také na jiných typech rakoviny, než je melanom.

Cílem poslední série pokusů s myeloperoxidázou bylo poodhalit způsob, jakým neutrofilny destruuji buňky melanomu.

Stanovení hladin cytokinů v nádorovém mikroprostředí. Z široké rodiny těchto důležitých modifikátorů imunitní odpovědi byl výzkum zaměřen na ty, u kterých byla prokázána úzká souvislost se zánětem. Náš zájem se proto soustředil na tzv. prozánětlivé cytokiny – IL-1 β , IL-6, IL-8, IFN- γ , TNF α a protizánětlivé cytokiny v práci reprezentované pouze TGF- β .

Hlavním cílem tohoto výzkumu bylo zjistit, jestli se způsob terapie odráží v koncentracích prozánětlivých cytokinů, a podložit tak předpokládanou účast zánětlivých procesů na mohutné synergii LPS (signálního ligandu) a laminarinu-BAM (fagocytárního ligandu) vedoucí k významné redukci nádorového bujení pozorované v dřívějších *in vivo* pokusech (Auerová, 2012; Švecová, 2013; Janotová a kol., 2014). Výsledné koncentrace jsou velmi nízké, pohybující se na hranici detekovatelnosti, přesto z nich lze vyvodit závěr, že se zmiňovaná synergie na úrovni hladin cytokinů IL-1 β , IL-6, IL-8, IFN- γ a TNF- α neprojevuje. Ke stejnému poznatku dospěla i kolegyně Waldmannová zkoumající

terapeutický účinek směsi manan-BAM + LPS (Waldmannová, 2014) a Vácová se směsí f-MLF-BAM + LPS (Vácová, 2013).

V pokusech Janotové a kol. (2014) byl analyzován buněčný infiltrát po aplikaci stejných terapeutických látek, jaké byly použity i v případě stanovení cytokinů. Nejvyšší počet granulocytů se objevil ve skupině léčené LPS, přičemž největší množství buněk se vyskytlo po 24 hodinách (Janotová a kol, 2014). Dynamika produkce cytokinů u skupiny s použitým LPS zpravidla kopíruje tento trend a hladiny cytokinů dosahují vrcholu také v čase 24 hod. Lze tak předpokládat, že zvýšená produkce je dána zvýšeným výskytem leukocytů. Vliv endotoxinu na indukci exprese TNF- α , IL-1, IL-6 či IL-8 související s aktivací TLR zejména u monocytů a makrofágů je dále zaznamenán např. v práci Guhy a Mackmana (2001). Změnami hladin prozánětlivých cytokinů po intraperitoneální aplikaci LPS myším se zabýval také Bobrowski a kol., 2005. Ti pozorovali pozitivní rozdíl v expresi IL-6, IL-10, IFN γ a TNF α již po 2 hodinách, IL-1 β pak po 24 hod (Bobrowski a kol., 2005).

V souladu s prací Janotové a kol., (2014) se rovněž domníváme, že za vyvoláním zánětu a zánětlivé infiltrace je zodpovědný pouze LPS, neboť přidané ligandy fagocytárních receptorů nevyvolávají synergické zesílení produkce prozánětlivých cytokinů. Synergii protinádorového účinku LPS a zmíněných ligandů si vysvětlujeme tak, že LPS vyvolá mohutnou infiltraci buněk nespecifické imunity (primárně neutrofilů) a agonisti fagocytárních receptorů ukotvené na nádorových buňkách pak nasměrují atak leukocytů na nádorové buňky.

V negativních kontrolách (intaktní nádory) i v kontrolách (injikace PBS) jsme detekovali určité hladiny studovaných cytokinů. Ty mohou být jak důsledkem působení přirozeného nádorového infiltrátu reagujícího na uvolňované DAMPs (dané nádorovou invazivitou, případně vpichem), tak i možnou vlastní imunologickou aktivitou nádorových buněk.

Ve svém článku Lázár-Molnárová a kol. (2000) uvádí, že buňky maligního melanomu mohou samy nebo společně s buňkami okolní zdravé tkáně produkovat cytokiny IL-1 β , IL-6, IL-8 a TGF- β . Produkce IL-1 β nádorovými buňkami se může zdát pro tumor kontraproduktivní vzhledem k prokázaným antiproliferativním účinkům např. na melanomovou linii A375 (Lachman a kol., 1986). Naneštěstí endogenní produkce IL-1 bývá spjata s vznikem rezistence a nádor ji využívá k zesílení exprese IL-6.

Také působení tohoto cytokinu má na melanomy různé vlivy (Lázár-Molnár a kol., 2000). Zatímco exogenní IL-6 produkovaný fibroblasty má na melanomové buňky v raných stádiích

inhibiční efekt (Oh a kol., 1997), u pokročilejších stádií (s metastázemi) vzniká rovněž rezistence a u poloviny zkoumaných melanomů je IL-6 konstitutivně produkován a uvolňován do média (Sun a kol., 1992; Lázár-Molnár a kol., 2000).

Obdobně se v melanomových nádorech projevuje i TGF- β . Ten parakrinně down-reguluje proliferaci normálních melanocytů, buňky pokročilých stádií melanomu se však stávají rezistentní a většina jich tento cytokin sama produkuje jako autokrinní stimulátor (Vetterlein a kol., 1995). Kromě toho tlumí imunitní odpověď, navozuje angiogenezi, snižuje expresi MHC II antigenů v melanomu a mnohé další (Czarniecki a kol., 1988; Albino a kol., 1991).

Lázár-Molnárová a kol. (2000) došli k závěru, že melanomové buňky neprodukují IFN- γ , cytokin hojně využívaný v léčbě melanomových lézí. V této práci byla nízká hladina tohoto cytokinu detekována, jeho původ však nebyl určen, nelze tedy tvrzení citované práce potvrdit ani vyvrátit.

Velmi zajímavá je pak studie Gota a kol. (2008), která odhalila silnou expresi TLR3 a TLR4 na povrchu lidských melanomových buněk (další receptory z rodiny Toll-like jsou rovněž exprimovány, ovšem s nižší frekvencí). Tento fakt je vedl k předpokladu, že do procesu uvolňování cytokinů by po stimulaci příslušnými ligandy mohly být zapojeny přímo nádorové buňky. Hypotézu potvrdily výsledky, kdy se produkce IL-6 stimulovaná LPS zvýšila až 4x a dvojnásobně vzrostla v případě IL-1 a TNF- α . Jejich výzkum také naznačuje, že ligace TLR2, TLR3 a TLR4 může navodit vznik metastáz (Goto a kol., 2008). V případě, že by se Toll-like receptory vyskytovaly i na povrchu myšního melanomu B16-F10, zjištěná zvýšená produkce cytokinů po aplikaci LPS či směsi obsahující LPS by se dala vysvětlit nejen aktivací přítomných leukocytů, ale také stimulací samotných melanomových buněk.

Nasadě je otázka, proč byla detekována zvýšená hladina cytokinů TNF- α , IL-6 a IL-8 i v případě aplikace agonisty fagocytárních receptorů. Nejpatrnější nárůst cytokinů byl zaznamenán po 48 hodinách od aplikace laminarinu-BAM. Vysvětlením by mohla být přítomnost makrofágů, pro které je charakteristická lokalizace v místě zánětu právě v tomto čase (Eming a kol., 2007). Ljungmanův tým (1998) publikoval, že po expozici β -glukanů myším monocytům/makrofágům dochází k produkci prozánětlivých cytokinů jako jsou IL-1 β , TNF- α či IL-6 (Ljungman a kol., 1998). První dva jmenované pak mohou působit jako stimuly k produkci IL-8 (Kunkel a kol., 1991).

Jako jediný protizánětlivý cytokin byl vybrán TGF- β , jenž je produkován rozsáhlou skupinou buněk včetně těch maligních (Vetterlein a kol., 1995). Z výsledků bylo patrné, že koncentrace u všech léčebných skupin byly vyšší než u kontrol. Statisticky významného

rozdílu oproti kontrole bylo dosaženo po 24 hodinách u skupiny, kde bylo myším aplikováno LPS. Vzhledem k faktům, že a) aktivita TGF- β může být vyvolána přítomností ROS v okolí buněk (Barcellos-Hoff a Dix, 2013) b) LPS může být stimulem pro oxidativní vzplanutí neutrofilů (Remer a kol., 2003) c) je v tomto čase nejvyšší počet granulocytů v nádorovém infiltrátu (Janotová a kol., 2014), není těžké toto pozorování zdůvodnit.

Pokusy na SCID myších. První z těchto experimentů byl koncipován stejně jako mnoho pokusů provedených v dřívější době na imunokompetentních myších. Srovnávala se účinnost samotného kotveného agonisty fagocytárního receptoru (f-MLFG₆K-DOPE), agonisty TLR-4 (LPS) a jejich směsi. Výchozím předpokladem bylo, že terapeutický účinek je zajištěn prostřednictvím buněk vrozené imunity, tudíž by léčba měla být funkční i u SCID myši postrádajících specifickou část imunitního systému.

