

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

**Terapie nádorových onemocnění pomocí kotvených  
agonistů fagocytárních receptorů. Studium mechanismů  
pomocí imunodeficientních myší.**

Diplomová práce

**Bc. Eva Waldmannová**

Školitel: RNDr. Jan Ženka, CSc.

České Budějovice 2014

Waldmannová, E., 2014: Terapie nádorových onemocnění pomocí kotvených agonistů fagocytárních receptorů. Studium mechanismů pomocí imunodeficientních myší. [Cancer therapy based on the use of the anchored agonists of phagocytic receptors. The study of mechanisms using immunodeficient mice. Mgr. Thesis, in Czech.] – 81p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

### **Anotace:**

The aim of this thesis was to study the mechanisms of innate immunity involved in the degradation of tumor cells on which the ligands of phagocytic receptors were installed. For this purpose both *in vivo* experiments using immunodeficient mice, and *in vitro* experiments based on monitoring the levels of inflammatory cytokines produced in the tumor tissue and on measuring the level of myeloperoxidase released during neutrophil degranulation were performed.

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

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

V Českých Budějovicích, 23. 4. 2014

.....  
Bc. Eva Waldmannová

### **Poděkování:**

Na tomto místě bych chtěla poděkovat zejména svému školiteli RNDr. Janu Ženkovi, CSc. za odborné vedení této diplomové práce, ochotu kdykoli pomoci, obrovskou trpělivost a v neposlední řadě také za množství cenných rad. Mé poděkování patří také všem pracovníkům Oddělení imunologie parazitů Parazitologického ústavu AV ČR v Českých Budějovicích za vytvoření příjemného pracovního prostředí a poskytnutí prostředků a zázemí při provádění experimentů. Dále bych ráda poděkovala všem kolegyním a kolegům z týmu za spolupráci. Velké dík patří i mé rodině, partnerovi a přátelům, kteří mi byli po celou dobu studia velkou oporou.

# Obsah

1. Úvod.....	1
1.1 Rakovina.....	1
1.1.1 Historie rakoviny a její léčby.....	2
1.1.2 Teorie vzniku rakoviny z dnešního pohledu.....	4
1.1.3 Charakteristické znaky nádorové buňky.....	5
1.1.4 Klasifikace nádorů.....	6
1.1.5 Melanom.....	8
1.1.5.1 Melanom B16-F10.....	9
1.1.6 Sarkom.....	10
1.1.6.1 Sarkom S-180.....	10
1.2 Imunitní systém a nádorové bujení.....	10
1.2.1 Protinádorová imunologie.....	11
1.2.2 Vzájemný vztah nádoru a imunitního systému.....	11
1.2.3 Mechanismy úniku imunitnímu systému.....	12
1.3 Vrozená imunita a nádorová onemocnění.....	13
1.3.1 PRRs – pathogen (pattern) recognition receptors.....	14
1.3.2 Komplement.....	15
1.3.3 Cytokiny a rakovina.....	16
1.3.4 Přehled některých pro a protizánětlivých cytokinů a jejich role v nádorovém bujení.....	17
1.3.4.1 TNF $\alpha$ (tumor necrosis factor $\alpha$ ).....	17
1.3.4.2 IL-1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ ).....	17
1.3.4.3 IL-6 (interleukin-6).....	18
1.3.4.4 IL-8 (interleukin-8).....	18
1.3.4.5 IFN $\gamma$ (interferon $\gamma$ ).....	19
1.3.4.6 TGF- $\beta$ (transforming growth factor $\beta$ ).....	19
1.3.5 Buňky vrozené imunity podílející se v protinádorové aktivitě.....	20
1.3.5.1 Neutrofilly.....	20
1.3.5.1.1 Role neutrofilů v nádorovém bujení.....	22
1.3.5.2 Makrofágy.....	24
1.3.5.3 NK (natural killers) buňky.....	24
1.3.5.4 Dendritické buňky.....	25

1.3.5.5 Žírné buňky (mastocyty) .....	25
1.3.6 Terapie nádorů založená na stimulaci vrozené imunity .....	26
1.4 Terapie nádorů pomocí směsi ligandů fagocytárních a signálních receptorů (Zymosan-BAM+LPS a manan-BAM+LPS) ukotvených na nádorové buňky.....	27
1.4.1 Zymosan.....	27
1.4.2 Manan .....	28
1.4.2.1 Receptory rozpoznávající manan.....	28
1.4.3 Beta-glukan .....	29
1.4.3.1 Receptory rozpoznávající beta-glukan.....	29
1.4.4 LPS (lipopolysacharid) .....	30
1.4.4.1 Receptory rozpoznávající LPS .....	30
1.5 Imunodeficientní myši.....	31
1.5.1 SCID (severe combined immunodeficiency) myši.....	31
1.5.2 CD11b deficientní myši .....	31
<b>2. Cíle práce: .....</b>	<b>33</b>
<b>3. Materiál a metody .....</b>	<b>34</b>
3.1 Chemikálie .....	34
3.2 Laboratorní zvířata .....	34
3.3 Buněčné linie .....	35
3.4 Příprava buněčných linií pro transplantaci .....	35
3.5 Transplantace nádorových buněk.....	35
3.6 Měření velikosti nádorů.....	35
3.7 Průměrná redukce nádorového růstu (%) .....	36
3.8 Počítání metastáz v plicích .....	36
3.9 Sonikace.....	36
3.10 Statistické zpracování dat .....	36
3.11 Izolace neutrofilů.....	36
3.12 Příprava terapeutických látek.....	37
3.12.1 Příprava manan-BAM a manan-BAM + LPS .....	37
3.12.2 Příprava Zymosan-BAM a Zymosan-BAM + LPS .....	37
3.13 Pokus č. 1: Studium vlivu terapeutické směsi (manan-BAM+LPS) na redukci nádorového růstu u SCID myší, pulzní režim léčby .....	38
3.14 Pokus č. 2: Studium vlivu terapeutické směsi (Zymosan-BAM +LPS, manan-BAM+LPS) na redukci nádorového růstu u SCID myší, aplikace terapeutika obden.....	38

3.15 Pokus č. 3: Studium mechanismů vrozené imunity s použitím CD11b deficientních myší, pulzní režim léčby .....	39
3.16 Pokus č. 4: Studium mechanismů vrozené imunity s použitím CD11b deficientních myší, aplikace terapeutika obden.....	39
3.17 Pokus č. 5: Ověření účinnosti terapie na sarkomu S-180 transplantovaném myším kmene BALB/c .....	40
3.18 Pokus č. 6: Stanovení hladiny cytokinů v nádorech léčených manan-BAM, LPS a jejich směsí .....	40
3.18.1 Měření koncentrace cytokinů v nádoru pomocí ELISA testu.....	41
3.19 Pokus č. 7: Zavedení a optimalizace metody sloužící k určení míry degranulace neutrofilů při interakci s nádorovými buňkami a ligandem .....	41
3.19.1 Stanovení MPO aktivity.....	41
3.19.2 Příprava vzorků pro stanovení množství uvolněné MPO a studium in vitro interakcí neutrofilů s nádorovými buňkami a ligandem.....	42
3.19.3 Příprava vzorků pro stanovení množství uvolněné MPO v nádorové tkáni po aplikaci LPS .....	42
3.19.4 Příprava vzorků pro stanovení množství MPO uvolněné do mezibuněčného prostoru nádorové tkáně po aplikaci ligandů.....	43
<b>4. Výsledky .....</b>	<b>44</b>
4.1 Pokus č. 1: Studium vlivu terapeutické směsi (manan-BAM+LPS) na redukci nádorového růstu u SCID myší, pulzní režim léčby .....	44
4.2 Pokus č. 2: Studium vlivu terapeutické směsi (Zymosan-BAM +LPS, manan-BAM+LPS) na redukci nádorového růstu u SCID myší, aplikace terapeutika obden.....	45
4.3 Pokus č. 3: Studium mechanismů vrozené imunity s použitím CD11b deficientních myší, pulzní režim léčby .....	46
4.4 Pokus č. 4: Studium mechanismů vrozené imunity s použitím CD11b deficientních myší, aplikace terapeutika obden.....	48
4.5 Pokus č. 5: Ověření účinnosti terapie na sarkomu S-180 transplantovaném myším kmene BALB/c .....	49
4.6 Pokus č. 6: Stanovení hladiny cytokinů v nádorech léčených manan-BAM, LPS a jejich směsí .....	50
4.6.1 IL-1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ ).....	50
4.6.2 TNF- $\alpha$ (tumor necrosis faktor $\alpha$ ).....	52
4.6.3 IL-6 (interleukin 6) .....	54
4.6.4 IL-8 (interleukin-8).....	55
4.6.5 TGF- $\beta$ (tumor growth faktor $\beta$ ).....	56
4.6.6 IFN- $\gamma$ (interferon $\gamma$ ) .....	58

4.7 Pokus č. 7: Zavedení a optimalizace metody sloužící k určení míry degranulace neutrofilů při interakci s nádorovými buňkami a ligandem .....	59
4.7.1 Zavedení metody stanovení množství uvolněné MPO a studium in vitro interakcí neutrofilů s nádorovými buňkami a ligandem .....	59
4.7.2 Zavedení metody a stanovení množství uvolněné MPO v nádorové tkáni po aplikaci LPS .....	60
4.7.3 Zavedení metody a stanovení množství MPO uvolněné do mezibuněčného prostoru nádorové tkáně po aplikaci ligandů .....	61
<b>5. Diskuze .....</b>	<b>63</b>
<b>6. Souhrn .....</b>	<b>69</b>
<b>7. Seznam zkratk .....</b>	<b>70</b>
<b>8. Seznam použité literatury .....</b>	<b>72</b>

# 1. Úvod

Rakovina se stala jednou z nejobávanějších chorob lidstva a to především díky její vysoké incidenci a mortalitě. Udává se, že každý třetí obyvatel České republiky onemocní touto závažnou chorobou a každý čtvrtý na ní zemře. Každoročně onemocní rakovinou desetitisíce lidí, v roce 2010 bylo nahlášeno v České republice 82 606 nových případů a zemřelo 27 834 pacientů. To znamená, že každý den zemře v ČR přibližně 76 lidí na nádorové onemocnění (Zvolský 2013).

Díky těmto odstrašujícím číslům a stále narůstajícímu počtu nových případů, se stala rakovina po mnoho let centrem zájmu řady vědců a lékařů, kteří se snaží nalézt účinný lék na tuto závažnou chorobu. Ačkoliv je chirurgická léčba ve spojení s chemoterapií v počátečních fázích vývoje nádoru poměrně úspěšná, nedokáže pomoci každému pacientovi a umírá stále vysoké procento nemocných. Proto v současné době probíhá snaha o zavedení cílené imunoterapie, která by mohla vyřešit nedostatky stávající terapie.

Studium a hledání účinné terapie je cílem i této práce. Konkrétně se tato práce zabývá terapií nádorů založené na stimulaci vrozené imunity. K její stimulaci dochází prostřednictvím motivů PAMPs, které se vážou na specifické receptory vrozené imunity PRRs. Ukotvení fagocytárních ligandů na nádorové buňky tedy umožňuje snadnější rozpoznání imunitním systémem a rychlejší degradaci nádorového bujení. Naším cílem je také objasnit mechanismy, kterými vrozená imunita bojuje proti nádorovému růstu.

## 1.1 Rakovina

Pojem rakovina je využíván pro různorodou skupinu chorob, jejímž společným rysem je nekontrolované dělení nádorových buněk. Jde o změnu nevratnou, tedy již vzniklý nádor se nemůže přeměnit zpět na tkáň normální. Typická pro nádory je jejich autonomní povaha, což znamená, že jejich růst není závislý na nositeli nádoru. V převážené většině případů vycházejí nádory z buněk vlastního těla, mohou pronikat do okolních tkání a zakládat tam sekundární ložiska (metastázy). Významným rysem nádorového bujení je také jeho schopnost unikat kontrolním mechanismům, které se uplatňují při řízení růstu normálních tkání (Mačák a Mačáková 2004).



### 1.1.1 Historie rakoviny a její léčby

Podle paleontologických objevů existovaly nádory u zvířat již v pradávné době, tedy mnoho let předtím, než se člověk vůbec objevil na planetě Zemi. První písemný záznam o rakovině pochází přibližně z roku 3000 př.n.l. a nalezneme ho v Edwin Smithově Papyrusu. Autor se zde zmiňuje o rakovině prsu, jako o velmi vážném onemocnění, pro které neexistuje léčba. Dalším dochovaným spisem, ve kterém najdeme záznamy o nádorovém bujení je Eberův Papyrus pocházející z roku 1500 př.n.l.. Obsahuje záznamy o nádorech vzniklých z měkkých a tukových tkání, dále jsou zde také zmíněny nádory kůže, dělohy, žaludku nebo recta. Zajímavý je způsob léčby, který Egypťané využívali k terapii nádorů. Jednou z léčebných metod byla např. kauterizace (vypalování), dále používali různé nože, soli a velmi oblíbená byla také arsenová pasta, známá pod pojmem egyptská mast. V ostatních částech světa byly k léčbě využívány spíše bylinné přípravky, jako různé čaje, ovocné šťávy, fíky nebo vařené zelí. V závažných případech našla své uplatnění např. pasta ze železa, mědi, síry a rtuti. Mnoho z těchto přípravků sloužilo k terapii nádorů v různých formách a koncentracích po více než 3000 let (Hajdu 2011a).

Velmi významným lékařem, který přispěl k objevení a rozvoji léčby rakoviny byl Hippokrates (460-375 př.n.l.), který zdůrazňoval přirozený vznik nádorů. Jako původce vzniku nádorů považoval nedostatek krve, hlenu, žluči a jiných tělních tekutin, které zejména ve stáří mohou vyvolat rakovinu. Hippokrates a ostatní řečtí lékaři znali rakovinu kůže, úst, žaludku a prsu, dále byly také objeveny polypy v tlustém střevě, dávající vznik karcinomu tlustého střeva. K léčbě většiny nádorů používali pouze paliativní léčbu, ostatní nádory se pokoušeli vyléčit buď speciální pleťovou vodou, kauterizací nebo byly vyřezávány nožem (Hajdu 2011a).