Dosažené výsledky jasně prokázaly, že léčebný postup funguje i u myších s defektem adaptivní části imunitního systému. Pokud se zaměříme na srovnání terapeutických látek, jsou výsledky velmi podobné situaci, jakou s těmito terapiemi zaznamenal Pačes (2013) na melanomech imunokompetentních myši kmene C57BL/6N. Největší míra redukce byla zjištěna u skupiny léčené směsí obou látek, čímž byla i v tomto případě potvrzena synergie dosažená aktivací fagocytárních receptorů (ligandy vázanými na povrchu patogenů) a signálních PRR (rozpuštěnými signálními PAMPs) pozorovaná Underhillem a Gantnerem (2004). Na rozdíl od Pačesova experimentu, kde účinek směsi LPS a fagocytárního ligandu byl statisticky významný (Pačes, 2013), redukce u SCID myši statistického významu nedosáhla. Možný důvod tkví ve srovnávání různých kmenů myši (C.B17/Icr-scid x C57/BL6N), ovšem další sledování, kdy se melanom u imunodeficientních myši projevoval výrazně agresivněji (2x rychlejší růst nádorů, kratší doba přežívání), spíše poukazuje na určitou pomocnou (byť ne klíčovou) roli specifické imunity spoluúčastníci se na redukci rakovinného bujení.

V dalších pokusech byla aplikována směs LPS a laminarinu-BAM v pulzním režimu a režimu obden. To umožnilo porovnání vlivu různých režimů na velikost nádorů. V obou případech použití směsi laminarin-BAM + LPS se ověřil základní předpoklad nezávislosti terapie na specifické imunitě – léčba fungovala a dosažené redukce velikosti nádorů byly přechodně statisticky významné (ve 3 dnech u pulzního režimu, v 5 dnech u aplikace obden).

Porovnání léčebných harmonogramů laminarinu-BAM přineslo poněkud překvapivé zjištění, že výhodnější (83,3% x 65,3% průměrná redukce) je terapie s režimem aplikace obden (den 0,2,4,6,8,10,12). To je v rozporu s výsledky diplomové práce Švecové (2013), která coby nejúčinnější aplikační schéma léčebné směsi laminarin-BAM a LPS u myších

C57BL/6N s plně vyvinutou imunitou stanovila dlouhodobý čtyřpulzní režim (ve dnech 0,1,2,... 8,9,10...16,17,18,...24,25,26). Jako možné vysvětlení bylo uvedeno navození tzv. „endotoxinové tolerance“ při opakované aktivaci TLR-4 a dalších receptorů nízkými dávkami LPS pozorované Greismanem a kol. již v roce 1975 (Švecová, 2013). Vzhledem k obdobným závěrům Waldmannové (2014), jež hovoří u myši SCID v případě léčby mananem či zymosanem také ve prospěch aplikace obden, se zdá, že výsledky této práce nejsou jen jednorázovou anomálií. Lze tak dovozovat, že u imunodeficientních myši opakovaná aplikace lipopolysacharidu nevede k downregulaci prozánětlivých procesů.

V případě pulzní terapie nás po jejím ukončení zajímala doba přežití léčených myši. Ač byla průměrně o týden delší než u myši kontrolní skupiny (24,8 dne x 17,4 dne), statistického významu nebylo dosaženo. Porovnáním s dobou přežití imunokompetentních myši kmene C57BL/6N po aplikaci stejné látky ve stejném režimu kolegyní Švecovou (2013) bylo zjištěno, že doba přežití myši SCID je výrazně kratší (24,8 x 47 dní; Švecová, 2013). To odpovídá našemu výše uvedenému poznatku, že terapie založená na synergii LPS s kotveným ligandem fagocytárních receptorů (laminarin-BAM) sice u SCID myši funguje, ale je méně efektivní, neboť zde chybí určitý supresivní účinek, který specifická imunita na nádorový růst nepochybně má.

Pokus na Mac-1^{-/-} myších. Ze získaných výsledků tohoto experimentu vyplývá, že naše léčba směsí laminarin-BAM + LPS nebyla u myši postrádající komplementový receptor 3 (Mac-1, CR3) účinná ve stejné intenzitě, jakou pozorujeme u zdravých myši. Toto zjištění bylo poněkud překvapivé, neboť jsme vycházeli z prací Browna (2006) a Taylora a kol. (2006), kteří uvádí jako nejdůležitější receptor pro beta glukany dektin-1. Předpokládali jsme tedy, že nepřítomnost CR3 nebude mít na průběh léčby vliv.

Vysvětlení pozorovaného jevu mohou být dvě. První spočívá v již zmiňované obecně nižší účinnosti léčby u imunodeficientních myši, k níž dochází i přesto, že se deficiencie týká jiných mechanismů, než na kterých je terapie ligandy založena (viz získaná imunita u SCID myši). Je pravděpodobné, že u myši kromě naší cílené léčby působí více protinádorových mechanismů, jejichž nepřítomnost způsobuje rychlejší růst, vyšší agresivitu a nižší efekty terapie, než na jaké jsme zvyklí. Nádory jsou přirozeně atakovány protilátkami, dochází k následné aktivaci komplementu a komplementové opsonizaci fragmenty iC3b, které umožňují CR3 podmíněný atak. Ten zde chybí.

Druhou možností je (spolu)účast CR3 na účincích léčby. Mac-1 je povrchový receptor fagocytů a NK buněk, jehož ligace vede k cytotoxické odpovědi či fagocytóze a degranulaci

(Větvička a kol., 1999). Kromě endogenních látek (jako je iC3b či ICAM-1) je také schopen vázat širokou paletu dalších molekul, mezi něž patří LPS i β -glukany (Ehlers, 2000). Kromě fagocytózy opsonizovaných částic/mikrobů byly popsány i případy, kdy pomocí CR3 došlo k fagocytóze neopsonizovaných patogenů (Le Cabec a kol., 2002). Větvička a kol. (1996) se ve své studii zabýval spuštěním na CR3 závislé cytotoxicity NK buněk vůči iC3b opsonizovaným nádorovým buňkám. Zjistil, že k jejímu vyvolání (stejně jako u fagocytózy makrofágů a neutrofilů) je kromě opsonizace (k níž v mikroprostředí nádoru poměrně běžně dochází, Větvička a kol., 1999) nutná také přítomnost β -(1,3)-glukanových polysacharidů napodobující tak přítomnost patogenu. V této práci Větvička a kol. dále popisuje účast beta glukanových fragmentů (Mw 20 000) na aktivaci CR3 (vazbou na lektinovou doménu). Je možné, že laminarin (Mw 6007) vyvolává stejnou reakci a fagocytóza je spouštěna kromě dektinu-1 také přes CR3. Jestliže bychom tedy připustili spoluúčast CR3 na laminarin-BAM iniciovaném ataku nádorových buněk, pak by jejich vyřazení u Mac-1 $-/-$ myši muselo vést ke snížení účinku této terapie. První či druhé vysvětlení je však nutné prokázat.

Pokus na BALB/c myších. Cíl ověřit univerzálnost našeho léčebného postupu byl tímto experimentem na modelu BALB/c – sarkom S-180 splněn. Z grafu s průměrnými objemy nádorů zejména u kontrolní skupiny je patrné, že během pokusu došlo k (pro tento druh rakovinných buněk charakteristické) spontánní regresi, kterou popsal již Jones a kol. (1939). I přes tento děj se průměrná velikost nádorů u myši léčených směsí laminarin-BAM + LPS držela stále na nižší úrovni a osmý den bylo dosaženo přechodné, statisticky významné redukce jak v porovnání s kontrolou, tak i se skupinou, kde bylo aplikováno samotné LPS. Terapii tak lze považovat za funkční i na jiném typu nádorového bujení.

Stanovení myeloperoxidázy. Vzhledem k velmi rychle nastupujícím účinkům léčby bylo možné předpokládat, že efektoři naší protinádorové odpovědi jsou hlavně neutrofilů, které se do místa zánětu dostávají jako první, hodiny před monocyty a lymfocyty (Witko-Sarsat a kol., 2000). Tento názor podpořila analýza nádorového infiltrátu (Janotová a kol., 2014). S ohledem na velikost melanomových buněk ($\approx 10\text{--}15\ \mu\text{m}$ v průměru; Sharma a kol., 1996) a obdobnou či menší velikost neutrofilů jsme se domnívali, že hlavním mechanismem destrukce nádorových buněk není pouze fagocytóza, ale dochází také k extracelulárnímu zabíjení. V odborné literatuře lze dohledat reporty o cytotoxicitě neutrofilů a nescifické lyze nádorových buněk pomocí ROS (Zivkovic a kol., 2007). Práce Di Carlové a kol. (2001)

rovněž hovoří o silné roli ROS, proteáz, látek perforujících membránu a cytokinů (TNF- α , IL-1 β a IFN) produkovaných neutrofilů a ničící tumorová ložiska. Článek Clarka a Klebanoffa (1975) nás taktéž inspiroval k zaměření pozornosti na peroxidázový systém a MPO uvolňované do extracelulárního prostředí nádoru.

Na tomto místě je třeba zmínit, že oba následující pokusy byly pouze pilotními pracemi v oblasti stanovení myeloperoxidázy potažmo degranulace neutrofilů a měly napomoci k zavedení a optimalizaci této metody, v níž budou pravděpodobně pokračovat kolegyně ve svých dalších pracích.

V prvním z experimentů bylo sledováno, zda *in vitro* inkubace neutrofilů s nádorovými buňkami, na něž byl ukotven laminarin, spolu s LPS podnítl uvolnění MPO. Naměřené hodnoty jednotlivých skupin se však téměř nelišily. Totéž se stalo i v případě stejného pokusu s odlišným ligandem kolegyně Waldmannové (2014). Absence zvýšené hladiny MPO ve skupinách se sonikovanými neutrofilů, nás vede k domněnce, že pro tento pokus není vhodné používat neutrofilů izolované z peritoneální dutiny za pomoci thioglykolátového média. To podle Itoua a kol. (2006) může neutrofilů aktivovat a další postup přípravy fagocytů nevyklučuje uvolnění granul dříve, než se buňky použijí v samotném pokusu. Další experimenty tak budou prováděny s neutrofilů izolovanými z kostní dřeně (Ženka, ústní sdělení).

Závěrečný pokus spočíval ve stanovení MPO uvolněné do mezibuněčného prostředí nádorové tkáně v časech 12, 24 a 48 hod od aplikace kotveného ligandu (laminarinu či f-MLF), LPS nebo jejich směsi. Jeho smyslem bylo objasnit vliv těchto látek na degranulaci neutrofilů. Zvýšené hladiny MPO vykazovala již od 12. hodiny skupina, již bylo aplikováno LPS. To je ve shodě s publikacemi, které LPS považují za přímé (Weiss a Evanson, 2002) či nepřímé (Gill a kol., 1998) stimulanty neutrofilní degranulace. Za povšimnutí ovšem stojí skutečnost, že u skupin léčených LPS v kombinaci s fagocytárními ligandy nedochází k nárůstu sledovaných hodnot. Po dalších 12 hodinách zůstává enzymatická aktivita MPO těchto skupin stále nižší než u skupiny, kde bylo aplikováno samotné LPS. Zvrat nastává v čase 48 hod, kdy množství uvolněné myeloperoxidázy po aplikaci směsi laminarin-BAM + LPS či f-MFL-BAM + LPS prudce stoupá.

Vysvětlení tohoto jevu nám nabídl Klebanoff (2005), jenž pozoroval, že pokud neutrofil adhezuje na objekt, který nelze fagocytovat, dochází k jeho přilnutí a roztáhnutí se po povrchu patogenu/buňky. Mezi neutrofilem a cílovým objektem tak vzniká izolovaný

prostor, do kterého uniká MPO. Stejně tak je stimulována produkce H_2O_2 a vzniklá cytotoxicita odpovídá prostředí intracelulárního fagosomu (Klebanoff, 2005). Domníváme se proto, že ukotvené fagocytární ligandy umožňují zmiňovanou adhezi k povrchu buňky (např. přes CR3 receptor) a v raných časech MPO nemůže být detekována, neboť se uvolňuje do prostoru ohraničeného neutrofilem a melanomovou buňkou. Po 48 hodinách dochází k destrukci buněk a myeloperoxidáza proniká i do okolního prostředí. Podobné výsledky s mananem-BAM + LPS získala i Waldmannová (2014).

Vzhledem k nižší až mizivé míře degranulace pozorované u skupin s aplikací kotvených fagocytárních ligandů bez LPS lze předpokládat, že pozorovaná synergie v redukci nádorového růstu by mohla být dána právě stylem a mírou degranulace. Zatímco LPS pouze vyvolá silnou buněčnou infiltraci a stimuluje neutrofile k uvolnění obsahu svých granul, teprve spolupůsobení s agonisty fagocytárních receptorů umožní účinný cytotoxický efekt v místech, kde je to třeba – tedy na povrchu nádorové buňky.

Studium mechanismů vrozené imunity vedoucí k redukci nádorového růstu po aplikaci ligandů fagocytárních a signálních receptorů, které bylo hlavní náplní této práce, přineslo kromě získaných odpovědí také nemálo nových otázek, pro něž nám momentálně chybí vysvětlení. Jejich nalezení bude cílem dalšího výzkumu.

6. Souhrn

- Byly stanoveny hladiny cytokinů IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , INF- γ a TGF- β v průběhu terapie melanomu B16-F10 pomocí kotveného laminarinu, LPS a jejich kombinace. Z výsledků vyplývá, že pozorovaná silná protinádorová synergie signálních a fagocytárních ligandů se neprojevuje v synergii produkce cytokinů, ale je zřejmě dána kombinací buněčné infiltrace (účinek LPS) a zacílení fagocytů na nádorové buňky (účinek kotveného laminarinu).
- Experimentem na SCID myších byl ověřen předpoklad, že používaná terapie melanomu B16-F10 je skutečně založena na mechanismech a buňkách vrozené imunity.
- Z porovnání účinnosti aplikace kotveného laminarinu + LPS obden s pulsním režimem léčby u SCID myší se jeví jako efektivnější aplikace obden.
- Pokusem na Mac-1^{-/-} myších bylo zjištěno, že pro dosažení účinné redukce nádorového růstu při terapii laminarinem kotveným pomocí BAM ve spojení s LPS, je důležitá exprese komplementového receptoru 3.
- Úspěšná terapie směsí laminarin-BAM + LPS sarkomu S180 transplantovaného BALB/c myším prokázala použitelnost léčby i na jiném typu nádoru, než je melanom.
- Experimenty, v nichž se stanovovala uvolněná myeloperoxidáza, odhalily, že a) pro *in vitro* pokus není vhodné používat neutrofilů izolované z peritoneální dutiny pomocí thioglykolátového média, b) druh a míra degranulace neutrofilů (uvolnění MPO) by mohly být podstatou pozorované synergie agonistů fagocytárních receptorů a LPS v protinádorovém účinku.

7. Seznam zkratek

ADCC *antibody -dependent cell -mediated cytotoxicity*; druh imunitní reakce, kdy leukocyty lyzují patogen pomocí protilátek navázaných na jeho povrch

APC *antigen presenting cell*; buňky předkládající antigen

BAM *biocompatible anchor for cell membrane*; kotvidlo do biomenbrány

CCL *chemokine C-C motive ligand*; strukturální typ chemokinů s 2 sousedními cysteiny

CD *cluster of differentiation*; označení povrchových molekul leukocytů

CLRs *C-type lectin receptors*; druh PRRs

CR *complement receptor*; rozpoznává složky komplementového systému

CSF – *colony-stimulating factor*; růstové faktory hemopoetických buněk

DAMPs *damage-associated molecular patterns*; molekuly schopné iniciovat a udržovat imunitní reakci v případě neinfekční zánětlivé odpovědi

DcR3 *decoy receptor 3*; druh rozpustného receptoru inaktivující FasL

DOPE *dioleoylphosphatdiylethanolamine*; kotvidlo do biomembrány

FAD *flavin adenin dinukleotid*; redoxní kofaktor důležitý pro některé metabol. reakce

FasL *Fas ligand*; po vazbě na příslušný receptor navozuje apoptózu

f-MLF *formyl-methionin-leucin-fenylalanin*; druh PAMPs

FMN – *flavinmononukleotid*; redoxně aktivní kofaktor

FPR *formylpeptidový receptor*, receptor zodpovědný za chemotaxi schopný rozpoznat a vázat N-formylové peptidy

G-CSF *granulocyte colony- stimulating factor*; růstový hormon pro granulocyty

ICAM *intercellular adhesion molecule*; povrchové glykoproteiny endotelií a buněk IS

IFN *interferon*; druh cytokinu

IL *interleukin*; druh cytokinu

IL-1R – receptor pro interleukin-1

IRAK-1 *interleukin-1 receptor-associated kinase*; enzym částečně zodpovědný za IL-1R stimulovanou zvýšenou transkripci NF-κB

LFA-1 *lymphocyte function-associated antigen 1*; povrchová molekula T a B lymfocytů, mikro a makrofágů s více fcemi