Mezi Hippokratovy nástupce patří například Aulus Celsus (25 př.n.l.-50 n.l.), který popsal několik druhů povrchových rakovin, ale také se ve svých spisech zmínil o rakovině žaludku, tlustého střeva, jater a sleziny. V léčbě považoval za důležité včasné a agresivní chirurgické odstranění, protože si všiml, že některé typy rakoviny mají tendenci se vracet a také mohou způsobit smrt rozšířením do vzdálených orgánů. Kromě chirurgického odstranění nádoru se v této době používaly také různé léčebné směsi, jako je např. směs uvařená z popela mořských krabů, vaječného bílku, medu a práškové výkaly dravců. S jinou teorií vzniku rakoviny přišel Claudius Galen (130-200 n.l.), který věřil, že maligní (vředovité) neléčitelné nádory jsou způsobené silnou černou žlučí, zatímco nádory benigní (neulcerózní) léčitelné vznikají v důsledku působení slabé žluté žluči. K léčbě pacientů proto používal různá projímadla ke snižování hromadění černé žluči. Zajímavou terapii zavedl také

Avicenna z Persie (980-1037), který používal drátěnou smyčku omotanou okolo nádoru, kterou utahoval každý den, dokud nádor neodpadl (Hajdu 2011a).

Významným mezníkem v historii léčby rakoviny se stalo také systematické použití chemických látek zahájené v 16. století Paracelsem (1493-1541), který je proto považován za průkopníka chemoterapie. K léčbě pacientů používal rtuť, olovo, síru, železo, zinek, měď, arsen, jód a draslík, přičemž všechny tyto chemikálie byly aplikovány vnitřně. Ve svých spisech ale důrazně upozorňoval, že veškeré tyto látky mohou být potenciálními jedy v závislosti na koncentraci a dávce. Na přelomu 15. a 16. století se také stalo běžným postupem posmrtné vyšetřování zemřelých pacientů sloužící k odhalení skrytých nádorů. První lékař, který rutinně porovnával chirurgické a patologické nálezy byl Marco Aurelio Severino (1580-1656). Stal se reformátorem v chirurgii a používal mnoho nových chirurgických postupů. Velmi také obhajoval odstranění benigních nádorů, kvůli možnému riziku zvratu v nádor maligní. K vyšetření chirurgických vzorků doporučuje použití mikroskopu (Hajdu 2011b).

Nejvíce realistický pohled na vznik rakoviny nabídl francouzský chirurg Deshaies Gendron (1663-1750). Ten byl přesvědčen, že nádory vznikají z transformujících se a neustále rostoucích struktur v těle, jako jsou např. žlázy, lymfatický systém, cévy nebo pevné struktury. Domníval se také, že nádory není možné léčit pomocí chemikálií, ale za jedinou účinnou léčbu považoval chirurgické odstranění nádoru. Gendron měl také povědomí o metastázách, které často následují počáteční lokalizovaný nádor. Takovéto rakoviny považoval za nevléčitelné. S odlišnou teorií přišli lékaři Hermann Boerhaave (1668-1738) a Jean Astruc (1684-1766), kteří věřili, že chronický zánět hraje klíčovou roli ve vzniku rakoviny, protože blokuje vylučovací kanály žláz. Tato teorie byla potvrzena i Johnem Hillem (1716-1775), který dále také upozorňuje na škodlivé účinky šňupacího tabáku, který může vyvolat rakovinné bujení (Hajdu 2011b).

Tyto pokroky v patologii a chirurgii z let 1500-1750 sloužily jako důvod k dalšímu vývoji v 18. a 19. století a to zvláště v pochopení makroskopického a mikroskopického složení benigních a maligních nádorů. S velmi převratným zjištěním přišel v roce 1775 anglický lékař Percivall Pott (1714 -1788), který pozoroval zvýšený výskyt rakoviny šourku u kominíků. Ta byla způsobena chronickou expozicí sazí a uhelného prachu. Podobné souvislosti si všiml také Samuel T. Soemmerring (1755-1830), který pozoroval zvýšený výskyt rakoviny dolního rtu u kuřáků cigaret. Tato pozorování byla velmi významná v náhledu na vznik rakoviny (Hajdu 2012a).

Na konci 18. století považovala většina lékařů rakovinu za hroživou chorobu, která se šíří postupně a je destruktivní. Pokud je ponechána bez léčby končí většinou smrtí, je náchylná k vracení i po odstranění nádoru a způsobuje také nutriční poruchy, které nakonec vedou ke kachexii a smrti. Z tohoto období je známý např. Rene Laennec (1781-1826), který byl uznávaný nejen za vymyšlení stetoskopu, ale byl to také velmi dobrý patolog, který jako první dokázal rozpoznat rakovinu plic od tuberkulózy. Dále také pojmenoval šířící se pigmentovou rakovinu jako melanózu (Hajdu 2012a).

Se svou teorií se stal významným také Rudolf Virchow (1821-1902), který věřil, že každá patologická léze skládající se z buněk pochází z dřívějších již existujících buněk. Virchow také rozdělil veškerý nový růst do dvou typů homologní a heterologní. Homologní růst většinou způsoboval benigní nádory a typické pro něj bylo, že docházelo ke zvětšení velikosti a počtu buněk, které byly přítomny v normálních tkáních. Heterologní růst způsoboval nádory maligní, které se sestávaly z nových forem buněk, které v normálních tkáních neexistovaly (Hajdu 2012a).

V druhé polovině 19. století byla většina pacientů s rakovinou v péči chirurgů, kteří se snažili rozvíjet samostatný obor onkologie a operace prováděli jen ve specifických oblastech. Patologové popisovali nově objevené léze, propracovali mikroskopickou klasifikaci nádorů a zavedli třídění rakoviny. Velmi významné byly také objevy Williama C. Röntgena (1845-1923), Pierra Curie (1859-1906) a Marie Curie Sklodovské (1867-1934), které velmi výrazně přispěly k diagnostikování rakoviny a její léčbě. Hledání příčiny vzniku rakoviny bylo rozšířeno na infekční organismy, chemické látky a radioaktivní materiály. Významným mezníkem v historii onkologie se také stalo v roce 1909 zavedení chemoterapie Paulem Ehrlichem (1854-1915) (Hajdu 2012b).

### **1.1.2 Teorie vzniku rakoviny z dnešního pohledu**

O tom, co konkrétně vyvolává nádorové bujení, se vedou neustále diskuze. V minulých šedesáti letech proto bylo navrženo pět hlavních teorií vzniku rakoviny. Všechny tyto modely byly vyvinuty na základě spolupráce několika různých vědních disciplín.

- 1. Mutační teorie** – považuje mutace za hlavní změnu, která vede k maligní transformaci. Tyto mutace mohou být vyvolány různými chemickými látkami, viry nebo radiací.

2. **Teorie nestability genomu (dědičnost)** – vysvětluje vznik nádorů, které jsou přenášeny v rodině mezi generacemi. Rozlišujeme dvě základní teorie, první z nich je Knudsonova dvouzásahová teorie, která je založena na předpokladu, že ke vzniku nádoru je nutná mutace obou kopií genů (tumorsupresorové geny). Tato teorie je typická například pro vznik retinoblastomu. Druhá teorie je typická pro vznik familiárního karcinomu tlustého střeva, který pro svůj rozvoj vyžaduje kumulaci jednotlivých mutací. Tato teorie je označována jako – Vogelsteinova teorie. Důležité je také zjištění, že u tumorsupresorových genů musí zmutovat obě alely, aby došlo ke vzniku nádoru, zatímco u onkogenů již jediná mutace vyvolává maligní růst.
3. **Teorie negenetických příčin** – tato novější teorie je založena na předpokladu, že pro vznik rakoviny je důležité působení rizikových faktorů, jako je např. strava, obezita, hormony nebo insulinová rezistence. Tyto faktory nepůsobí strukturální změny v DNA, ale spíše funkční změny zahrnující epigenetické vlivy.
4. **Darwinova teorie (teorie klonální expanze a buněčné selekce)** - větší důležitost přikládá spíše výběru buněk než jejich mutacím, ale zdůrazňuje také roli prostředí (jak mikro tak makroprostředí) při výběru buněk, které mají nějakou získanou výhodu.
5. **Teorie organizace tkáně** – tento model upozorňuje na důležitost lokálního prostředí nebo mikroprostředí, které je okolo pre-rakovinné buňky. Má dva podtypy, jeden model je zaměřený na mikroprostředí a druhý je založen na teorii morfostázy (schopnost systému zůstat stabilní v procesu změn). Rakovina se vyskytuje mnohem častěji, když morfostatické vlivy selžou, nebo když se spojí dvě morfostatické oblasti (Vineis a kol. 2010).

### 1.1.3 Charakteristické znaky nádorové buňky

Mezi základní znaky nádorové buňky řadíme šest biologických schopností, které buňky získávají v průběhu vícestupňového vývoje. Mezi tyto schopnosti patří soběstačnost růstových signálů, necitlivost k antiproliferativním signálům, schopnost uniknout apoptóze, neomezený replikační potenciál, neustálá angiogeneze a schopnost invaze a metastazování. V pozadí těchto znaků nalézáme ještě další a to nestabilitu genomu, jenž způsobuje genetickou rozmanitost, která urychluje jejich získávání a zánět, který podporuje dané schopnosti. V posledních letech byly přidány další schopnosti, jako jsou přeprogramování energetického metabolismu a vyhnutí se imunitní destrukci. Kromě nádorových buněk

obsahují tumory také buňky zdánlivě normální, které přispívají k získání charakteristických rysů vytvořením mikroprostředí nádoru (Hanahan a Weinberg 2000, Hanahan a Weinberg 2011).

Za hlavní znak považujeme soběstačnost v podobě růstových signálů, které buňce zajišťují neomezený nekontrolovatelný růst. Nádorové buňky vytváří mnoho vlastních růstových signálů, čímž snižují závislost na okolních normálních tkáních. Naopak ale nádorové buňky vykazují také necitlivost k protirůstovým signálům. Tyto signály u normálních buněk udržují buněčnou stagnaci, buněčný cyklus a homeostázu. Vznikající rakovinné buňky se těmito antiproliferativními signály musí vyhnout, pokud chtějí prosperovat (Hanahan a Weinberg 2000).

Velmi významným rysem je také schopnost vyhnout se apoptóze, čímž je zabráněno snížení počtu nádorové populace. Neomezeného počtu replikací je možné také dosáhnout díky existenci telomerázy u nádorových buněk. Telomeráza zabraňuje zkracování telomer, a tím umožní buňkám neomezeně se replikovat (Hanahan a Weinberg 2011).

Pro neomezený růst nádorové buňky je nezbytný také proces neustálé angiogeneze, díky kterému jsou nádorové buňky po celou dobu zásobovány živinami a kyslíkem, a dále jim také umožňuje vylučování metabolitů a oxidu uhličitého. Pro nádorovou angiogenezi jsou významné faktory jako je endoteliální růstový faktor A (VEGF-A) nebo fibroblastové růstové faktory (FGF) (Hanahan a Weinberg 2000).

Patrně nejzávažnějším rysem vyskytujícím se pouze u maligních nádorů, je schopnost invazivity a metastazování, které je způsobené tím, že nádorové buňky ztrácí E-cadherin a některé další adhezivní molekuly, které drží buňky pohromadě. Tím dochází k průniku nádorových buněk do místních krevních či lymfatických tkání a dále pak do tkání vzdálených (Hanahan a Weinberg 2000).

Pro nádorové buňky je též typický odlišný energetický metabolismus. Probíhá u nich tzv. aerobní glykolýza, kterou využívají při tvorbě energie, zatímco buňky zdravé produkují většinu ATP prostřednictvím oxidativní fosforylace, která je o mnoho efektivnější (Hanahan a Weinberg 2011).

#### **1.1.4 Klasifikace nádorů**

Při podezření na nádorové bujení by měla být daná tkáň vždy řádně vyšetřena a zhodnocena zkušeným patologem. Patolog má za úkol klasifikovat nádor jak

z histomorfologického hlediska, kdy se určí typing a grading nádoru, tak z hlediska anatomického rozšíření (staging) před léčbou a po ní.

### **Typing:**

Typing určuje typ nádoru pomocí mikroskopického zobrazení.

- Podle biologické povahy lze nádory dělit do dvou hlavních skupin:
  1. **Benigní nádory** – jejich růst je ohraničený, zůstávají v místě svého vzniku a nemetastazují. Nebezpečnými se stávají v případě nepříznivé lokalizace, kdy mohou utlačovat okolní tkáň a vést až ke smrti pacienta.
  2. **Maligní nádory** - růst je většinou rychlý, šíří se infiltrativně do okolí a mají schopnost zakládat vzdálená ložiska - metastázy. Pokud nedojde k včasné diagnostice a léčbě, způsobují smrt organismu. Z morfologického hlediska se nádorový růst projevuje třemi způsoby - růstem expanzivním, infiltrativním a invazivním.
  
- Podle tkáně, ze které nádory vycházejí, je dělíme na:
  1. **Mezenchymové nádory** – nádory vycházející z pojiva (sarkomy)
  2. **Epitelové nádory** - vycházející z epitelu (karcinomy)
  3. **Neuroektodermové nádory** – nádory vycházející z neuroektodermálních buněk (maligní melanom)
  4. **Germinální nádory** – pocházející z germinálních (zárodečných) buněk (seminom, teratom, embryonální karcinom)
  5. **Hematopoetické nádory** – nádory krvetvorných tkání (leukemie, lymfomy)
  6. **Choriokarcinom** – vychází z trofoblastu, často je součástí smíšených nádorů
  7. **Mezoteliom** - pochází z mezotelu, tkáň která dává vznik pleurální, perikardiální a peritoneální dutině

Pokud neexistuje žádná podobnost s výchozí tkání, jsou nádory označovány jako nediferencované (Vorlíček a kol. 2012, Becker a kol. 2005).

### **Grading:**

Grading je označení pro stupeň vyzrálosti nádoru. Je označován písmenem G a jedná se o velmi důležitou terapeutickou a prognosticky významnou veličinu. U gradingu můžeme rozlišovat čtyři stupně diferencovanosti. Obecně platí, že čím méně je nádor diferencovaný, tím je agresivnější, ale zároveň také citlivější k dané léčbě.

- $G_x$  nelze určit stupeň diferenciacie
- $G_1$  dobře diferencovaný
- $G_2$  středně diferencovaný
- $G_3$  špatně diferencovaný
- $G_4$  nediferencovaný

(Becker a kol. 2005)

## Staging

Staging slouží k určení rozsahu nádoru. Je zde používána celá řada systémů, z nichž nejfrekventovanější je systém TNM. Tento systém je používán téměř pro všechny nádory, kromě krevních chorob, které mají svoji specifickou klasifikaci. Zavedení tohoto systému značně přispělo ke standardizaci klasifikace maligních tumorů, a tím i ke zlepšení prognostických odhadů.