LPS *lipopolysacharid*, komponenta buněčné stěny Gram- bakterií

LTA *kyselina lipoteichoová*, komponenta b. stěny Gram+ bakterií

Mac-1 *komplementový receptor typu 3*

MD-2 *myeloid differential factor 2*; společně s TLR4 váže LPS

MDP *muramyl dipeptid*; PAMPs Gram+ i Gram- bakterií

MHC *hlavní histokompatibilní komplex*; sada povrch. molekul buněk obratlovců podílející se na rozpoznávání cizorodých struktur

MPO *myeloperoxidáza*

MyD88 *myeloid differentiation primary response gene (88)*; hlavní adaptorový protein

NETs – extracelulární pasti neutrofilů

NF-1 neurofibromatóza typu 1; dědičné onemocnění s mnohočetnými nádory na kůži a v nervovém systému

NF-κB nukleární faktor κB; proteinový komplex řídící transkripci DNA

NK *natural killer*; druh leukocytu

NLR *NOD-like receptor*; druh PRR

PAMPs *pathogen-associated molecular patterns*; molekulární struktury typické pro povrch patogenů

PGE₂ prostaglandin E₂; navozuje horečku

PMA *phorbol 12-myristate 13-acetate*; aktivuje leukocytu

PMN polymorfonukleáry; neutrofil, bazofil, eozinofil

PRRs *pattern recognition receptors*; receptory rozpoznávající PAMPs

RCAS1 *receptor binding cancer antigen expressed on SiSo cells*; vyskytuje se u nádorových buněk a vyvolává apoptózu leukocytů

RLR *RIG-I-like receptor*; druh PRR

RNS reaktivní formy dusíku

ROS reaktivní formy kyslíku

SAP130 *Sin3A-associated protein, 130kDa*; lektin typu C uvolňovaný umírajícími buňkami

SARM *sterile a- and armadillo-motif-containing protein*; člen rodiny adaptorových molekul TLR

SCID *severe combined immunodeficiency*; genetická porucha, kdy chybí funkční T a B lymfocyty

SR/CR spontánní regrese/kompletní rezistence

TCR T-buněčný receptor

TGF faktor transformující růst

Th *Helper* druh T-lymfocytu

TIL tumor infiltruující lymfocyty

TIR doména Toll/IL-1R homologní doména

TIRAP *Toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain – containing adapter protein*; adaptorová molekula spojovaná s TLR

TLR Toll-like receptor

TNF tumor necrosis factor

TRAF *TNF receptor-associated factor*; proteiny regulující zánět, protivirovou odpověď a apoptózu

TRAIL *TNF-related apoptosis-inducing ligand*; ligand navozující apoptózu

TRAM *TRIF-related adaptor molecule*; je podobně jako SARM člen rodiny adaptorových molekul TLR

8. Literatura

- Adams J. M., Capecchi M. R. (1966): *N-formylmethionyl-sRNA as the initiator of protein synthesis*. PNAS, 55: 147-155
- Ahren I.L., Williams D.L., Rice P.J., Forsgren A., and Riesbeck K. (2001): *The importance of a beta-glucan receptor in the nonopsonic entry of nontypeable Haemophilus influenzae into human monocytic and epithelial cells*. J Infect Dis, 184: 150–158
- Akira S., Takeda K., Kaisho T. (2001): *Toll-like receptors:critical proteins linking innate and acquired immunity*. Nat Immunol, 2 (8): 675-680
- Akira, S., Takeda, K. (2004). *Toll-like receptor signalling*. Nat. Rev. Immunol. 4: 499–511.
- Akira S., Uematsu S., Takeuchi O. (2006): *Pathogen Recognition and Innate Immunity*. Cell, 124: 783-801
- Akramiene D., Kondrotas A., Didziapetriene J., Kevelaitis E. (2007): *Effects of beta-glucans on the immune system*. Med Lith, 43 (8): 597-606
- Albino A.P., Davis B. M., Nanus D. M (1991): *Induction of Growth Factor RNA Expression in Human Malignant Melanoma: Markers of Transformation*. Cancer Res. 51: 4815-4820
- Anwar M.A., Basith S., Choi S. (2013): *Negative regulatory approaches to the attenuation of Toll-like receptor signaling*. Experimental & Molecular Medicine 45, e11; doi:10.1038/emm.2013.28. Published online 22 February 2013
- Atkins E. (1960): *Pathogenesis of fever*. Physiol Rev, 40: 580-646
- Arbour N., Tremblay P., Oth D. (1996): *N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine induces and modulates IL-1 and IL-6 in human PBMC*. Cytokine, 8: 468–475
- Ariizumi K., Shen G.-L., Shikano S., Xu S., Ritter III R., Kumamoto T., Edelbaum D., Morita A., Bergstresser P.R., Takashima A.(2000) : *Identification of a novel, dendritic cell-associated molecule, dectin-1, by subtractive cDNA cloning*. J Biol Chem, 275: 20157–20167
- Auerová (2012): *Terapie nádorových onemocnění založená na ukotvení laminarinu na povrch nádorových buněk*. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Přírodovědecká fakulta. Bakalářská práce, 47 s.
- Baggiolini M., Clark-Lewis I. (1992): *Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine*. FEBS, 307: 97-101
- Bae Y.S., Park E.Y., Kim Y., He R.,Ye R.D., Kwak J.Y., Suh P.G. Ryu S.H. (2003): *Novel chemoattractant peptides for human leukocytes*. Biochem Pharmacol, 66: 1841–1851
- Barcellos-Hoff M. H. a Dix T. A. (2013): *Redox-mediated activation of latent transforming growth factor-beta 1*. Mol Endocrinol, 10 (9): 1077-1083

- Belizário J.E.(2009): *Immunodeficient Mouse Models: An Overview*. OJI. 2: 79-85
- Bell S., Goldman V.M., Bistran B.R. (1999): *Effect of beta-glucan from oats and yeast on serum lipids*. Crit Rev Food Sci, 39: 189–202
- Beutler B., Greenwald D., Hulmes J.D., Chang M., Pan Y.-C. E., Mathinson J., Ulevitch R., Cerami A. (1985): *Identity of tumour necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin*. Nature, 316: 552 - 554
- Beutler B., Milsark I.W., Cerami A.C. (1985): *Passive immunization against cachectin/tumor necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin*. Science, 229: 869-871
- Beutler B. (2004): *Innate immunity: an overview*. Mol Immunol, 40: 845-859
- Beyenbach, K. W. & Wieczorek, H. (2006): *The V-type H⁺ ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation*. J Exp Biol, 209: 577–589
- Blobe G.C., Schiemann W.P., Lodish H.F. (2000): *Role of transforming growth factor beta in human disease*. N Engl J Med, 342 (18): 1350–1358
- Bobrowski W.F., McDuffie J.E., Sobocinski G., Chupka J., Olle E., Browman A., Albassam M. (2005): *Comparative methods for multiplex analysis of cytokine protein expression in plasma of lipopolysaccharide-treated mice*. Cytokine, 32 (5): 194-198
- Boon T., Coulie P. G., Van den Eynde B. (1997): *Tumor antigens recognized by T cells*. Immunol Today, 18 (6): 267-268
- Borregard N., Kjeldsen L., Lollike K., Sengelov H. (1995): *Granules and secretory vesicles of the human neutrophil*. Clin Exp Immunol, 101 (1): 6-9
- Bosma M.J., Carroll A.M. (1991): *THE SCID MOUSE MUTANT: Definition, Characterization and Potential Uses*. Annu Rev Immunol, 9: 323-350
- Bowie A., O'Neill L.A. (2000): *The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products*. J Leukoc Biol, 67: 508–514
- Bottino C., Castriconi R., Moretta L., Moretta A. (2005): *Cellular ligands of activating NK receptors*. Trends Immunol, 26 (4): 221-226
- Breuel K.F., Kougias P., Rice P.J., Wei D., De Ponti K., Wang J., Laffan J.J., Li C., Kalbfleisch J., Williams D.L. (2004): *Anterior pituitary cells express pattern recognition receptors for fungal glucans: implications for neuroendocrine immune involvement in response to fungal infections*. Neuroimmunomodulat, 11: 1–9.

- Brinkmann V., Reichard U., Goosmann Ch., Fauler B., Uhlemann Y., Weiss D. S., Weinrauch Y., Zychlinsky A. (2004): *Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria*. *Science*, 303: 1532-1535
- Brocker Ch., Thompson D., Matsumoto A., Nebert D.W., Vasiliou V. (2010): *Evolutionary divergence and functions of the human interleukin (IL) gene family* *Hum Genet*, 5 (1): 30–55
- Brown G.D. (2006): *Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor*. *Nat Rev Immunol*, 6: 33-43
- Brown G. D., Gordon S. (2001): *Immune recognition: A new receptor for β -glucans*. *Nature*, 413: 36–37
- Brown G.D., Gordon S. (2003): *Fungal β -Glucans and Mammalian Immunity*. *Immunity*, 19 (3): 311-315
- Bui J.D., Schreiber R.D. (2007): *Cancer immunosurveillance, immunoediting and inflammation: independent or interdependent process?* *Curr Opin Immunol*, 19: 203-208
- Burnet FM (1970) : *The concept of immunological surveillance*. *Prog Exp Tumor Res*, 13: 1-27
- Cancer Research UK (2012): World cancer factsheet: World cancer burden 2008. In: [online]. [cit.2014-02-20]. Dostupné z: http://publications.cancerresearchuk.org/downloads/Product/CS_FS_WORLD_A4.pdf
- Calderone R.A., Braun P.C. (1991): *Adherence and receptor relationships of *Candida albicans**. *Microbiol Rev*, 55: 1-20
- Carswell E.A., Old L.J., Kassel R.L., Green S., Fiore N., Williamson B. (1975): *An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors*. *Proc Nat Acad Sci USA*, 72 (9): 3666-3670
- Castell J.V, Gómez-Lechóna M.J., David M., Andusb T., Geigerb T., Trullenquec R., Fabrac R., Heinrich P.C. (1989): *Interleukin-6 is the major regulator of acute phase protein synthesis in adult human hepatocytes*. *FEBS Letters*, 242 (2): 237-239
- Cerwenka A., Lanier L.L. (2001): *Natural killer cells, viruses and cancer*. *Nat Rev Immunol*, 1: 41-49
- Clark R.A., Klebanoff S.J. (1975): *Neutrophil-mediated Tumor Cell Cytotoxicity: Role of the Peroxidase System*. *J Exp Med*, 141: 1442-1447
- Commins S. J., Borish L., Steinke J. W. (2010): *Immunologic messenger molecules: Cytokines, interferons, and chemokines*. *Allergy Clin Immunol*, 125: 53-72
- Coussenová L.M. a Werbová Z. (2002): *Inflammation and cancer*. *Nature*, 420: 860-867

- 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.J. (2003): *Spontaneous regression of advanced cancer: identification of a unique genetically determined, age-dependent trait in mice*. Proc Natl Acad Sci USA, 100 (11): 6682-6687
- Czarniecki C. W., Chiu H. H., Wong G. H., McCabe S. M., Palladino M. A. (1988): *Transforming growth factor-beta 1 modulates the expression of class II histocompatibility antigens on human cells*. J Immunol, 140: 4217-4223
- Delves P.J., Roitt I.M. (2000): *The immune system. First of two parts*. New Engl J Med, 343 (1): 37-49
- Detmers P.A., Lo S.K., Olsen – Egbert E., Walz A., Baggiolini M., Cohn Z.A. (1990): *Neutrophil-activating protein 1/interleukin 8 stimulates the binding activity of the leukocyte adhesion receptor CD11b/CD18 on human neutrophils*. J Exp Med, 171 (4): 1155 - 1162
- Di Carlo E., Forni G., Lollini P., Colombo M.P., Modesti A., Musiani P. (2001): *The intriguing role of polymorphonuclear neutrophils in antitumor reactions*. Blood, 97: 339–345
- Dinarello C.A. (1988): *Biology of interleukin 1*. The FASEB Journal, 2 (2): 108-115
- Dinarello C.A. (1991): *Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism*. Blood, 77: 1627-1652
- Dinarello C.A. (2011): *Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases*. Blood, 117: 3720-3732
- Drake T.A., Cheng J., Chang A., Taylor F.B. Jr (1993): *Expression of tissue factor, thrombomodulin, and E-selectin in baboons with lethal Escherichia coli sepsis*. Am J Pathol, 142 (5): 1458-1470
- Dunn G.P., Bruce A.T., Ikeda H., Old L.J., Schreiber R.D. (2002): *Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape*. Nat Immunol, 3 (11): 991-998
- Ehlers M. R. W. (2000): *CR3: a general purpose adhesion-recognition receptor essential for innate immunity*. Microbes Infect, 2 (3): 289-294
- Ehrlich P (1909): *About the current state of carcinoma research*. Ned Tijdschr Genees, 5: 273-290
- Eming S. A., Krieg T., Davidson J. M. (2007): *Inflammation in Wound Repair: Molecular and Cellular Mechanisms*. J Invest Dermatol, 127: 514 – 525.
- Ershler W.B. (1993): *Interleukin-6: a cytokine for gerontologists*. J Am Geriatr Soc, 41 (2):176-181
- Erridge C., Bennett-Guerrero E., Poxton I.R. (2002): *Structure and function of lipopolysaccharides*. Microbes Infect, 4: 837-851

- Farrar M.A., Schreiber R.D. (1993): *The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor*. Annu Rev Immunol, 11: 571-611.
- Fernandez-Segura E., Garcia J.M., Santos J.L., Campos A. (1995): *Shape, F-actin, and surface morphology changes during chemotactic peptide-induced polarity in human neutrophils*. Anat Rec, 241: 519–528
- Flannagan R. S., Cosío G., Grinstein S. (2009): *Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies*. Nat Rev Microbiol, 7 (5): 355-366
- Frank M. M. (1988): *Complement: a brief review*. J Allergy Clin Immunol, 84 (4): 411–420
- Fridlender Z.G., Sun J., Kim S., Kapoor V., Cheng G., Ling L., Worthen G.S., Albelda S.M. (2009): *Polarization of Tumor-Associated Neutrophil (TAN) Phenotype by TGF- β : “N1” versus “N2” TAN*. Cancer Cell, 16 (3): 183-194
- Frucht D. M., Fukao T., Bogdan C., Schindler H., O’Shea J. J., Koyasu S. (2001): *IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge*. Trends Immunol, 22: 556–560
- Fu H., Karlsson J., Bylund J., Movitz Ch., Karlsson A., Dahlgren C. (2006): *Ligand recognition and activation of formyl peptide receptors in neutrophils*. J Leukocyte Biol, 79: 247-256
- Gagnon E., Duclos S., Rondeau C., Chevet E., Cameron P.H., Steele-Mortimer O., Paiement J., Bergeron J.J., and Desjardins M. (2002): *Endoplasmic reticulum-mediated phagocytosis is a mechanism of entry into macrophages*. Cell, 110: 119–131
- Gantner B. N., Simmons R. M., Canavera S. J., Akira S., Underhill D. M. (2003): *Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2*. J Exp Med, 197, 1107–1117
- Geijtenbeek T.B.H., Gringhuis S.I. (2009): *Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses*. Nat Rev Immunol, 9: 465-479
- Gill E.A., Imaizumi T., Carveth H., Topham M.K., Tarbet E.B., McIntyre T.M., Prescott S.M., Zimmerman G.A. (1998): *Bacterial lipopolysaccharide induces endothelial cells to synthesize a degranulating factor for neutrophils*. The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 12: 673-684.
- Goldstein I.J., Hayes C.E. (1978): *The lectins: Carbohydrate-binding proteins of plants and animals*. Adv Carbohydr Chem Biochem, 35: 127-340
- Goto Y., Arigami T., Kitago M. et al. (2008): *Activation of toll-like receptors 2, 3, and 4 on human melanoma cells induces inflammatory factors*. Mol Cancer Ther, 7: 3642 - 3653
- Gray P.W., Goeddel D.V. (1982): *Structure of the human immune interferon gene*. Nature, 298 (5877): 859–863.