Hodnoceny jsou tři kategorie:

- **T(tumor)** - rozsah primárního nádoru
- **N(nodus)** - stav regionálních lymfatických uzlin a v určitých případech i uzlin juxtaregionálních
- **M(metastázy)** - přítomnost či nepřítomnost vzdálených metastáz

Rozsah nádorového růstu je v jednotlivých kategoriích určován pomocí čísla přidaného za dané písmeno. Čím je toto číslo větší, tím je rozsah tumoru či jeho šíření v dané kategorii vyšší. Není-li možné klasifikace stanovit, používá se symbol X pro danou kategorii. V některých případech se používají další pomocné symboly, jako například „y“ (yTNM), které slouží ke klasifikaci během terapie nebo po ní, dále „r“ (rTNM) sloužící k určení recidivujících nádorů. Před zahájením léčby se nejprve užívá preterapeutická, klinická klasifikace (TNM nebo cTNM) a po chirurgické léčbě následuje klasifikace patologická (pTNM) (Vorlíček a kol. 2012, Becker a kol. 2005).

### 1.1.5 Melanom

Maligní melanom řadíme mezi nejzhoubnější nádory s velkou schopností metastazovat do okolních tkání. Primární melanom vzniká z pigmentových buněk – melanocytů, které se nacházejí v bazální vrstvě epidermis. Normální funkcí melanocytů je produkovat a přenášet

tmavý pigment melanin do mitoticky aktivních keratinocytů nacházejících se v pokožce. Tento přenesený melanin je koncentrován v perinukleárním prostoru keratinocytů a ochraňuje jádro před působením UV záření. K transformaci melanocytů může dojít jak u pacientů s genetickou predispozicí, tak u pacientů zdravých. Přesná příčina vzniku melanomu není doposud známá, ale existuje řada faktorů podílejících se na jejich zvýšeném výskytu. Mezi tyto faktory můžeme zařadit vzájemné působení faktorů životního prostředí, akumulace genetických změn, aktivace onkogenů, inaktivace tumorsupresorových genů nebo poruchy v opravách DNA (Tuong a kol. 2012). Melanomy se mohou vyskytovat na kůži trupu, končetin, na ploskách nohou a dlaních nebo také pod nehty. Kromě kůže se mohou vyskytovat také na sliznicích dutiny ústní a nosní nebo také na sliznicích v oblasti anu a genitálu. Maligní léze se mohou objevovat také v oku nebo v játrech (Čáp a kol. 2005).

U maligního melanomu rozlišujeme podle klinicko-histopatologického obrazu a biologického chování 4 základní typy: lentigo maligna melanom (LMM), superficiálně se šířící melanom (SSM), akrolentiginózní melanom (ALM) a nodulární melanom (NM).

Dělení na klinická stádia onemocnění je určováno pomocí histopatologického vyšetření nádoru a lymfatických uzlin dle Breslowa a Clarka. Breslowova klasifikace je založena na hodnocení maximální tloušťky nádoru a stanovuje kritéria mortality. Klasifikace dle Clarka má menší výpovědní hodnotu (Ditrichová a Tichý 2006).

Pro rozpoznání melanomu slouží kromě dermatoskopického vyšetření také pomocné pravidlo ABCDE, které poukazuje na podezřelé pigmentové léze.

**A (asymetry)** - asymetrie, nepravidelné okraje

**B (border)** - okraje rozmazané, neostře, tvoří výběžky

**C (color)** - barva skvrnitá, odstíny hnědé až černé

**D (diameter)** – rozměr větší než 5-6 mm

**E (enlargement)** - neustálé zvětšování

Toto pravidlo je vhodné také k samovyšetřování, díky kterému se mnozí pacienti dostaví dříve na vyšetření a zvýší tím šanci na lepší prognózu (Čáp a kol. 2005).

#### **1.1.5.1 Melanom B16-F10**

Modely myších melanomů jsou známy již od počátku 20. stol, kdy melanom spontánně vznikl na inbredních kmenech myší. Tyto spontánní melanomy byly dobře



transplantovatelné na kongenních myších a bylo také možné je studovat a kultivovat in vitro (Damsky a Bosenberg 2010). Pravděpodobně nejznámějším typem je melanom B16, který se stal velmi významným pro onkologické výzkumy. Byl použit jak ke studiu solidního tumoru, tak metastáz. Tato buněčná linie vznikla v roce 1954 na myších C57BL/6J a od roku 1970 se hojně využívá ke kultivaci a studiu metastáz, které vznikají převážně v plicích, játrech a slezině (Teicher a kol. 2011).

U tohoto myšího melanomu rozlišujeme 4 buněčné linie B16-F0, B16-F1, B16-F10 a B16-BL6. Námi používaný model B16-F10 vykazuje velmi dobrou schopnost metastazovat do plic (Nakamura a kol. 2001).

### **1.1.6 Sarkom**

Sarkomy patří mezi vzácné maligní tumory, protože tvoří u dospělých osob pouze 1% všech malignit a u dětí způsobují okolo 6-8% nádorových onemocnění (Adámková Krákorová 2010). Sarkomy měkkých tkání jsou heterogenní skupinou maligních tumorů, které vycházejí z mezenchymálních buněk. Tyto buňky se za normálních okolností přeměňují na svalovou nebo tukovou tkáň, vazivo, kost nebo chrupavku. Objevit se mohou kdekoliv v těle, nejčastěji se však objevují na končetinách, trupu, retroperitoneu a v oblasti hlavy a krku. U sarkomů je obecně známý sklon k hematogennímu metastazování do plic a skeletu nebo také u sarkomů retroperitonea do jater. Metastazování do CNS je poměrně vzácné (Adámková Krákorová 2010, Lovas a kol. 2010).

#### **1.1.6.1 Sarkom S-180**

Sarkom 180 (známý také jako Crockerův nádor) vznikl u myší jako spontánní nádor epiteliální tkáně v podpažní oblasti. Byl objeven v roce 1914 doktorem W. H. Woglomem v Crockerově laboratoři ve Spojených státech (Zuckerberg 1973). Sarkom 180 se vyznačuje velmi rychlým růstem a téměř úplnou absencí metastáz, může se u něj objevit také spontánní regrese, která je spojena se snižující se fosfolipidovou aktivitou (Jones a kol. 1939).

## **1.2 Imunitní systém a nádorové bujení**

Imunitní systém je složitá soustava buněk, tkání a orgánů, která má za úkol pomoci ostatních soustav těla rozpoznat podněty z vnějšího i vnitřního prostředí a vyhodnotit jejich možné dopady na homeostázu a v potřebných případech na ně reagovat. Imunitní systém je

tvořen dvěma složkami - přirozenou (nespecifickou) a získanou (specifickou) imunitou. Obě tyto složky spolu spolupracují a fungují jako celek. Specifická imunita zahrnuje působení T-lymfocytů, které jsou zodpovědné za buňkami zprostředkovanou imunitu a dále také B-lymfocyty, jejichž úloha spočívá v produkci protilátek (Krejsek a kol. 2005).

### **1.2.1 Protinádorová imunologie**

Protinádorová terapie se už odedávna pokouší nalézt pochopení vzájemného vztahu nádoru a imunitního systému a využití této znalosti pro efektivní léčbu. V časných fázích vývoje nádoru je imunitní systém schopen kontrolovat růst nádorových buněk, s postupujícím růstem však začínají imunitní mechanismy selhávat a často dokonce podporují proliferaci nádorových buněk.

Nádorová imunologie má poměrně dlouhou historii. Za jejího zakladatele považujeme Paula Ehrlicha, který jako první přišel s hypotézou, že imunitní systém aktivně kontroluje orgány a tkáně tak, aby dokázal včas zachytit a zničit transformované buňky. Z řad praktických onkologů velmi významně přispěl k rozvoji oboru William Coley, který zavedl první úspěšnou imunoterapii, založenou na nespecifické aktivaci imunitního systému směsí bakteriálních kultur. Teoretické základy oboru byly položeny ve 40. a 50. letech, kdy se podařilo transplantovat nádor do inbredních kmenů myši. Díky tomu se podařilo ukázat, že u transplantovaného nádoru dochází k indukci specifické imunitní odpovědi (Hatina 2005).

### **1.2.2 Vzájemný vztah nádoru a imunitního systému**

Podle poznatků vědy prochází imunitní odpověď cílená proti nádorům třemi stádii. V prvním stádiu imunitního dozoru (immunosurveillance) rozpoznává imunitní systém maligní transformované buňky jako cizí látky a odstraňuje je dříve, než dají vznik tumoru. Tato teorie imunitního dozoru je podpořena i faktem, že u imunosuprimovaných pacientů bylo zaznamenáno větší procento vzniku nádorového onemocnění než u lidí s plně funkčním imunitním systémem. Další fází je stádium rovnováhy (equilibrium), při kterém zůstává populace nádorových buněk neměnná, klinicky ji však nemůžeme detekovat a ani imunitní systém ji nedokáže eliminovat. Pokud nádor unikne destrukčnímu působení imunitního systému (escape) dojde k plnému rozvinutí nádoru. Těchto únikových mechanismů využívají nádorové buňky celou řadu. (Finn 2008).

### 1.2.3 Mechanismy úniku imunitnímu systému

Nádorové buňky jsou schopny v průběhu nádorové proliferace aktivovat mechanismy úniku z imunitní kontroly, a díky tomu nejsou nijak omezovány ve svém růstu. Za některé tyto mechanismy jsou zodpovědné samotné nádorové buňky a na některých se podílí přidružené populace imunitních buněk a to především tumor asociované makrofágy (TAM) a CD4+CD25+ regulační lymfocyty. V zásadě můžeme tyto mechanismy přiřadit do dvou skupin - jedním z nich je mechanismus umlčení efektorů protinádorové imunity a druhý mechanismus spočívá ve ztrátě struktur, které se nacházejí na povrchu nádorových buněk a umožňují jejich rozpoznání imunitním systémem (Hatina 2005).

Jedním z nejdůležitějších mechanismů rezistence je odolávání nádorových buněk indukované apoptóze. Nádorové buňky exprimují na svém povrchu velké množství Fas ligandu. Fas ligand je transmembránový protein, který patří do rodiny TNF a interaguje s Fas receptorem, což vede k apoptóze citlivých cílových buněk. Nádorové buňky ale zabraňují expresi Fas receptoru na svém povrchu, přičemž produkce Fas ligandu je zvýšená. Kromě toho se také předpokládá, že produkování Fas ligandu nádorovými buňkami dokáže vyvolat apoptózu u Fas – pozitivních T lymfocytů, což vede ke snížení počtu efektorových buněk imunitního systému (Rabinovich a kol. 2010).

Dalším významným faktorem hrajícím roli ve snížené imunitní odpovědi vůči nádoru jsou proteiny typu DAF (decay accelerating factor) – CD55. DAF je membránový protein, který má za úkol regulovat C3 a C5 konvertázu z klasické i alternativní cesty komplementu. Jedná se o membránovou složku lidských erytrocytů, neutrofilů, lymfocytů, monocytů, krevních destiček a endoteliálních buněk. DAF funguje jako ochránce hostitelské buňky před poškozením autologně aktivovaným komplementem (Fujita a kol. 1987). Protein DAF byl také objeven u nádorových buněk řady tumorů, proto je považován za ochranný faktor pro nádorové buňky proti komplementem vyvolané cytotoxicitě (Koretz a kol. 1992).

Dalším možným způsobem jak se nádorové buňky vyhýbají imunitnímu systému, je ztráta rozpoznávacích struktur. Nejběžněji se jedná o ztrátu exprese MHC glykoproteinů I. třídy nebo o ztátu exprese tumor asociovaných antigenů. MHC I se nacházejí téměř na všech buňkách, prezentují antigenní peptidy patogenů a endogenní vlastní peptidy. MHC I jsou rozeznávány pomocí receptoru na povrchu T lymfocytů (TCR) a částečně také pomocí NK buněk. Ztráta exprese povrchových MHC I antigenů představuje jednu z nejdůležitějších strategií, jak se nádorové buňky vyhýbají cytotoxickým T lymfocytům. Ke ztrátě této exprese může dojít dvěma různými mechanismy. Jedním z nich může být ztráta chromozomu 6 (kde jsou kódované těžké řetězce MHC I) nebo částečnou delecí genu

případně transkripční chybou alely třídy I. Dalším možným mechanismem vedoucím ke snížení exprese MHC I může být buď ztráta nebo dysfunkce určitých genů (LMP2, LMP7, TAP-1, TAP-2) (Khanna 1998).

Velké množství lidských nádorů produkuje také enzym nazývaný indoleamin-2,3 dioxygenasa (IDO). Tento enzym obsahuje hem, který katalyzuje oxidativní rozpad tryptofanu přes kynureninovou dráhu. Byl znám již dříve díky své roli, kdy navozuje mateřskou toleranci proti antigenům plodu a nedávno byl také zaznamenán jako regulátor autoimunity. Bylo prokázáno, že nádory se zvýšenou expresí IDO rostou agresivněji a současně snižují akumulaci aktivovaných T-lymfocytů. Zajímavé je také zjištění, že při podávání IDO inhibitoru 1-metyltryptofanu dochází ke snížení velikosti nádoru a ke stimulaci protinádorové CTL odpovědi (Rabinovich a kol. 2010, Finn 2008).

Odlišným způsobem, kterým se nádorové buňky brání imunitnímu systému, je tvorba regulačních T-lymfocytů (Treg). Tyto Treg buňky jsou schopny účinné inhibice efektorových buněk (CTL), která může být způsobena buď přímým buněčným kontaktem nebo sekrecí imunosupresivních cytokinů a to především TGF- $\beta$  a IL10 (Hatina 2005).

Málo zmiňovaným problémem protinádorové imunitní odpovědi je imunodominance. Problém imunodominance spočívá v tom, že přestože nádorová buňka exprimuje na svém povrchu řadu epitopů, imunitní systém není schopen souběžně na ně reagovat. Předmětem imunitní odpovědi v daném čase se stává pouze několik málo antigenů, které se označují jako imunodominantní. Tato antigenní hierarchie napomáhá selekci a progresi nádorových klonů díky tomu, že ostatní antigeny se stávají pro imunitní systém neviditelnými (Hatina 2005).