- Greisman S.E., Young E.J., Workman J.B., Ollodart R.M., Hornick R.B. (1975): *Mechanisms of endotoxin tolerance. The role of the spleen.* J Clin Invest, 56: 1597-1607
- Guha M. a Mackman N. (2001): *LPS induction of gene expression in human monocytes.* Cell Signal, 18 (4): 85-94
- Haddad J. J. (2002): *Cytokines and related receptor-mediated signaling pathways.* Biochem Bioph Res Co, 297: 700-713
- Hajdu S. I. (2004): *Greco-Roman thought about cancer.* Cancer, 100: 2048–2051
- Hajdu S.I. (2010): *A note from history.* Cancer, 116: 2493-2498
- Hajdu S.I. (2011): *A note from history: Landmarks in history of cancer, part 2.* Cancer, 117: 2811-2820
- Hanahan D., Weinberg R.A. (2000): *The hallmarks of cancer.* Cell, 100 (1): 57–70
- Harada A., Sekido N., Akahoshi T., Wada T., Mukaida N., Matsushima K. (1994): *Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation.* J Leukoc Biol, 56: 559-564
- Heine U.I., Munoz E.F., Flandres K.C., Ellingsworth L.R., Lam H.-Y. P., Thompson N.L., Roberts A.B., Sporn M.B. (1987): *Role of transforming growth factor- β in the development of the mouse embryo.* J Cell Biol, 105 (6): 2861-2876
- Hicks A.M., Riedlinger G., Willingham M. C., Alexander-Miller M., Von Kap-Herr C., Pettenati M.J., Sanders A.M., Weir H.M., 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 (20): 7753-7758
- Hirano T., Kishimoto T. (1989): *Interleukin-6: possible implications in human diseases.* Res Clin Lab, 19: 1-10.
- Holevinsky K.O., Nelson D.J. (1998): *Membrane capacitance changes associated with particle uptake during phagocytosis in macrophages.* Biophys J, 75: 2577-2586.
- Houghton A.N., Guevara-Patiño J.A. (2004): *Immune recognition of self in immunity against cancer.* J Clin Invest, 114 (4): 468-471
- Chan G. Ch.-F., Chan W.K., Sze D. M.-Y. (2009): *The effects of B-glucan on human immune and cancer cells.* J Hem Oncol, 2 (25):1-11
- Chen W., Frank M.E., Jin W., Wahl S.M (2001): *TGF-beta released by apoptotic T cells contribute to an immunosuppressive milieu.* Immunity, 14: 715-25
- Chrispeels M.J., Raikhel N.V. (1991): *Lectins, Lectin Genes, and Their Role in Plant Defense.* The Plant Cell, 3: 1-9
- Ikedo H., Old L.J., Schreiber R.D. (2002): *The roles of IFN γ in protection against tumor development and cancer immunoediting.* Cytokine Growth FR, 13 (2): 95-109

- Inaba M., Tazuko T., Fujimoto S., Sakurai M.K., Ohnishi Y., Ueyama Y., Nomura T. (1986): *Evaluation of response rates to various antitumor agents of human gastric tumours implanted in nude mouse*. Jpn J Cancer Res, 77: 190-196.
- Isaacs A., Lindermann J. (1957): *Virus interference. I. The interferon*. Proc R Soc Lond B Biol Sci, 147: 258–267
- Ito T., Collins V., Thorén F.B., Dahlgren C., Karlsson A. (2006): *Changes in Activation States of Murine Polymorphonuclear Leukocytes (PMN) during Inflammation: a Comparison of Bone Marrow and Peritoneal Exudate PMN*. Clin Vaccine Immunol, 13: 575-583
- Jákobisiak M., Lasek W., Golab J. (2003): *Natural mechanisms protecting against cancer*. Immunol Lett, 90: 103-122
- Janeway Ch. A. Jr. (1992): *The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self*. Immunol Today, 13: 11-16.
- Janeway Ch.A., Medzhitov R. (2002): *Innate Immune Recognition*. Ann Rev Immunol, 20: 197-216
- Janotová T., Jalovecká M., Auerová M., Švecová I., Bruzlová P., Maierová V., Kumžáková Z., Čunátová Š., Vlčková Z., Caisová V., atd. (2014): *The Use of Anchored Agonists of Phagocytic Receptors for Cancer Immunotherapy: B16-F10 Murine Melanoma Model*. PloS one, 9 (1): e85222
- Jemal A., Bray F., Center M.M, Ferlay J., Ward E., Forman D. (2011): *Global cancer statistics*. CA-Cancer J Clin, 61 (2): 69-90
- Kaplan G. (1977): *Differences in the mode of phagocytosis with Fc and C3 receptors in macrophages*. Scand J Immunol, 6 : 797-807
- Kasper D. L., Braunwald E., Fauci A. S., Hauser S. L., Longo D. L., Jameson J. L. (2004): *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 16. vydání. USA: The McGraw-Hill Companies, Inc.. 2680 s.
- Kato K., Itoh Ch., Yasukouchi T., Nagamune T. (2004): *Rapid Protein Anchoring into the Membranes of Mammalian Cells Using Oleyl Chain and Poly(ethylene glycol) Derivatives*. Biotechnol Progr, 20 (3): 897-904
- Khong H.T. a Restifo N.P. (2002): *Natural selection of tumor variants in the generation of „tumor escape“ phenotypes*. Nat Immunol, 3 (11): 999-1005
- Klebanoff S.J. (2005): *Myeloperoxidase: friend and foe*. J Leukocyte Biol, 77: 598-625
- Klein G. (1966): *Tumor antigens*. Annu Rev Microbiol, 20 (1): 223-252
- Kobayashi H., Yoshida R., Kanada Y., Fukuda Y., Yagyu T., Inagaki K., Kondo T., Kurita N., Suzuki M., Kanayama N., Terao T. (2005): *Suppressing effects of daily oral*

supplementation of beta-glucan extracted from Agaricus blazei Murill on spontaneous and peritoneal disseminated metastasis in mouse model. J Cancer Res Clin, 131 (8): 527-538

Kougiyas P., Wei D., Rice P.J., Ensley H.E., Kalbfleisch J., Williams D.L., Browder I.W. (2001): *Normal human fibroblasts express pattern recognition receptors for fungal (1→3)-β-d-glucans.* Infect Immunol, 69: 3933–3938.

Krejsek J., Kopecký O. (2004): *Klinická imunologie.* Praha: NUCLEUS HK. 941 s.

Krüger-Krasagakes S., Krasagakakis K., Garbe C., Diamantstein T. (1995): *Production of Cytokines by Human Melanoma Cells and Melanocytes.* Recent Res Cancer, 139: 155-168

Kumar R., Clermont G., Vodovotz Y., Chow C.C. (2004): *The dynamics of acute inflammation.* J Theor Biol, 230 (2): 145-155

Kunkel S. L., Standiford T., Kasahara K., Strieter R. M. (1991): *Interleukin-8 (IL-8): the major neutrophil chemotactic factor in the lung.* Exp Lung Res, 17 (1): 17-23

Lacy P. (2006): *Mechnaisms of Degranulation in Neutrophils.* Allergy Asthma Clin Immunol, 2 (3): 98-108

Lachman L. B., Dinarello C. A., Llansa N. D., Fidler I. J. (1986): *Natural and recombinant human interleukin 1-beta is cytotoxic for human melanoma cells.* J Immunol. 136 (8): 3098-3102

Lawrence D.A. (1996): *Transforming growth factor-beta: a general review.* Eur Cytokine Netw, 7 (3): 363 – 374

Lázár-Molnár E., Hegyesi H., Tóth S., Falus A. (2000): *Autocrine and paracrine regulation by cytokines and growth factors in melanoma.* Cytokine. 12 (6): 547-554

Le Y., Gong W. Li B., Dunlop N.M., Shen W., Su S.B., Ye R.D., Wang J.M. (1999): *Utilization of two seven-transmembrane, G protein-coupled receptors, formyl peptide receptor-like 1 and formyl peptide receptor, by the synthetic hexapeptide WKYMMv for human phagocyte activation.* J Immunol, 163: 6777–6784

Le Y., Oppenheim J.J., Wang J.M. (2001): *Pleiotropic roles of formyl peptide receptors.* Cytokine Growth F R, 12 (1): 91-105

Le Y., Murphy P.M., Wang J.M. (2002): *Formyl-peptide receptors revisited.* Trends Immunol, 23 (11): 541-548

Le Cabec V., Carréno S., Moisand A., Bordier Ch., Maridonneau-Parini I. (2002): *Complement Receptor 3 (CD11b/CD18 Mediates Type I and Type II Phagocytosis During Nonopsonic and Opsonic Phagocytosis, Respectively.* J Immunol, 169: 2003-2009

Lemaitre B., Nicolas E., Michaut L., Reichhart J.M. and Hoffmann J.A. (1996) *The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults.* Cell, 86: 973–983

- Lizundia R., Sauter K.S., Taylor G., Werling D. (2008): *Host species-specific usage of the TLR4-LPS receptor complex*. *Innate Immun*, 14(4): 223-231
- Ljungman A.G., Leanderson P., Tagesson C. (1998): *(1→3)- β -d-glucan stimulates nitric oxide generation and cytokine mRNA expression in macrophages*. *Environ Toxicol Pharmacol*, 5 (4): 273-281
- Lomedico P.T., Gubler U., Hellman C., Dukovich M., Giri J.G., Pan Y., Collier R., Semionow R., Chua A.O., Mizel S.B. (1984): *Cloning and expression of murine IL-1 cDNA in E. Coli*. *Nature*, 312: 458-462
- Lu H., Smith C. W., Perrard J., Bullard D., Tang L., Shappell S. B., Entman M. L., Beaudet A. L., Ballantyne Ch. M. (1997): *LFA-1 Is Sufficient in Mediating Neutrophil Emigration in Mac-1-deficient Mice*. *J Clin Invest*, 99: 1340-1350
- Lu Y., Yeh W., Ohashi P.S. (2008): *LPS/TLR4 signal transduction pathway*. *Cytokine*, 42: 145-151
- Luengo-Fernandez R., Leal J., Gray A., Sullivan R.(2013): *Economic burden of cancer across the European Union: a population-based cost analysis*. *Lancet Oncol*, 14: 1165 – 1174
- Martin M.U., Wesche H. (2002): *Summary and comparison of the signaling mechanisms of the Toll/interleukin-1 receptor family*. *J Nat Rev Immunol*, 265– 280.
- Mayell M. (2001): *Maitake Extracts and Their Therapeutic Potential – A Review*. *Altern Med Rev*, 6 (1): 48-60
- Mečnikov I. (1905): *Immunity in Infective Diseases*. New York : Macmillan Press. 617 s.
- Medzhitov R., Janeway Ch.A. Jr. (1997): *Innate Immunity: The Virtues of a Nonclonal System of Recognition*. *Cell*, 91: 295-298
- Medzhitov R., Preston-Hurlburt P., Janeway C.J. (1997) *A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity*. *Nature*, 388: 394–397
- Migeotte I., Communi D. Parmentier M. (2006): *Formyl peptide receptors: A promiscuous subfamily of G protein-coupled receptors controlling immune responses*. *Cytokine Growth F R*, 17: 501-519
- Minakami R. a Sumimotoa H. (2006): *Phagocytosis-coupled activation of the superoxide-producing phagocyte oxidase, a member of the NADPH oxidase (nox) family*. *Int J Hematol*, 84: 193–198
- Miyayoshi N., Iwamoto Y., Watanabe E., Odaz T. (2003): *Induction of TNF- α production from human peripheral blood monocytes with β -1,3-glucan oligomer prepared from laminarin with β -1,3-glucanase from Bacillus clausii NM-1*. *J Biosci Bioeng*, 95 (2): 192-195

- Morshed T., Rahman S., Rahman S., Jahan S., Mukti M., Taznin I, Chawdhury M. H. R., Rahmatullah M. (2013): *Antihyperglycemic and antinociceptive effects of a commercially produce beta-glucan from Saccharomyces cerevisiae in Swiss albino mice*. Adv Nat App Sci, 7 (3): 260-263
- Murphy, J.F. (2010): *Trends in Cancer Immunotherapy*. Clin Med Insights: Oncol, 4: 67–80
- Nagaraj S., Gabrilovich D.I. (2008): *Tumor Escape Mechanism Governed by Myeloid-derived Suppressor Cells*. Cancer Res, 68 (8): 2561-2563
- Nakanishi, Kenji (2010): *Basophils as APC in Th2 response in allergic inflammation and parasite infection*. Curr Opin Immunol, 22 (6): 814–820
- Newport M.J., Huxley C.M., Huston S., Hawrylowicz C.M., Oostra B.A., Williamson R. (1996): *A mutation in the interferon-gamma-receptor gene and susceptibility to mycobacterial infection*. N Engl J Med, 335: 1941-1949
- Nicod, L. P. (1993): *Cytokines: overview*. Thorax, 48: 660-667
- Niculescu F., Rus H.G., Retegan M., Vlaicu R. (1992): *Persistent Complement Activation on Tumor Cells in Breast Cancer*. Am J Pathol, 140 (5): 1039-1043
- Oh J.W., Katz A., Harroch S., Eisenbach L., Revel M., Chebath J. (1997): *Unmasking by soluble IL-6 receptor of IL-6 effecton metastatic melanoma: growth inhibition and differentiation of B16-F10.9 tumour cells*. Oncogene. 15: 569–577
- Ohno N., Morrison D.C. (1989): *Lipopolysaccharide interaction with lysozyme: binding of lipopolysaccharide to lysozyme and inhibition of lysozyme enzymatic activity*. J Biol Chem, 264: 4434–4441
- Oldham R.K.(1986): *Biotherapy: the fourth modality of cancer treatment*. J Cell Physiol Suppl. 4: 91-99
- Oldham R.K., Dillman R.O. (2009): *Principles of Cancer Biotherapy*. 5. vydání. New York: Springer. 744 s.
- Ostrand-Rosenberg S. (2008): *Immune surveillance: a balance between protumor and antitumor immunity*. Curr Opin Genet Dev, 18: 11-18
- Pačes J. (2013): *Nádorová imunoterapie založená na použití ligandů fagocytárních receptorů vázajících se specificky nanádory*. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Přírodovědecká fakulta. Bakalářská práce, 52 s.
- Panaro M.A., Acquafredda A., Sisto M., Lisi S., Maffione A.B., Mitolo V. (2006): *Biological Role of the N-formyl Peptide Receptors*. Immunopharm Immunot, 28: 103-127
- Papayannopoulos V., Zychlinsky A. (2009): *NETs: a new strategy for using old weapons*. Trends Immunol, 30 (11): 513-521

- Parmiani G., Rivoltini L., Andreola G., Carrabba M. (2000): *Cytokines in cancer therapy*. Immunol Lett, 74 (1): 41-44
- Pratesa C., Sousa S., Oliveira C., Ikram S. (2011): *Prostate metastatic bone cancer in an Egyptian Ptolemaic mummy, a proposed radiological diagnosis*. Int J Paleopathol, 1 (2): 98-103
- Pick M.E., Hawrysh Z.J., Gee M.I. (1996): *Oat bran concentrate bread products improve long-term control of diabetes: a pilot study*. J Am Diet Assoc, 96: 1254–1261
- Quinn M. T. a Gauss K. A. (2004): *Structure and regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase: comparison with nonphagocyte oxidases*. J Leukoc Biol, 76: 760–781
- Racek J. 2008: *Myeloperoxidáza*. Klin Biochem Metab, 16 (37): 222-227
- Raetz Ch. R. H. a Whitfield Ch. (2002): *Lipopolysaccharide Endotoxins*. Annu Rev Biochem, 71: 635–700
- Rather L. J. (1971): *Disturbance of function (functio laesa): the legendary fifth cardinal sign of inflammation, added by Galen to the four cardinal signs of Celsus*. Bull NY Acad Med, 47 (3): 303-322
- Read S.M., Currie G. a Bacic A. (1996): *Analysis of the structural heterogeneity of laminarin by electrospray-ionisation-mass spectrometry*. Carbohyd Res, 281: 187-201
- Remer K. A., Brcic M., Jungi T. W. (2003): *Toll-like receptor-4 is involved in eliciting an LPS-induced oxidative burst in neutrophils*. Immunol Lett, 85 (1): 75-80
- Rondanelli M., Opizzi A., Monteferrario F. (2009): *The biological activity of beta-glucans*. Minerva Medi, 100 (3): 237 - 245
- Rop O., Mlcek J., Jurikova T. (2009): *Beta-glucans in higher fungi and their health effects*. Nutr Rev, 67 (11): 624-631
- Rosenthal A. S., Lipsky P. E., Shevach E.M. (1975): *Macrophage- lymphocyte interaction and antigen recognition*. Fed Proc, 34: 1743-1748
- Ross G.D., Větvička V. (1993): *CR3 (CD11b, CD18): a phagocyte and NK cell membrane receptor with multiple ligand specificities and functions*. Clin Exp Immunol, 92:181-184
- Rothenberg M.E., Hogan S.P. (2006): *The eosinophil*. Annu Rev Immunol, 24 (1): 147–174
- Sasieni P.D., Shelton J., Ormiston-Smith N., a kol. (2011): *What is the lifetime risk of developing cancer?: The effect of adjusting for multiple primaries*. Br J Cancer, 105 (3): 460-465.
- Ryan G.B., Majno G. (1977): *Acute inflammation. A review*. Am J Pathol, 86 (1): 183-276