### **1.3 Vrozená imunita a nádorová onemocnění**

Imunita vrozená je fylogeneticky starší složkou imunitního systému a setkat se s ní můžeme již u hlístic. Po setkání s patogenem se přirozená imunita ihned aktivuje, bohužel ale nedochází k tvorbě imunologické paměti. Součástí vrozené imunity jsou anatomické, fyzikální a chemické bariéry na povrchu těla. Po překonání těchto prvotních bariér, uplatňují svou funkci buňky nespecifické imunity, které mají schopnost internalizovat mikroorganismy, uvolňovat prozánětlivě působící látky a cytotoxicky ničit infekční agens nebo infikované buňky. Mezi buňky vrozené imunity řadíme makrofágy, granulocyty, dendritické buňky, žírné buňky a NK buňky (přirození zabíječi). Velmi důležitou roli hraje také humorální složka vrozené imunity, která zahrnuje komplementový a interferonový

systém. Ještě donedávna byla přirozená imunita považována za téměř bezvýznamnou primitivní složku imunitního systému, která pro svou funkci vyžaduje pomoc od specifické imunity. Tento pohled se změnil po zjištění, že buňky vrozené imunity mají na svém povrchu velké množství receptorů, které se nazývají PRRs (Pathogen Recognition Receptors). Tyto receptory mají za úkol rozeznávat nebezpečné vzory mikroorganismů PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns), které jsou nezbytné pro přežití mikroorganismu a proto je pro ně velmi obtížné je nějak změnit (Krejsek a kol. 2005, Medzhitov a Janeway 2000).

Jinými molekulárními vzory, díky kterým může imunitní systém rozpoznávat imunologické nebezpečí, jsou damage-associated molecular patterns (DAMPs). DAMPs jsou molekuly, které jsou upregulovány a uvolňovány během lýzy buněk a poškození tkání. Nalézt je můžeme během infekce a sterilního zánětu. Mezi zástupce DAMPs řadíme high mobility group box 1 (HMGB1), heat shock proteiny (HSPs) a kyselinu močovou (Turvey a Broide 2010).

### **1.3.1 PRRs – pathogen (pattern) recognition receptors**

Receptory PRRs můžeme najít na řadě efektorových buněk přirozené imunity, a to především na antigen prezentujících buňkách. Díky těmto receptorům je imunitní odpověď velmi rychlá, protože jakmile tyto receptory rozpoznají PAMPs spouští okamžitě své efektorové funkce a nečekají, až budou proliferovat. Podle funkce můžeme PRRs rozdělit do tří skupin: sekretované, endocytární a signální.

Endocytární receptory můžeme nalézt na povrchu fagocytů. Při rozpoznání PAMPs na povrchu mikrobiálních buněk zprostředkovávají tyto receptory dodání patogenů do lyzozomů, kde jsou zničeny. Proteiny odvozené od patogenu mohou být dále zpracovány a výsledný peptid může být prezentován pomocí hlavního histokompatibilního systému (MHC) na povrchu antigen prezentujících buněk. Mezi endocytární PRRs řadíme makrofágový receptor pro manózu (MR), Dectin-1 (receptor  $\beta$ -glukanu), formylpeptidové receptory (FPR) a scavengerové receptory.

Sekretované receptory působí jako opsoniny, protože se vážou na povrch mikrobiálních buněčných stěn a označují je, aby byly snadno rozpoznatelné komplementovým systémem a fagocyty. Nejznámějším receptorem této třídy je MBL (mannan-binding lectin).

Signální receptory mají za úkol rozpoznávat PAMPs a aktivovat dráhu signální transdukce, která indukuje expresi řady genů, které jsou zodpovědné za imunitní odpověď. Můžeme sem zařadit geny pro prozánětlivé cytokiny a některé kostimulační molekuly. Mezi signální receptory řadíme především membránově vázané TLR (Toll-like receptory), které pravděpodobně hrají zásadní roli v indukci imunitní a zánětlivé odpovědi (Medzhitov a Janeway 2000). Jednotlivé TLR jsou rozdílně rozloženy v buňce. TLR 1, 2, 4, 5, 6 a 10 jsou exprimovány na povrchu buněk, zatímco TLR 3, 7, 8 a 9 jsou v intracelulárních oddílech, jako jsou endozomy (fagolysozomy) (Takeda a Akira 2005).

Další skupinou signálních receptorů jsou cytoplazmatické NOD-like receptory (NLRs), které hrají významnou roli v rozpoznání intracelulárních patogenů. Rodina NLR zahrnuje několik podrodin, které jsou rozlišitelné podle jejich N-terminální efektorové domény. Existují čtyři tyto N-terminální domény: kyselá transaktivační doména, pyrinová doména (PYD), CARD (caspase recruitment domain) a BIR (baculoviral inhibitory repeat) – like doména. Významnou podrodinou je např. NLRCs (dříve NOD), kde NLRC1 rozpoznává mesodiaminopimelovou kyselinu a NLRC2 rozpoznává muramyl dipeptid, což jsou produkty získané z peptidoglykanu. Další podrodinou je NLRP, jejíž členové (NLRP1 a NLRP3) zprostředkovávají tvorbu inflamasomů, což jsou multiproteinové komplexy schopné aktivovat kaspázu-1. Tato aktivace vede k sekreci IL-1 $\beta$ , IL-18 a IL-33 (Ting a kol. 2008).

### **1.3.2 Komplement**

Komplement je souborný název komplexní skupiny asi třiceti proteinů a glykoproteinů, které můžeme nalézt v krvi, plasmě a na povrchu všech buněk obratlovců. Aktivace komplementu je kaskádový a postupný proces, kdy každý protein aktivuje nějaký další. Jednotlivé složky jsou označeny C1- C9 a názvy vznikajících produktů jsou vytvořeny přidáním malého písmene (C4a, C3b, atd.). Klíčovou událostí v aktivaci komplementu je tvorba enzymu C3-konvertázy, která štěpí složku C3. Tento krok se objevuje ve všech třech cestách aktivace komplementu. Těmito třemi cestami aktivace komplementu je klasická cesta, alternativní a lektinová cesta. Konečným produktem je potom komplex proteinů MAC (membrane attack komplex), který má schopnost narušovat membránu patogenů, což nakonec vede až k lýze bakteriální buňky (Pathak a Palan 2005).

Klasická cesta komplementu je zahájena vazbou a aktivací složky C1, ke které dochází pomocí komplexu antigen-protilátka. Schopnost navázat C1 složku komplementu mají jen

některé třídy imunoglobulinů, a to IgG a IgM. Lektinová dráha může být aktivována díky komplexu MBL (mannose-binding lectin) a s ním asociovanou serinovou proteázou (MASP1 nebo MASP2). Jakmile MBL naváže manan na povrchu mikroorganismů, MASP může štěpit a aktivovat C3, C4 a C2 složku komplementu. Posledním typem je dráha alternativní, která je aktivována působením řady mikroorganismů včetně bakterií, hub a prvoků. Ačkoliv je zahájení aktivace v zásadě proces nezávislý na protilátkách, agregované protilátky mohou zvýšit aktivační proces. Zásadním krokem pro aktivaci je vytvoření několika molekul C3b. Nativní C3 má thioesterovou vazbu, která má sklon spontánně hydrolyzovat. Stopové množství C3b může být tedy patrné i v normálním séru a za vhodných podmínek aktivovat alternativní cestu (Pathak a Palan 2005).

### 1.3.3 Cytokiny a rakovina

Cytokiny jsou sekretované polypeptidy, které ovlivňují téměř všechny biologické procesy v těle. Ovlivňují například embryonální vývoj, patogenezi onemocnění, nespecifickou odpověď na antigen, změny kognitivních funkcí a progresi degenerativních procesů stárnutí. Cytokiny můžeme nalézt také při diferenciaci kmenových buněk, mohou hrát roli v účinnosti vakcíny nebo při odmítnutí štěpu. Do skupiny označované jako cytokiny zařazujeme interferony, interleukiny, chemokiny, růstové faktory, tumor nekrotizující faktory a adipokiny. Jednotlivé cytokiny často vyvolávají syntézu jiného cytokinu, což vede ke kaskádovité reakci, kde konečné působení má až druhý nebo třetí cytokin. Působení cytokinů je velmi silné, proto i velmi malá koncentrace (pg) vyvolává biologickou odpověď. Podle funkce můžeme cytokiny dělit na prozánětlivé, mezi které řadíme např.  $\text{TNF}\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-8 a IFN $\gamma$ . Druhou skupinou jsou cytokiny protizánětlivé, jako je TGF- $\beta$ . Některé z těchto cytokinů mohou mít funkci jak prozánětlivou, tak protizánětlivou (Dinarello 2007, Shaikh 2011).

Významnou roli hrají cytokiny také v nádorovém bujení. Svým působením mohou buď potlačovat růst nádoru a jeho progresi nebo naopak mohou jejich růst podporovat, tlumit apoptózu a podpořit jejich invazivitu a metastazování (Dranoff 2004).

### **1.3.4 Přehled některých pro a protizánětlivých cytokinů a jejich role v nádorovém bujení**

#### **1.3.4.1 TNF $\alpha$ (tumor necrosis factor $\alpha$ )**

TNF $\alpha$  neboli kachektin se vyskytuje jako trimer a je jedním z produktů aktivovaných makrofágů/monocytů, fibroblastů, mastocytů, některých T lymfocytů a NK buněk. Jeho hlavní funkce spočívá v iniciaci zánětlivé odpovědi a vyvolání akutní fáze zánětu. TNF $\alpha$  může vyvolávat horečku, a to buď přímo stimulací syntézy PGE2 nebo nepřímo uvolněním IL-1. TNF $\alpha$  stimuluje produkci i dalších cytokinů jako např. IL-6, IL-8 a IFN $\gamma$  (Shaikh 2011).

TNF $\alpha$  produkovaný rakovinnými buňkami nebo buňkami zánětu, probíhajícího v okolí nádoru, může podporovat přežívání nádorových buněk prostřednictvím NF $\kappa$ B závislých apoptotických molekul. U TNF $\alpha$  bylo také zjištěno, že stimuluje iniciaci nádoru produkcí genotoxických molekul (např. NO a ROS), které mohou vést k poškození DNA a ke vzniku mutací. Produkce TNF $\alpha$  podporuje také progresi nádoru, podporuje angiogenezi a metastazování a dále také potlačuje imunitní dozor poškozením T buněk a cytotoxické aktivity aktivovaných makrofágů. Bylo pozorováno, že zvýšená produkce TNF $\alpha$  vede k nárůstu vzniku některých nádorů, jako například mnohočetného myelomu, hepatocelulárního karcinomu, rakoviny žaludku, prsu a některých dalších (Lin a Karin 2007).

#### **1.3.4.2 IL-1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ )**

IL-1 $\beta$  je produkován zejména mononukleárními fagocyty, fibroblasty, keratinocyty a dále také T a B lymfocyty. IL-1 $\beta$  hraje významnou roli v zánětlivém procesu, má degradační a růst podporující účinky a stejně jako TNF $\alpha$  může vyvolat horečku zvýšením syntézy prostaglandinu E2 (PGE2). Kromě toho může také podporovat uvolňování histaminu ze žírných buněk v místě zánětu. Tím histamin spouští brzkou vazodilataci a zvyšuje cévní propustnost. Prozánětlivá funkce IL-1 $\beta$  může být potlačena pomocí jeho antagonisty IL-1ra (IL-1 receptor agonist) (Shaikh 2011).

Svou roli hraje IL-1 $\beta$  také v nádorovém růstu, kde bylo prokázáno, že zvyšuje invazivitu a metastazování. Expresi IL-1 $\beta$  v místě vzniku nádoru zvyšuje expresi adhezních molekul na endoteliálních a maligních buňkách, usnadňuje vstup maligních buněk do krevního řečiště a jejich následné šíření do okolních tkání (Voronov a kol. 2002).



#### **1.3.4.3 IL-6 (interleukin-6)**

IL-6 je cytokin produkovaný řadou různých buněk zahrnujících mononukleární fagocyty, T-buňky a fibroblasty. Působí jako růstový faktor pro B-lymfocyty a podporuje jejich konečné dozrávání v protilátky produkující plasmatické buňky. Dále se také podílí na aktivaci a diferenciaci T-lymfocytů, napomáhá produkci IL-2 a jeho receptoru a naopak potlačuje tvorbu TNF. Ačkoliv je IL-6 většinou považován za prozánětlivý cytokin, protože iniciuje tvorbu proteinů akutní fáze zánětu, vykazuje také protizánětlivé vlastnosti. IL-6 snižuje tvorbu jiných cytokinů jako např. IL-1 nebo TNF, takže snižuje tvorbu prozánětlivých cytokinů a naopak mírně zvyšuje syntézu protizánětlivých cytokinů (např. IL-10, TGF) (Shaikh 2011).

Své opodstatnění má IL-6 také v tumorigenezi, kde podporuje proliferaci maligních buněk a potlačuje jejich apoptózu, může mít ale i funkci opačnou, kdy tlumí růst buněk. Je známo, že hraje zásadní roli v růstu lidského mnohočetného myelomu, bylo zaznamenáno také zvýšené riziko vzniku Hodgkinova lymfomu a Kaposiho sarkomu (Lin a Karin 2007).

#### **1.3.4.4 IL-8 (interleukin-8)**

IL-8 patří do skupiny tzv. chemokinů, a je tedy zodpovědný za chemotaktickou migraci a aktivaci neutrofilů a dalších buněk (jako jsou monocyty, lymfocyty, basofily a eozinofily) v místě zánětu. Hlavní zánětlivá funkce tohoto interleukinu je dána jeho chemotaktickými účinky na neutrofile a schopností stimulovat granulocytární aktivitu. Díky této funkci byl dříve nazýván neutrofilní chemotaktický faktor (NCF) nebo neutrofile aktivující protein (NAP-1). Kromě toho je IL-8 společně s IL-1 a TNF $\alpha$  zahrnut do náboru neutrofilů, ke kterému dochází pomocí upregulace exprese buněčných adhezivních molekul (ELAM-1, ICAM-1), čímž zvyšuje adheenci neutrofilů k endoteliálním buňkám a usnadňuje jejich diapedézu přes stěny cév (Shaikh 2011).

Zvýšená exprese IL-8 (nebo jeho receptorů) byla zaznamenána na rakovinných buňkách, endoteliálních buňkách, infiltrujících neutrofilech a makrofázích asociovaných s nádory (TAM), což poukazuje na to, že tento interleukin může působit jako důležitý regulační faktor vyskytující se v mikroprostředí nádoru. Zvýšená produkce IL-8 podporuje také angiogenezi, proliferaci, metastazování, prodlužuje přežití endoteliálních a rakovinných buněk a zesiluje jejich migraci do místa nádoru (Waugh a Wilson 2008).

#### **1.3.4.5 IFN $\gamma$ (interferon $\gamma$ )**

IFN $\gamma$  dříve nazývaný makrofágy aktivující faktor vyvolává stimulaci makrofágů, čímž dochází k přímé antimikrobiální a antitumorální aktivitě. Je produkován převážně T-lymfocyty, NK buňkami, dendritickými buňkami a makrofágy. IFN $\gamma$  řídí růst, dozrávání a diferenciaci různých typů buněk, dále také zvyšuje aktivitu NK buněk a reguluje funkce B-lymfocytů, jako je například produkce imunoglobulinů. Většina těchto procesů vyvolaných IFN $\gamma$  vede ke zvýšenému imunitnímu dozoru a zvýšené funkci během infekce (Schroder a kol. 2004).

IFN $\gamma$  má oproti většině cytokinů protinádorové účinky. V případě nedostatku tohoto interferonu byla zaznamenána zvýšená tvorba nádoru, způsobená mnoha mechanismy. Mezi tyto mechanismy můžeme zařadit oslabení kontroly růstu cílových buněk a apoptózy, zvýšenou angiogenezi a zhoršené hojení ran. Špatná buněčná imunita má významnou roli v tom, že IFN $\gamma$  může zvýšit expresi MHC I na nádoru a tím zvýšit imunogenicitu (Dranoff 2004).

#### **1.3.4.6 TGF- $\beta$ (transforming growth factor $\beta$ )**

Tento cytokin je produkován T-lymfocyty, destičkami a monocyty. Inhibuje proliferaci a aktivaci T-lymfocytů a NK buněk a může hrát významnou roli při zánětu. V místě zranění je TGF- $\beta$  uchováván v destičkách a uvolní se po degranulaci, tím pak ovlivní monocyty a jiné leukocyty v tomto místě. TGF- $\beta$  má schopnost pozitivně ovlivňovat svoji vlastní produkci a také vývoj a ukládání buněk extracelulární matrix. Podílí se také na zvýšené expresi integrinů vedoucích ke zvýšené adhezi buněk. Jako některé jiné cytokiny má i TGF- $\beta$  jak prozánětlivé tak protizánětlivé účinky. Jeho produkce může působit antagonisticky na jiné cytokiny nebo růstové faktory, nebo může pozměňovat jejich funkci. Přítomnost ostatních cytokinů může formovat odpověď na TGF- $\beta$ , a konečný efekt se může lišit v závislosti na aktivačním stavu buňky. TGF- $\beta$  často zvyšuje imunitní aktivitu v lokálních tkáních a naopak potlačuje imunitní odpověď v cirkulaci (Shaikh 2011).

TGF- $\beta$  může působit buď jako tumor supresor nebo také jako významný stimulator nádorového růstu, invaze a metastazování. V časných stádiích tvorby nádorů působí tento cytokin přímo na nádorové buňky a potlačuje nádorový růst. Nicméně, jak nádor roste, genetické a/nebo biochemické změny umožní TGF- $\beta$  podporovat progresi jak samotné nádorové buňky tak také nemaligní stromální buňky. Například karcinomy často vylučují zvýšené množství TGF- $\beta$  a tím dochází ke zvýšené invazi tkáně a metastazování. Změny vyvolané produkcí TGF- $\beta$  v mikroprostředí nádoru podporují angiogenezi a potlačují

nádorově specifické CD8<sup>+</sup>T lymfocyty, což také vede k vývoji nádoru. TGF- $\beta$  je považován za nejdůležitější cytokin podporující expresi Foxp3 a vývoj Treg. Tyto CD4<sup>+</sup> Treg buňky mohou významně potlačovat imunitní odpověď hostitele, navodit vlastní toleranci a navíc také mít inhibiční účinek na nádorovou imunoterapii. Treg hrají důležitou roli také v udržování periferní imunitní tolerance. Treg inhibuje proliferaci a efektorové funkce běžných CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> T lymfocytů, natural killer T (NKT) buněk, B lymfocytů, dendritických buněk, NK buněk a monocytů/ makrofágů, čímž dochází k zvýšení progresu nádoru. Oba tyto imunologické mediátory (TGF- $\beta$  a Treg) působí společně, protože TGF- $\beta$  podporuje tvorbu Treg a zároveň je druhem cytokinu produkováný těmito buňkami a také samotnými nádorovými buňkami. Konečná funkce TGF- $\beta$  a to jak supresivní nebo progresivní může být závislá na stupni a typu nádorových buněk (Lin a Karin 2007, Maeda Oda a kol. 2012).

### **1.3.5 Buňky vrozené imunity podílející se v protinádorové aktivitě**

Přirozený imunitní systém člověka je složen z různých typů imunitních buněk, jsou to zejména neutrofilů, monocytů/makrofágů, mastocytů, přirození zabijáči (NK buňky) a dendritické buňky. Tyto buňky produkují řadu rozpustných mediátorů, které společně s imunitními buňkami tvoří účinný obranný mechanismus proti patogenním mikroorganismům (Kumar a Sharma 2010).

#### **1.3.5.1 Neutrofilů**

Neutrofilů (polymorfonukleární lymfocyty PMN) jsou velmi důležitou složkou vrozené imunity a hrají zde první linii obrany. Neutrofilů jsou považovány za silné zánětlivé buňky, které způsobují zánětlivé poškození tkáně. Kromě zánětu působí také jako první buňky, které migrují do místa infekce nebo zánětu, aby zamezily působení infekční částice a odstranily ji. Dále také vysílají signály ostatním buňkám vrozené imunity, aby upozornily na cizí hrozbu (Kumar a Sharma 2010).

Aktivní vycestování neutrofilů do místa zánětu je pro vrozenou imunitu velmi důležité. Tento několikastupňový proces zahrnuje mobilizaci neutrofilů z cirkulace a kostní dřeně vyvolanou chemotaktickými faktory. Jedním z nejsilnějších chemoatraktantů pro neutrofilů je interleukin 8 (IL-8). Bakterie také produkují molekuly, jako je např. N-formylovaný peptid, které přímo lákají neutrofilů do místa své produkce. Hlavní funkcí těchto chemoatraktantů je, že mohou pomoci neutrofilům silněji působit, a tím usnadňují obranu hostitele (Kobayashi a kol. 2005).

Ukazuje se, že neutrofilů jsou velmi důležité pro zvýšenou adhezi, fagocytózu, produkci ROS (reaktivních forem kyslíku), sekreci cytokinů, syntézu leukotrienů, degranulaci a baktericidní aktivitu.

K fagocytóze dochází díky tomu, že na povrchu neutrofilů je řada receptorů rozpoznávajících nejrůznější PAMPs. Těmito receptory jsou především TLRs, CD14 a receptory rozpoznávající peptidoglykany. Fagocytóza mikroorganismů spouští generaci superoxidových radikálů a dalších sekundárně odvozených ROS, jako je peroxid vodíku, kyselina chlorná, hydroxylové radikály a chloraminy, které působí jako silné mikrobicidní látky. Současně s produkcí ROS, cytoplazmatická granula fúzí s fagozomy obsahujícími bakterie (degranulace), tím obohatí lumen vakuoly o antimikrobiální peptidy a proteázy (Kobayashi a kol. 2005).

Ukázalo se, že mikrobicidní aktivita ROS je výrazně zvýšena pomocí myeloperoxidázy (MPO), což je hojně se vyskytující hemoprotein uchovávaný v azurofilních granulech. Během aktivace buňky je MPO zaměřena na vytvoření fagozomu a katalyzuje reakci s chloridem a peroxidem vodíku a dává vznik kyselině chlorné, což je silná mikrobicidní látka. Zajímavé ale je, že lidé s deficitem MPO nejsou náchylnější k infekcím, a pravděpodobně superoxid, peroxid vodíku a komponenty granul mohou velmi dobře kompenzovat tento nedostatek (Kobayashi a kol. 2005).

Fagocytóza neutrofilů vyvolává mobilizaci cytoplazmatických granul, které poté buď splynou s plazmatickou membránou (exocytóza) nebo s fagozomem. Pokud dojde ke splynutí azurofilních granul s fagozomem, obohatí se lumen vakuoly velkým počtem antimikrobiálních peptidů včetně  $\alpha$ -defensinů, katepsinů, proteinasy 3, elastazy, azurocidinu a lysozomu. Degranulace také obohacuje fagozom komponenty specifických granul jako je flavocytochrom  $b_{558}$  a laktoferin, které zvyšují antimikrobiální potenciál (Kobayashi a kol. 2005).

Jak již bylo zmíněno při degranulaci, pro správnou funkci jsou neutrofilů naplněné řadou různých cytotoxických granul obohacených různými antimikrobiálními molekulami, jako jsou kationické peptidy, proteázy, laktoferin, myeloperoxidáza a další. Na základě přítomnosti nebo chybění myeloperoxidázy (MPO) můžeme tato granula rozdělit na peroxidáza pozitivní granula (také známé jako primární azurofilní granula) nebo peroxidáza negativní granula (tzv. specifická nebo sekundární granula). Exocytóza těchto neutrofilních granul je velmi významná. Granula, která jsou tvořena v dřívějších fázích zrání neutrofilu (jako jsou azurofilní a specifická granula), vykazují velmi malou schopnost exocytózy během infekce nebo zánětu. Naopak ale granula, která jsou tvořena později při zrání

neutrofilu např. želatinasová granula a sekretované vezikuly, vykazují exocytózu daleko snadněji (Kumar a Sharma 2010). K přesunu a exocytóze granul vyžaduje neutrofil zvýšené množství intracelulárního  $\text{Ca}^{2+}$ , dále také hydrolyzu ATP (adenosintrifosfátu) a GTP (guanosintrifosfátu). Je pravděpodobné, že tento proces zahrnuje aktivaci a nábor mnoha různých signálních molekul, z nich pouze některé jsou známy (Lacy 2006).

Další možností, jak může neutrofil regulovat zánětlivé procesy nebo odstraňovat mikroby, je vytvoření extracelulárních sítí NETs (neutrophil extracellular traps). Tyto sítě jsou vytvářeny v důsledku extracelulárního uvolňování jaderného obsahu. NETs jsou složeny z rozvolněného chromatinového materiálu a některých granulárních a cytoplasmatických proteinů. Tyto sítě dokážou navázat jak G- tak G+ bakterie, a díky vysokému obsahu serinové proteázy mohou snadno zničit faktory virulence a usmrtit bakterie. V nedávné době byly popsány dva typy těchto sítí. Při prvním se NETs uvolňují z umírajících neutrofilů, a tak zahrnují mechanismus buněčné smrti. V druhém mechanismu dochází k uvolňování chromatinu společně se serinovými proteasami z nepoškozených neutrofilů. K prvnímu mechanismu tvorby NETs dochází po 2-3 hodinách po vystavení forbol myristát (PMA), který je součástí některých bakterií (*S. aureus*, *C. albicans*). Druhý proces nastává po rozpoznání LPS nebo patogenních bakterií pomocí neutrofilů nebo krevních destiček. Tvorba těchto typů sítí nastává velmi rychle a to v řádu několika minut po vystavení podnětu. Tento druhý typ tvorby sítí je spojen s cévní obstrukcí, která je pozorována během sepse. V průběhu těžké sepse působí destičky prostřednictvím TLR 4 jako barometr pro systémové infekce. Destičky se vehementně vážou k izolovaným neutrofilům a to vede během několika minut k tvorbě sítí. Tyto sítě přítomné v krevním oběhu mohou způsobit poškození endoteliálních buněk a poškození jater. Přesný molekulární mechanismus tvorby NETs je nejasný a předpokládá se, že významnou roli hrají reaktivní formy kyslíku (ROS). Tvorba těchto sítí pomáhá omezit vliv infekce a zánětu uvolněním protizánětlivých lipoxinů a snížením množství patogenů (Kumar a Sharma 2010).

#### **1.3.5.1.1 Role neutrofilů v nádorovém bujení**

Neutrofilové hrají významnou roli také v obraně proti nádorům. Bylo prokázáno, že infiltrace leukocytů v nádoru zlepšuje jejich prognózu a jsou aktivní v imunitním dozoru proti některým nádorům. Tyto výsledky jsou pravděpodobně závislé na druhu a množství cytokinů a chemotaktických faktorů běžně vylučovaných nádorovými buňkami, dále je také důležitý nábor a aktivace neutrofilů. Tyto rekrutované neutrofilové produkují několik cytotoxických mediátorů včetně reaktivních forem kyslíku, proteáz, látek poškozujících

membrány a rozpustné mediátory, které se účastní buněčného zabíjení. Řadíme sem TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  a IFNs. Podrobné zkoumání cytolytického působení polymorfonukleárů zdůrazňuje zásadní roli kyseliny chlorné ve zprostředkování lýzy nádorových buněk. Kromě toho kyselina chlorná reaguje s primárními aminy a vytváří relativně stabilní chloraminy s imunostimulačními vlastnostmi. Ačkoliv jsou kyslíkové a dusíkové meziproducty toxické molekuly, které se podílejí na kontrole nádorů, podílejí se také na potlačení proliferace T-lymfocytů. Další mechanismus, kterým neutrofilý zabíjí nádorové buňky, je na protilátkách závislá buněčná cytotoxicita (ADCC). Významné jsou také antimikrobiální peptidy nazývané defenziny, které jsou nejhojnější složkou azurofilních granul a jsou vysoce toxické proti některým typům nádorových buněk. Histologické a ultrastrukturální pozorování nádorového růstu ukazuje, že poškození způsobené neutrofilý má dvě formy- jednou z nich je kolikvační nekróza, kde převládá cytotoxicita proti nádorovým buňkám, druhou formou je ischemická nebo hemoragická nekróza, při které je hlavním cílem poškození cévního endotelu (Di Carlo a kol. 2001).