- Sharma S. D., Jiang J., Hadley M. E., Bentley D.L., Hruby V.J. (1996): *Melanotropic peptide-conjugated beads for microscopic visualization and characterization of melanoma melanotropin receptors*. Proc Natl Acad Sci 93: 13715–13720
- Sharon N.(2008): *Lectins: past, present and future*. Biochem Soc T, 36 (6):1457–1460
- Showell H., Freer R., Zigmond S., Schiffmann E., Aswanikumar S., Corcoran B., Becker E. (1976): *The structure-activity relations of synthetic peptides as chemotactic factors and inducers of lysosomal secretion for neutrophils*. J Exp Med, 143:1154-1169
- Schroder K., Hertzog P.J., Ravasi T., Hume D.A. (2004): *Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions*. J Leukoc Biol, 75: 163-189
- Singh I. (2011): *Textbook of Human Histology with Colour Atlas and Practical Guide*. Jaypee Brothers Medical Publishers. 6. vydání. 396 s.
- Song W., Sarrias M. R., Lambris J. D. (2000): *Complement and innate immunity*. Immunopharmacology, 49: 187-198
- Sorci G., Faivre B. (2009): *Inflammation and oxidative stress in vertebrate host-parasite systems*. Phil Trans R Soc B, 364: 71-83
- Sporn M.B., Roberts A.B (1992): *Transforming growth factor-beta: recent progress and new challenges*. J Cell Biol, 119: 1017-1021
- Strieter R.M., Kunkel S.L., Showell H.J., Remick D.G., Phan S.H., Ward P.A., Marks R.M. (1989): *Endothelial cell gene expression of a neutrophil chemotactic factor by TNF-alpha, LPS, and IL-1 beta*. Science, 243 (4897): 1467-1469
- Stuehr, D. J. (1999): *Mammalian nitric oxide synthases*. Biochim Biophys Acta, 1411: 217–230
- Sun R., Iribarren P., Zhang N., Zhou Y., Gong W., Cho E. H., Lockett S., Chertov O., Bednar F., Rogers T. J. (2004): *Identification of neutrophil granule protein cathepsin G as a novel chemotactic agonist for the G protein-coupled formyl peptide receptor*. J Immunol, 173: 428-436
- Sun W.H., Kreisle R.A., Phillips A.W., Ershler W.B. (1992): *In vivo and in vitro characteristics of interleukin-6-transfected B16 melanoma cells*. Cancer Res 52: 5412–5415
- Takeuchi O., Akira S. (2010): *Pattern Recognition Receptors and Inflammation*. Cell, 140 (6): 805-820
- Taylor P. R., Brown G.D., Reid D. M., Willment J.A., Martinez-Pomares L., Gordon S., Wong S. Y. C. (2002): *The β -glucan receptor, dectin-1, is predominantly expressed on the surface of cells of the monocyte/macrophage and neutrophil lineages*. J Immunol, 169, 3876–3882

- Taylor P.R., Tsoni S. V., Willment J. A., Dennehy K. M., Rosas M., Findon H., Haynes K., Steele Ch., Botto M., Gordon S., Brown G. D. (2006): *Dectin-1 is required for β -glucan recognition and control of fungal infection*. *Nat Immunol*, 8: 31-38
- Thornton A.J., Strieter R.M., Lindley I., Baggiolini M., Kunkel S.L. (1990): *Cytokine – induced gene expression of a neutrophil chemotactic factor/IL-8 in human hepatocytes*. *J Immunol*, 144: 2609 – 2613
- Tiwari A. K., Roy H. K. (2012): *Progress against cancer (1971–2011): How far have we come?* *J Intern Med*, 271 (4): 392–399
- Tracey K.J., Fong Y., Hesse D.G., Manogue K.R., Lee A.T., Kuo G.C., Lowry S.F., Cerami A. (1987): *Anticachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia*. *Nature*, 330: 662-4
- Trinchieri, G. (1989): *Biology of natural killer cells*. *Adv Immunol*, 47: 187–376
- Ulich T.R., del Castillo J., Keys M., Granger G.A., Ni R.X. (1987): *Kinetics and mechanisms of recombinant human IL-1 and TNF α induce changes in circulating numbers of neutrophils and lymphocytes*. *J Immunol*, 139: 3406-3415
- Unanue E. R. (1976): *Secretory function of mononuclear phagocytes: a review*. *Am J Pathol*, 83 (2): 396–417
- Underhill D.M. a Gantner B. (2004): *Integration of Toll-like receptors and phagocytic signaling for tailored immunity*. *Microbes Infect*, 6: 1368-1373
- Underhill, D. M., Ozinski A., Hajjar A.M., Stevens A., Wilson Ch. B., Bassetti M., Aderem A. (1999): *The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens*. *Nature*, 401: 811–815
- Underhill D. M., Rossnagle E., Lowell C. A., Simmons R. M. (2005): *Dectin-1 activates SYK tyrosine kinase in a dynamic subset of macrophages for reactive oxygen production*. *Blood*, 106: 2543–2550
- van Kooyk, Y., Rabinovich, G. A. (2008) : *Protein-glycan interactions in the control of innate and adaptive immune responses*. *Nat Immunol*, 9: 593–601
- Vácová (2013): *Studium možnosti použití formylmethioninových peptidů v protinádorové terapii*. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Přírodovědecká fakulta. Bakalářská práce, 59 s.
- Vetterlein M., Kammerer B., Kokoschka E.M., Micksche M. (1995): *Differential ways of escape from negative growth control by TGF-1 in premature and mature melanoma cells*. *Melanoma Res*. 5: 28-33

- Větvička V., Thornton B.P., Ross G.D. (1996): *Soluble β -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*. J Clin Invest, 98 (1): 50-61
- Větvička V., Hanikýřová M., Větvičková J., Ross G. D. (1999): *Regulation of CR3 (CD11b/CD18)-dependent natural killer (NK) cell cytotoxicity by tumour target cell MHC class I molecules*. Clin Exp Immunol, 115: 229-235
- Vivier E., Raulet D.H., Moretta A., Caligiuri M.A., Zitvogel L., Lanier L.L., Yokoyama W.M., Ugolini S. (2011): *Innate or Adaptive Immunity? The Example of Natural Killer Cells*. Science, 331 (6031): 44-49
- Waldmannová (2014): *Terapie nádorových onemocnění pomocí kotvených agonistů fagocytárních receptorů. Studium mechanismů pomocí imunodeficientních myší*. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Přírodovědecká fakulta. Diplomová práce, 88 s.
- Walther A., Riehemann K., Gerke, V. (2000): *A novel ligand of the formyl peptide receptor: annexin I regulates neutrophil extravasation by interacting with the FPR*. Mol Cell, 5: 831-840
- Wang H.Y., Wang R. (2007): *Regulatory T cells and cancer*. Curr Opin Immunol, 19 (2): 217-223
- Weinhouse S. (1972): *National Cancer Act of 1971 – an editorial*. Cancer Res, 32 (4): i-ii
- Weiss D.J., Evanson O.A. (2002): *Evaluation of lipopolysaccharide-induced activation of equine neutrophils*. Am J Vet Res, 63 (6): 811-815
- Whiteside T.L. (2006): *Immun suppression in cancer: Effects on immune cells mechanisms and future therapeutic intervention*. Semin Cancer Biol, 16: 3-15
- WHO. *Cancer mortality and morbidity* [online]. [cit. 2014-05-22]. Dostupné z: http://www.who.int/gho/ncd/mortality_morbidity/cancer/en/index.html
- Williams D.L., Rice P.J., Herre J., Willment J.A., Taylor P.R., Gordon S., and Brown G.D. (2003): *Recognition of fungal glucans by pattern recognition receptors*. Recent Devel Carbohydrate Res, 1: 49–66.
- Willment J.A., Lin H.-H., Reid D. M., Taylor P. R., Williams D. L., Wong S. Y. C., Gordon S., D. Brown G. D. (2003): *Dectin-1 expression and functions are enhanced on alternatively activated and GM-CSF treated macrophages and negatively regulated by IL-10, dexamethasone and LPS*. J Immunol, 171: 4569–4573
- Witko-Sarsat V., Rieu P., Descamps-Latscha B., Lesavre P., Halbwachs-Mecarelli L. (2000): *Neutrophils: Molecules, Functions and Pathophysiological Aspects*. Lab Invest, 80: 617-653
- Wood P.J. (1990): *Physicochemical properties and physiological effects of the (1-3)(1-4)-beta-D-glucan from oats*. Adv Exp Med Biol, 270: 119–127

Yasumoto K., Okamoto S., Mukaida N., Murakami S., Mai M., Matsushima K. (1992): *Tumor necrosis factor alpha and interferon gamma synergistically induce interleukin 8 production in a human gastrin cancer cell line through acting concurrently on AP1 and NF- κ B-like binding sites of the interleukin 8 gene.* J Biol Chem, 267: 22506 – 22511

Yoshimura T., Matsushima K., Tanaka S., Robinson E.A., Appella E., Oppenheim J.J., Leonard E.J. (1987): *Purification of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor that has peptide sequence similarity to other host defense cytokines.* Proc Natl Acad Sci USA, 84: 9233-9237.

Young, H. A. (1996): *Regulation of interferon-gamma gene expression.* J Interferon Cytokine Res, 16: 563–568.

Zivkovic M., Poljak-Blazi M., Zarkovic K., Mihaljevic D., Schaur R.J., Zarkovic N. (2005): *Oxidative burst of neutrophils against melanoma B16-F10.* Cancer Lett, 246: 100-108

Zelensky A. N., Gready J. E. (2005): *The C-type lectin-like domain superfamily.* FEBS J, 272: 6179–6217

Žaloudík, J., LINKOS (2006): *O sarkomu* [online]. 2006-07-17. [cit. 2014-06-05]. Dostupné z: <http://www.linkos.cz/sarkomy-mekkych-tkani-c48-49/o-sarkomu/>