Zapomínat bychom neměli také na tumor-asociované neutrofilý (TANs), jejichž funkce je často podceňována. Je známo, že nádorové buňky produkují řadu zánětlivých cytokinů včetně neutrofilý přitahujícího CXC-chemokinu. Přímý vliv TANs na prognózu nádorového onemocnění zatím nebyl důkladně vyšetřován, ale jsou zde předpoklady, že TANs zvyšují progresi specifických nádorů. Zajímavá byla například studie, kdy nedostatek neutrofilů v nádoru vedl k inhibici růstu sarkomu (Pekarek a kol. 1995). Později se tímto problémem zabývaly i další studie, zde byly ale popsány mechanismy odlišné a zahrnovaly uvolnění hepatocytárního růstového faktoru uloženého v granulích a produkce onkostatinu M (Queen a kol. 2005). Zajímavý je také fakt, že elastáza uvolňovaná z granul neutrofilů je vychytávána specifickými endosomálními kompartmenty přilehlé epiteliální nádorové buňky, kde následně hydrolyzuje insulin receptor substrát 1 (ISR1). Ten se váže na fosfoinositid 3-kinasovou (PI3K) podjednotku a blokuje jeho interakce s destičkovým růstovým faktorem (PDGFR) (Houghton a kol. 2010). Za těchto podmínek pak elastáza rozpoutá aktivitu nádoru díky PDGFR-PI3K dráze. Dále bylo také zjištěno, že snížení pronádorové funkce TANs je důležitým aspektem protinádorové aktivity IFN $\beta$ . TAMs (tumor-asociované makrofágy) a TANs jsou také silnými aktivátory nádorové angiogeneze. (Mantovani a kol. 2011).

### 1.3.5.2 Makrofágy

Tkáňové makrofágy jsou velmi heterogenní skupinou buněk vznikající z cirkulujících monocytů. Tato velká skupina makrofágů může být rozpoznána díky znaku na povrchu membrány, který je označen CD68. Makrofágy plní řadu významných funkcí vrozené imunity, ale také jsou pravděpodobně zařazeny do udržování tkáňové homeostázy, regulace hematopoézy, chronického zánětu, aterosklerózy, léčby poranění a opravy tkání. Nejvýznamnější funkcí makrofágů je jejich schopnost požít částice prostřednictvím fagocytózy. Makrofágy rozpoznávají patogenní částice díky různým druhům PRRs na jejich povrchu, včetně lektinových, Toll-like receptorů a N-formylmetionin peptidových receptorů. Makrofágy také produkují řadu cytokinů, chemokinů a antimikrobiálních látek. Produkce těchto mediátorů může vést k autokrinní aktivaci makrofágů vazbou cytokinů na cytokinové receptory nebo přeměnou buňky zahrnuté v adaptivní imunitě prostřednictvím sekrece chemokinů. Makrofágy zabíjí patogenní mikroorganismy použitím množství antimikrobiálních efektorových mechanismů, které zahrnují enzymatickou degradaci, oxidaci, omezení živin a antimikrobiálních peptidů. Po internalizaci a požití patogenu prezentuje makrofág antigeny dále T-lymfocytům, a tím zesiluje specifickou imunitní odpověď (Bowdish a Gordon 2007).

Nádory jsou hojně osídlené makrofágy, a ačkoliv jsou většinou součástí protinádorové odpovědi, může dojít i k opačnému problému, kdy makrofágy nádor podporují jak v jeho iniciaci, progresi, tak metastazování. Těmto makrofágům se říká tumor asociované makrofágy (TAMs). V reakci na přetrvávající infekci syntetizují tyto makrofágy zánětlivé cytokiny, které zapojují další buňky imunitního systému do procesu sloužícího k udržení chronického zánětu, který má pravděpodobně zásadní roli v iniciaci nádoru a jeho podporování. U již vzniklých nádorů TAMs stimulují migraci nádorových buněk, invazivitu, intravasaci a také angiogenezi potřebnou k nádorovému růstu (Wynn a kol. 2013).

### 1.3.5.3 NK (natural killers) buňky

NK buňky jsou velké granulární lymfocyty, které jsou považovány za velmi důležitou komponentu vrozené imunity a tvoří přibližně 5-10% mononukleárních buněk v periferní krvi. Na povrchu NK buněk můžeme nalézt řadu molekul, které plní funkci receptoru pro cytokiny, chemokiny a adhezivní molekuly, nemají exprimován receptor pro T-lymfocyty, jsou CD3 negativní. Veškeré NK buňky nesou membránovou molekulu CD7. Jako hlavní membránová molekula NK buněk je považována neurální buněčná adhezivní molekula – NCAM, která nese označení CD56. Na povrchu NK buněk nalezneme ještě FcRγIII receptor

označovaný jako CD16. Významnou funkcí NK buněk je to, že po kontaktu s poškozenou buňkou dokážou rychle reagovat i bez předchozí senzibilizace a cytotoxická reakce nevykazuje závislost na přítomnosti antigenů hlavního histokompatibilního systému. NK buňky mají schopnost produkovat řadu cytokinů (jako je např. IFN- $\gamma$ , GM-CSF a TNF- $\beta$ ) a dále také chemokinů. NK buňky hrají významnou roli také v imunitě bojující proti nádorovému růstu. Bylo prokázáno, že přítomnost cytotoxických buněk v nádorové tkáni je spojena s příznivější prognózou nádorového onemocnění (Kopecký a Kopecký 2010, Caligiuri 2008).

#### **1.3.5.4 Dendritické buňky**

Dendritické buňky jsou specializované leukocyty získávané z kostní dřeně, které jsou velmi významné pro vývoj imunity. Svoji úlohu hrají jak ve vrozené imunitě, kde fungují jako antigen prezentující buňky, tak v imunitě získané, protože působí jako účinné stimulatory T a B lymfocytů. Nedávné studie vyzdvihují důležitost dendritických buněk v počátečních fázích vrozené imunity a periferní tolerance. Všechny dendritické buňky musí být vyztřalé, aby se staly plně imunogenní. Existuje mnoho podnětů, které stimulují zrání dendritických buněk. Toto zrání zajišťuje, že se DC nepřemění na méně zralé nebo méně imunogenní formy. K zachycení a odstranění mikrobiálních patogenů využívají dendritické buňky fagocytózu, endocytózu, pinocytózu a specifické receptory, jako jsou např. TLRs. Pro zrání DC jsou také často využívány kombinace zánětlivých cytokinů jako je IL-1, TNF, IL-6 a PGE2 (Rossi a Young 2005).

Dendritické buňky je možné použít k imunoterapii nádorového onemocnění, kde je využita jejich funkce v prezentování antigenů. DC mají schopnost prezentovat s nádory asociované antigeny T lymfocytům a tím vytváří tumor specifickou imunitu (Fong a Engleman 2000).

#### **1.3.5.5 Žírné buňky (mastocyty)**

Žírné buňky jsou buňky vyskytující se v různých tělních tkáních s podobnou funkcí, jakou mají bazofilní granulocyty v krvi. Tyto buňky obsahují velký počet granul, které obsahují heparin, serotonin, histamin, tryptázu a chymázu. Žírné buňky vznikají z hematopoetické kmenové buňky, necirkulují v krvi, ale zůstávají v tkáni. Žírné buňky mohou působit buď jako pozitivní nebo negativní regulátory imunitní odpovědi. Jiné buňky mohou ovlivňovat buď prostřednictvím řady rozpustných mediátorů, nebo díky přímé buněčné interakci. Mastocyty můžeme nalézt v řadě nádorů, kde slouží buď k odmítnutí



nádoru, nebo naopak k jeho podpoře. Žírné buňky mohou přímo ovlivňovat proliferaci a invazivitu, ale také mohou modulovat imunitní odpověď k nádorovým buňkám. Mastocyty také mobilizují T-lymfocyty a APC buňky (Khazaie a kol. 2011).

### **1.3.6 Terapie nádorů založená na stimulaci vrozené imunity**

Léčba nádorů pomocí vrozené imunity byla známá již od 19. století a to díky chirurgovi Williamu Coleyovi, který si všiml, že infekční onemocnění kůže vyvolané bakterií *Streptococcus pyogenes*, má pozitivní vliv na léčbu nádorového onemocnění (Coley 1891). Pro zlepšení terapeutických výsledků vytvořil směs bakteriálních kultur *Streptococcus pyogenes* a *Serratia marcescens*, která byla nazvána Coley toxin. Použitím tohoto preparátu se stal průkopníkem v léčbě nádorů stimulované vrozenou imunitou (Coley 1910)

Později byla k léčbě nádorů využívána i bakterie *Mycobacterium bovis*, která je součástí atenuované vakcíny BCG (bacille Calmette-Guérin) složící původně k léčbě tuberkulózy. K léčbě nádorů se používá BCG vakcína od 30. let 20. století a jako účinné terapeutikum nádorů močového měchýře slouží dodnes (Meyer a kol. 2002).

Velmi významná jsou také pozorování prof. Cui, který tvrdí, že vrozená imunita dokáže zničit i plně rozvinutý nádor. Ve svých pokusech pracoval na myších BALB/c s transplantovaným sarkomem 180. Během pokusů se mu podařilo nalézt speciální dědičnou mutaci SR/CR, díky které myši vykazují schopnost spontánní regrese (SR) nebo dokonce úplné rezistence vůči nádoru (CR). Myši s touto mutací odolávají vysokým dávkám nádorových buněk, které jsou pro normální myši smrtelné. Po transplantaci nádorových buněk došlo k masivní infiltraci leukocytů (převážně neutrofilů, makrofágů a NK buněk), které začaly s buňkami nádorů vytvářet shluky a rozety (Cui a kol. 2003, Hicks a kol. 2006).

V posledních letech je snaha o stimulaci vrozené imunitní odpovědi především použitím různých syntetických analogů agonistů TLR receptorů. Tito agonisté stimulují mechanismy vrozené imunity, tedy aktivují NK buňky, monocyty a makrofágy a dále také podporují produkci některých cytokinů (INF $\alpha$ , INF $\gamma$  a TNF $\alpha$ ) (Kanzler a kol. 2007).

Agonisté TLR vyvolávají imunitní odpověď několika různými mechanismy. Jednou z možností je, že přímo zabíjejí jak nádorové, tak také buňky vaskulárního endotelu. Dále může dojít k přilákání leukocytů, k aktivaci lytické aktivity NK buněk a cytotoxických T-lymfocytů a zvýšené citlivosti nádorových buněk k efektorovým molekulám. Problém léčby pomocí TLR agonistů spočívá v jejím možném zvratu na léčbu podporující růst nádoru. K tomu může dojít potlačením imunitní odpovědi způsobené produkcí různých

imunosupresivních faktorů, podporou růstu nádorových buněk a angiogeneze a tvorbou cytoprotektivních a protiapoptotických faktorů. Díky těmto objevům můžeme považovat terapii pomocí agonistů TLR za dvojsečnou. Tento efekt může být dán množstvím agonistů TLR, kdy vysoké dávky mají protinádorový efekt, zatímco nižší dávky mohou růst nádoru podporovat. Účinný terapeutický efekt může mít také kombinace agonistů TLR, například spojení TLR4 a TLR9 (Maruyama a kol. 2011).

V již prováděných pokusech byly použity např. agonisté TLR 9, což jsou nemetylované CpG motivy bakteriální DNA. Tento agonista byl v nedávné době testován v klinických studiích na pacientech s glioblastomem (Carpentier a kol. 2006). Na myších modelech byl testován také agonista TLR7 a 8, známý pod názvem Imidazoquinolin, který vykazoval výrazný terapeutický efekt např. u myšího karcinomu ledvin (Kauffman a kol. 2012). Dalším zkoušeným agonistou TLR 7 je Loxoribine, který vykazoval terapeutický vliv na B buněčnou chronickou lymfatickou leukémií (Goodman a kol. 1994).

V současné době je zaměřena pozornost také na agonisty fagocytárních receptorů, které ve spolupráci se signálními ligandy dokážou vyvolat silnou imunitní odezvu (Underhill a Gantner 2004). Výrazný terapeutický účinek byl pozorován u myši s transplantovaným melanomem, které byly léčeny směsí agonistů fagocytárních a signálních receptorů. Velmi dobré výsledky vykazoval například manan ve spojení s LPS, laminarin + LPS (Janotová a kol. 2014) nebo Zymosan + LPS (Waldmannová 2012). Problém terapie ale spočívá ve vysoké toxicitě LPS, proto cílem dalších pokusů je nalézt jeho adekvátní náhradu (Ženka, ústní sdělení).

## **1.4 Terapie nádorů pomocí směsi ligandů fagocytárních a signálních receptorů (Zymosan-BAM+LPS a manan-BAM+LPS) ukotvených na nádorové buňky**

### **1.4.1 Zymosan**

Zymosan je přípravek získávaný z buněčné stěny kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* a skládá se z protein-karbohydrátových komplexů. Hlavní polysacharidovou složkou je  $\beta$ -glukan a manan. Postup získávání Zymosanu z této kvasinky byl zveřejněn už v roce 1941 a to Pillemerem a Eckerem, kteří Zymosan popsali jako jemný světlý prášek, který není rozpustný ve vodě, organických ani zásaditých rozpouštědlech (Pillemer a Ecker 1941).

Zymosan vykazuje specifické imunologické vlastnosti - stimuluje receptory TLR2 a Dectin-1, reguluje sekreci cytokinů u dendritických buněk a makrofágů a navozuje imunologickou toleranci (Dillon a kol. 2006).

### 1.4.2 Manan

Manan je velmi důležitým stavebním prvkem v řadě buněčných stěn kvasinek a bývá tedy považován za jejich hlavní antigenní determinantu. Je to vysoce větvený polysacharid, který se skládá převážně z D-manózy. Manan je běžně spojen s různým množstvím proteinů a fosfátů a dále také může obsahovat malé množství N-acetyl-D-glukosaminu a jiných cukrů. K hlavnímu  $\alpha(1\rightarrow6)$  řetězci mananu jsou připojeny postranní  $\alpha(1\rightarrow2)$  a  $\alpha(1\rightarrow3)$  řetězce. Z buněčných stěn kvasinek je možné izolovat také komplexy manano-proteinů, ale existuje málo informací o tom, jak jsou tyto sacharidy a bílkoviny spojeny (Jones a Ballou 1969, Cawley a Ballou 1972).

#### 1.4.2.1 Receptory rozpoznávající manan

**Mannan-binding lectin** je  $\text{Ca}^{2+}$  dependentní lektin patřící do kolektinové rodiny a rozpoznává řadu specifických cukrů, jako je například D-manoza, N-acetylglucosamin (GlcNAc), N-acetylmanosamin (ManNAc) a L-fukosa. Protein má oligomerní strukturu, kde každá z podjednotek obsahuje tři identické polypeptidové řetězce. Každý z řetězců je tvořen C-terminální karbohydrát rozpoznávající doménou (CRD), kolagenní oblastí, hydrofobní oblastí a N-terminální na cystein bohatou oblastí. MBL rozpoznává patogeny a poškozené buňky tím, že se váže na karbohydrátové zbytky mikroorganismů a jejich pozměněné povrchy (Dinasarapu a kol. 2013, Selander 2006). MBL je schopen aktivovat lektinovou dráhu komplementu ve spolupráci s MASP-2 (MBL-associated serine protease). Díky této aktivaci dochází ke štěpení C4 a C2 složky a vzniká klasická C3 konvertáza (C4bC2a) (Ip a kol. 2009). Komplementová kaskáda může vést k tvorbě terminálního komplexu, který působí cytotoxicky, nebo na úrovni C3b dochází k opsonizaci. Opsonizované částice jsou pak snadno rozpoznávány řadou fagocytárních receptorů. MBL hraje roli také v modulaci zánětu a to díky tomu, že stimuluje produkci cytokinů a interleukinů a to především TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  a IL-6 (Dinasarapu a kol. 2013).

**Manózový receptor (MR,CD206)** je endocytární receptor, který váže sacharidy, především manózu a je exprimován na povrchu makrofágů, dendritických buněk a nevasculárním endotelu. Extracelulární oblast tohoto receptoru je tvořena třemi typy domén

– N terminální CR doménou, fibronectinem typu II (FNII) a několika CTLDs (C-type lectin-like domains). Tomuto receptoru je připisována řada funkcí, mezi které patří například odstranění endogenních molekul, podpora prezentace antigenu a modulace buněčné aktivity. Funkce tohoto receptoru může být změněna díky proteolytickému štěpení a změnám v glykosylaci a konformaci (Martinez-Pomares 2012).

### 1.4.3 Beta-glukan

Beta-glukany jsou polysacharidy složené z D-glukózových jednotek. Běžně se vyskytují v přírodě a můžeme je tedy nalézt v obilovinách, rostlinách, řasách, bakteriích, houbách a buněčných stěnách kvasinek. Primární řetězec je tvořen z  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 3) glykosidicky vázaných D-glukopyranózových jednotek, ke kterým jsou připojeny postranní řetězce vazbou (1 $\rightarrow$ 6). Beta-glukany mají schopnost stimulovat imunitu. To je způsobeno zvýšením fagocytózy a tedy i zvýšením počtu profesionálních fagocytů jako jsou granulocyty, monocyty, makrofágy a dendritické buňky. Dále také beta-glukany vykazují protizánětlivou, antimikrobiální i protinádorovou aktivitu (Zeković a kol. 2005, Větvicka a Větvickova 2009).

#### 1.4.3.1 Receptory rozpoznávající beta-glukan

**Komplementový receptor 3 (CR3)** se nachází na NK-buňkách, neutrofilech a lymfocytech. Po navázání  $\beta$ -glukanu na tento receptor dojde k jeho aktivaci, která směřuje k degranulaci buňky, a tím uvolnění bakteriolytických a bakteriostatických molekul. K aktivaci dochází pouze v případě, že se na část tohoto receptoru naváže také složka komplementu iC3b, přítomná na cílové buňce. V tomto aktivovaném stavu pak buňky zůstávají 18–24 hodin (Végh 2009, Větvicka 2004).

**Dectin-1** je významný lektinový receptor, který je specifický pro beta-glukan a můžeme ho nalézt na povrchu makrofágů a neutrofilů. Dectin-1 je typ II transmembránového proteinu s lektinovou doménou typu C v extracelulární oblasti a ITAM motivem v intracelulární doméně. Tento receptor rozeznává 1,3 a 1,6- $\beta$ -glukany, což vede k množství buněčných odpovědí včetně fagocytózy, endocytózy a oxidativního vzplanutí. Dectin-1 ve spolupráci s TLR2 vyvolává produkci řady prozánětlivých cytokinů a chemokinů (Zeković a kol. 2005).

**TLR 2** je členem TLR rodiny (Toll-like receptory), která je nezbytná pro fungování vrozené imunity. Aktivací těchto receptorů dojde ke spuštění produkce prozánětlivých cytokinů (např. IL-1, IL-6, TNF, IL-8) a některých adhezivních a kostimulačních receptorů na povrchu antigen prezentujících buněk. TLR2 rozpoznává velké množství mikrobiálních komponent. Mezi které patří lipoproteiny/lipopeptidy různých patogenů, peptidoglykany a lipoteichoová kyselina gram pozitivních bakterií, lipoarabinomanan mykobakterií, glykosyl fosfatidyl inositolová kotva *Trypanosom cruzi*, Zymosan připravovaný z hub a LPS některých druhů bakterií, který se strukturně odlišuje od LPS získaného z G-bakterií. Existují dva důvody, které by mohly vysvětlit proč TLR2 rozpoznává tak široké spektrum mikrobiálních komponent. První vysvětlení je takové, že TLR2 tvoří heterodimetry s jinými TLR receptory, jako je například TLR1 nebo TLR6. Oba tyto receptory jsou TLR2 strukturně podobné. Druhé vysvětlení spočívá v rozpoznávání komponent získávaných z hub. V tomto případě se prokázalo, že TLR2 funkčně spolupracuje s různými typy receptorů jako je Dectin-1 (Takeda a Akira 2005, Turvey a Broide 2010).

#### **1.4.4 LPS (lipopolysacharid)**

Lipopolysacharid (LPS) je hlavní makromolekulární složkou vnější membrány G-bakterií. Strukturálně se LPS skládá ze tří odlišných oblastí. První část je O-antigenní polysacharid, který je složen z polysacharidových řetězců s opakujícími se oligosacharidovými jednotkami. Poté následuje oligosacharidové jádro, které je spojeno s komplexní hydrofobní komponentou Lipidem A. Lipid A se váže do vnější membrány a je to derivát D-glukosaminového disacharidu. Každá z těchto tří oblastí se odlišuje svou biologickou funkcí. O-antigenní polysacharid je hlavní determinantou antigenní specifity organismu a také funguje jako receptor pro jednoho nebo více bakteriofágů. Oligosacharidové jádro, které zastává roli bakteriofágového receptoru, hraje roli také v udržování integrity vnější membrány. Lipid A je hlavní oblast zodpovědná za endotoxicitu G-bakterií a vykazuje mitogenní stimulaci, dále také aktivuje komplement a pyrogenní indukci a má i řadu dalších biologických funkcí (Rosner a kol. 1979).

##### **1.4.4.1 Receptory rozpoznávající LPS**

**TLR 4** patří do rodiny Toll-like receptorů a jeho nejznámějším ligandem je LPS. Mezi další ligandy aktivující tento receptor řadíme heat shock proteiny (HSP60), specifickou doménu fibronectinů, oligosacharidy kyseliny hyaluronové, heparan sulfát a fibrinogen.

Všechny tyto ligandy, kromě LPS, který je velmi silný imunoaktivátor, ale musí být ve velmi vysoké koncentraci aby TLR4 dokázaly aktivovat (Takeda a Akira 2005). Ukázalo se, že receptor TLR4 aktivuje signální dráhu NF $\kappa$ B, a díky této aktivaci indukuje expresi řady cytokinů a kostimulačních molekul. Pro správné rozpoznání LPS spolupracuje receptor TLR4 se sekretovaným proteinem MD-2 a receptorem CD14, který je na povrch makrofágů připoután pomocí glycosylphosphoinositolové kotvy (GPI-kotva) (Rallabhandi a kol. 2006, Medzhitov a Janeway 2000).

## 1.5 Imunodeficientní myši

Používání geneticky modifikovaných a imunodeficientních myší slouží jako důležitý nástroj ke studiu funkcí imunitního systému za normálních podmínek a během nemoci. Tvorba nových imunodeficientních kmenů nepochybně poskytne jiné experimentální přístupy, které nám umožní pochopit dosud neobjasněné mechanismy, které mohou mít vztah mezi vrozenou a získanou imunitou. Jednotlivé kmeny mají konkrétní deficienci například v MHC třídy I nebo II, B nebo T lymfocytech, nebo může být vyřazena funkce genů pro některé cytokiny, cytokinové receptory, TLR receptory a různé transducery a transkripční faktory signálních drah (Belizário 2009).

### 1.5.1 SCID (severe combined immunodeficiency) myši

SCID mutace byla poprvé vyšlechtěna u myší C.B-17, jedná se o spontánní agamaglobulinémii, která je dána autozomálně recesivní mutací *Prkdc*<sup>scid</sup>, která je lokalizovaná v centromerické oblasti 16. chromozomu. Tato DNA dependentní protein kinasa je nezbytná pro připojení nehomologních konců dvoušroubovice DNA, pokud dojde k mutaci, je narušena tvorba funkčních B a T lymfocytů. SCID myši nejsou schopny produkce antigen specifické tvorby protilátek a proto mají velmi nízkou nebo téměř nedetekovatelnou hladinu imunoglobulinů v séru. Kmeny SCID myší mohou být odvozeny od C57BL/6J, Balb/c nebo C.B-17 myší (Belizário 2009, Vladutiu 1993). V této práci byly použity myši C.B17/Icr-scid.

### 1.5.2 CD11b deficientní myši

Tento kmen imunodeficientních myší je odvozen od myšího kmene C57BL/6J. K deficienci dochází u znaku CD11b, který můžeme znát také pod pojmem ITGAM (Integrin  $\alpha$ M) nebo také jako komplementový receptor 3 (CR3). Tento komplementový

receptor 3 je heterodimer skládající se ze dvou řetězců.  $\alpha$  řetězec (CD11b), je kódovaný genem ITGAM, který je unikátní pro tento receptor. A  $\beta$  řetězec (CD18) je společný i pro ostatní integrinové receptory. CR3 je vyjádřen na řadě imunitních buněk, jako jsou neutrofilů, monocytů a makrofágů (Melo a kol. 2000, Rhodes a kol. 2012).

## 2. Cíle práce:

- Ověření zásadní role vrozené imunity v léčbě nádorů pomocí kombinované aktivace TLR a fagocytárních receptorů. Studium pomocí SCID myši.
- Ověření důležitosti komplementového receptoru 3 u myši léčených mananem a Zymosanem kotvených na nádor pomocí BAM a ve spojení s LPS. Studium pomocí CD11b<sup>-/-</sup> myši.
- Porovnání účinnosti dvou režimů léčby na imunodeficientních myších.
- Ověření účinnosti terapie na sarkomu 180 transplantovaného myším BALB/c.
- Prostudování změny hladin základních cytokinů spojených se zánětem v průběhu terapie melanomu B16-F10 pomocí mananu, LPS a jejich kombinace.
- Zavedení a optimalizace metody sloužící ke stanovení aktivity myeloperoxidázy uvolněné při degranulaci neutrofilů.



## 3. Materiál a metody

### 3.1 Chemikálie

- BAM (Biocompatible Anchor for cell Membrane, Mw 4000) (NOF EUROPE (BELGIUM) NV)
- DNáza I (Roche Diagnostics)
- EDTA - kyselina ethylendiamintetraoctová (Sigma Aldrich)
- Fetal Calf Serum (FCS) (Sigma Aldrich)
- Fluid Thioglycollate Medium (Difco)
- Liberáza DL (Roche Diagnostics)
- Lipopolysacharid (LPS) z *E. coli* (Sigma Aldrich)
- Manan ze *S. cerevisiae* (Sigma Aldrich)
- Myeloperoxidase (MPO) Fluorometric Activity Assay Kit (Sigma Aldrich)
- RPMI 1640 (Sigma Aldrich)
- Sety pro ELISA testy (IL-1 $\beta$ , IL-6, INF- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$  – eBioscience, IL-8 - R&D systems)
- Trypanová modř (Sigma Aldrich)
- Trypsin (Sigma Aldrich)
- Zymosan A ze *S. cerevisiae* (Sigma Aldrich)

### 3.2 Laboratorní zvířata

V pokusech byly použity myši samice kmene C57BL/6N, BALB/c, SCID (C.B17/Icr-scid) a CD11b<sup>-/-</sup> (C57BL/6N).

Samice myši kmene C57BL/6N a BALB/c pocházely z chovu Charles River Laboratories. Při zahájení pokusu byly myši C57BL/6N 8 týdnů staré. Myši kmene BALB/c byly k terapii použité jako 9-ti týdenní. Oba myši kmeny byly chovány ve zvěřinci Parazitologického ústavu AV ČR v Českých Budějovicích za standardních podmínek s fotoperiodou 12/12 a byly neomezeně krmeny granulovanou stravou a vodou.

Myši kmene SCID a CD11b<sup>-/-</sup> byly odchovány za standardních podmínek ve sterilním prostředí v IVC (Air Handling Solutions; Tecnoplast, Italy) s HEPA filtry na PaÚ BC AV ČR v Českých Budějovicích. Léčené myši byly přibližně 8-10 týdnů staré a byly chovány ve sterilním prostředí v izolátorech (BEM, Znojmo, ČR) s HEPA filtry. Krmeny byly sterilní komerční granulovanou směsí a napájeny sterilní vodou *ad libitum*.

### **3.3 Buněčné linie**

V pokusech byly použité buněčné linie myšního melanomu B16-F10 a myšního sarkomu S-180, které byly darovány prof. Říhovou z Mikrobiologického ústavu AV ČR, Praha.

Buňky obou linií byly kultivovány v RPMI 1640 obsahujícím 10% fetální bovinní sérum (FCS) s přidavkem 1% antibiotik, 1% glutaminu a 0,1% merkaptoetanolu. Kultivace probíhala v termostatu s konstantní teplotou 37°C v atmosféře nasycené vodními parami a obsahující 5% oxidu uhličitého.

### **3.4 Příprava buněčných linií pro transplantaci**

Z kultivační nádoby s narostlými nádorovými buňkami B16-F10 bylo odstraněno médium, následně byly buňky důkladně promyty dostatečným množstvím sterilního pufovaného fyziologického roztoku (PBS). Poté byla provedena trypsinizace pomocí 0,5 ml trypsinizační směsi, která obsahovala 0,02% trypsinu a 0,02% EDTA v PBS. Následně byla provedena inkubace v termostatu při 37°C a po dobu 5 min, dokud nedošlo k uvolnění adheovaných nádorových buněk. Pro zastavení trypsinizační reakce bylo přidáno médium RPMI 1640 s 10% FCS, kde byly buňky pomocí Pasteurovy pipety rozvolněny. Následovala centrifugace buněk (10 min, 4°C, 150g) a naředění buněk přidáním RPMI 1640 bez séra na požadovaný objem. Množství buněk bylo spočítáno v Bürkerově komůrce přidáním trypanové modři ke směsi buněk v poměru 1:1. Konečná směs byla naředěna tak, aby bylo dosaženo koncentrace 4 mil buněk/ml.

Nádorové buňky S-180 byly kultivovány i zpracovávány stejným způsobem jako buňky melanomové, pouze byla vynechána trypsinizace, protože sarkomové buňky neadherují ke stěně kultivační nádoby.

### **3.5 Transplantace nádorových buněk**

Před samotnou transplantací bylo nutné všechny myši oholit na pravém boku asi do poloviny zad. Poté jim do tohoto místa bylo podkožně aplikováno 0,1 ml buněčné suspenze (buď B16-F10 s RPMI 1640 bez séra, nebo S-180 s RPMI 1640 bez séra) obsahující 400 000 buněk.

### **3.6 Měření velikosti nádorů**

Velikost nádorů byla měřena každý druhý den za použití speciálního kaliperu. Byl změřen největší rozměr nádoru, označený písmenem A a nejmenší rozměr nádoru B (výška

nádoru směrem od těla). Z těchto hodnot byl poté pomocí vzorce  $V = \pi/6 AB^2$  vypočítán objem nádoru (Inaba a kol. 1986).

### 3.7 Průměrná redukce nádorového růstu (%)

Redukce nádorového růstu (ve srovnání s kontrolou) byla vypočtena podle následujícího vzorce:

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

Tato průměrná redukce (%) byla měřena ve dnech 4, 6, 8, 10, 12 a 14 od zahájení terapie. Ze všech těchto šesti hodnot byla vypočtena průměrná hodnota, která v procentech udává „průměrnou redukci nádorového růstu“.

### 3.8 Počítání metastáz v plicích

Plice byly myším vyjmuty a následně zakonzervovány ve 4% roztoku formaldehydu. Po určité době byla pod binolupou spočítána metastatická ložiska, která mají vzhled černých teček různé velikosti (Vetvicka a kol. 2007).

### 3.9 Sonikace

Sonikace probíhala tak, že daná suspenze byla 10 x 10 s ozvučována v ledové lázni, po každém ozvučení následovalo 20s chlazení. K sonikaci byl použit sonikátor HIELSCHER VP200S.

### 3.10 Statistické zpracování dat

Veškerá data byla statisticky zpracována v programu STATISTICA 12. Grafy sledující přežívání myši byly vyhodnoceny pomocí testu Kaplan-Meier. Statistická významnost byla zjišťována pomocí ANOVY, která byla doplněna post-hoc Tukeyovým testem nebo při rozdílných počtech myši ve skupinách pomocí funkce HSD nestejně N.

### 3.11 Izolace neutrofilů

Pro izolaci neutrofilů z myšního peritonea bylo nutné nejprve připravit 3% thioglykolátové médium. Médium bylo získáno smícháním 0,3g Fluid Thioglycollate Medium s 10 ml deionizované vody. Vznikl roztok modré barvy, který byl následně po dobu

1-2 min povařen v mikrovlnné troubě, díky čemuž získal roztok růžovou barvu. Po vyndání z mikrovlnné trouby a zchlazení byl roztok přefiltrován do uzavíratelné nádoby obalené alobalem tak, aby bylo zabráněno přístupu vzduchu a světla. Takto přichystaná nádoba s roztokem byla uložena přes noc do lednice, kde se mezitím vytvořily dvě vrstvy žlutá a růžová. Pro další aplikace byla použita spodní žlutá vrstva.

Takto připravené médium bylo myším intraperitoneálně injikováno v množství 2ml/myš a nechalo se 4,5 – 5 hodin působit. Po uplynutí této inkubační doby byla myš vykřvena a usmrčena cervikální dislokací. Poté bylo vychlazeným PBS postupně propláchnuto peritoneum. Takto získaná tekutina byla dána do zkumavky a doplněná chlazeným PBS. Následně byla zkumavka 20-40 min centrifugována (podle ohrazení peletu) ve 4°C při 250g. Ke vzniklému peletu bylo přidáno RPMI 1640 s 10% FCS doplněné do 1 ml. Počet buněk byl spočítán pomocí Bürkerovy komůrky.

## **3.12 Příprava terapeutických látek**

### **3.12.1 Příprava manan-BAM a manan-BAM + LPS**

Pro přípravu této směsi je nutné nejprve manan aminovat pomocí redukční aminace (Torosantucci a kol. 2005). Ta byla prováděna tak, že roztok mananu v prostředí octanu amonného byl redukován kyanoborohydridem sodným. Vše probíhalo po dobu pěti dnů při pH 7,5 a 50°C. Poté byla přes noc provedena dialýza ve střevě MWCO 3500 proti PBS při 4°C. Následně bylo nutné navázat molekulu BAM na amoniskupinu, to bylo provedeno podle metody popsané Kato a kol. (2004) při pH 7,3. Nakonec byla směs dialyzována ve střevě MWCO 3500 proti PBS při 4°C přes noc za stálého míchání. Byl získán 0,2 mM roztok manan-BAM v PBS. Pro přípravu manan-BAM + LPS byl k tomuto roztoku přidán LPS na výslednou koncentraci 0,5 mg/ml.

### **3.12.2 Příprava Zymosan-BAM a Zymosan-BAM + LPS**

Suspenze byla připravena smícháním Zymosanu s PBS v koncentraci 17,36 mg/ml, poté byla směs sonikována. Následně bylo přidáno 100 µl 15 mM BAM4000 v DMSO (Kato a kol. 2004). Vše bylo promícháno a ponecháno 1 hod při pokojové teplotě. Dále bylo přidáno 100 µl 1M TRIS/HCl pH 8,0 pro zastavení reakce a v posledním kroku byla směs dialyzována ve střevě MWCO 12-14000 proti PBS při 4 °C přes noc. Pro přípravu Zymosan-BAM + LPS byl k výsledné suspenzi přidán LPS na výslednou koncentraci 0,5 mg/ml.

### **3.13 Pokus č. 1: Studium vlivu terapeutické směsi (manan-BAM+LPS) na redukci nádorového růstu u SCID myši, pulzní režim léčby**

V pokusu bylo použito 10 samic SCID myši, kterým byl transplantován melanom B16-F10. Po dvanácti dnech byly myši rozděleny do 2 skupin (A, K) po 5 myších a byla zahájena terapie. Léčivo bylo podáváno v pulzech tzn. ve dnech 0,1,2,...8,9,10,...16,17,18,...24,25,26, vždy bylo terapeutikum aplikováno intratumorálně v množství 50  $\mu$ l/myš. Každý druhý den byla měřena velikost nádorů.

Terapeutika použitá u jednotlivých skupin:

- Skupina A: manan-BAM +LPS (0,5 mg/ml)
- Skupina K: kontrolní – PBS

Po ukončení terapie byla sledována doba přežití jednotlivých myši.

### **3.14 Pokus č. 2: Studium vlivu terapeutické směsi (Zymosan-BAM +LPS, manan-BAM+LPS) na redukci nádorového růstu u SCID myši, aplikace terapeutika obden**

Do tohoto pokusu bylo zahrnuto 12 samic kmene SCID, kterým byly ve stáří 8 týdnů transplantovány buňky myšího melanomu B16-F10. Po dvanácti dnech byly myši rozřazeny do 3 skupin. Každá skupina obsahovala 4 myši. Před aplikací léčiva byla vždy nejprve změřena velikost nádoru a poté až bylo intratumorálně injikováno 50  $\mu$ l léčiva. Myši byly léčeny každý druhý den, tzn. 0., 2., 4., 6., 8. a 10. den.

Terapeutika použitá u jednotlivých skupin:

- Skupina A: manan-BAM +LPS (0,5 mg/ml)
- Skupina B: Zymosan-BAM +LPS (0,5mg/ml)
- Skupina K: kontrolní - PBS

Po ukončení terapie byly myši usmrceny cervikální dislokací a následně jim byly vyjmuty plíce, které byly použity ke zjištění počtu metastáz.

### **3.15 Pokus č. 3: Studium mechanismů vrozené imunity s použitím CD11b deficientních myší, pulzní režim léčby**

Do tohoto pokusu bylo zahrnuto 12 samic CD 11b deficitních myší. Dvanáctý den od transplantace melanomových buněk B16-F10, byly myši rozděleny do 4 skupin po 3 myších. Myším bylo podáváno léčivo *i.t.* v množství 50 $\mu$ l/myš v pulzech tj. 0.,1.,2.,...8.,9.,10., ... 16.,17.,18.,...24.,25.,26. den od zahájení terapie. V den 0 byla změřena velikost nádoru a poté byla každý druhý den přeměřována, výsledné hodnoty byly zaznamenány a dále zpracovány.

Terapeutika použitá u jednotlivých skupin:

- Skupina A: manan-BAM
- Skupina B: LPS (0,5 mg/ml)
- Skupina C: manan-BAM +LPS (0,5 mg/ml)
- Skupina K: kontrolní PBS

Po ukončení léčby byla zaznamenávána délka přežití jednotlivých myší.

### **3.16 Pokus č. 4: Studium mechanismů vrozené imunity s použitím CD11b deficientních myší, aplikace terapeutika obden**

Následující pokus byl prováděn na 16 samicích kmene CD11b<sup>-/-</sup>, kterým byl transplantován melanom B16-F10. Dvanáct dní od provedené transplantace byly myši rozděleny do skupin (4 skupiny po 4 myších) a započala terapie. Myším bylo *i.t.* aplikováno 50 $\mu$ l léčivé látky každý druhý den tj. v den 0,2,4,6,8,10. Celkem tedy bylo léčivo podáno 6x. Obden byly také měřeny velikosti jednotlivých nádorů.

Terapeutika použitá u jednotlivých skupin:

- Skupina A: manan-BAM +LPS (0,5 mg/ml)
- Skupina B: Zymosan-BAM +LPS (0,5mg/ml)
- Skupina C: LPS (0,5 mg/ml)
- Skupina K: kontrolní - PBS

Po posledním měření tedy 14. den od započetí léčby byly myši usmrceny a byly jim vypitvány plíce, které sloužily k stanovení počtu metastáz.

### **3.17 Pokus č. 5: Ověření účinnosti terapie na sarkomu S-180 transplantovaném myším kmene BALB/c**

V tomto pokusu bylo použito 24 samic myší BALB/c, kterým byly transplantovány buňky myšího sarkomu S-180. Dvanáctý den od transplantace byly myši rozřazeny do 4 skupin po 6 myších. Byla zahájena terapie, která byla aplikována ve dnech 0,2,4,6,8,10 od započetí léčby. Léčivo bylo vždy injikováno do nádoru v množství 50 $\mu$ l/myš. Před aplikací léčby byla vždy změřena velikost nádoru.

Terapeutika použitá u jednotlivých skupin:

- Skupina A: manan-BAM +LPS (0,5 mg/ml)
- Skupina B: Zymosan-BAM +LPS (0,5mg/ml)
- Skupina C: LPS (0,5 mg/ml)
- Skupina K: kontrolní - PBS

### **3.18 Pokus č. 6: Stanovení hladiny cytokinů v nádorech léčených manan-BAM, LPS a jejich směsí**

V experimentu bylo použito celkem 39 samic myší C57BL/6N. Dvanáctý den od transplantace nádorových buněk byly myši rozděleny do 4 terapeutických skupin (A, B, C, K), kde v každé skupině bylo 9 myší. Před zahájením léčby byla zaznamenána velikost jednotlivých nádorů. Poté bylo myším jednorázově aplikováno léčivo do nádoru, vždy v množství 50 $\mu$ l/myš.

Terapeutika použitá u jednotlivých skupin:

- Skupina A: manan-BAM
- Skupina B: LPS (0,5 mg/ml)
- Skupina C: manan-BAM +LPS (0,5 mg/ml)
- Skupina K: kontrolní – PBS

Po 12, 24, a 48 hodinách byly vždy tři myši ze skupiny odebrány, následně byly usmrceny a byl jim vyjmut nádor. Jako negativní kontrola byly použity 3 myši, kterým nebyla žádná terapeutická látka aplikována. Vyjmutý nádor byl zbaven nečistot opláchnutím studeným médiem RPMI 1640 bez séra. Poté byl nádor rozstříhán na menší kousky a přenesen do zkumavky s 1 ml sterilního RPMI 1640 bez séra s Liberázou DL(0,33mg/ml) a

DNázou (0,2 mg/ml). Poté se směs hodinu inkubovala při 37°C s mírným třepáním. Následovala centrifugace při 160g po dobu 10 min a při teplotě 4°C. Vzniklý supernatant byl odsát a uchován v -80°C pro další použití.

### **3.18.1 Měření koncentrace cytokinů v nádoru pomocí ELISA testu**

Z připraveného séra byla pomocí komerčně dodaných kitů stanovena koncentrace cytokinů v nádoru. Tento test je založen na stanovení přítomnosti antigenu (cytokinu) ve vzorku metodou ELISA. Samotný test byl proveden podle pokynů v návodu dodávaného společně s kitem.

## **3.19 Pokus č. 7: Zavedení a optimalizace metody sloužící k určení míry degranulace neutrofilů při interakci s nádorovými buňkami a ligandem**

### **3.19.1 Stanovení MPO aktivity**

Množství uvolněné myeloperoxidázy bylo stanoveno pomocí komerčně dodaného kitu- Myeloperoxidase (MPO) Fluorometric Activity Assay Kit. Jednotlivé kroky byly prováděny přesně podle přiloženého návodu. Tento test je založen na tom, že MPO katalyzuje tvorbu kyseliny chlorné při reakci se substrátem (aminofenyl fluorescein) za tvorby fluoresceinu ( $\lambda_{\text{ex}} = 485 / \lambda_{\text{em}} = 525 \text{ nm}$ ). Florescence byla měřena na přístroji Tecan v minutových intervalech po dobu 40 min.

Pro vypočtení aktivity MPO byl použit vorec :

$$\text{MPO aktivita} = \frac{\text{B} * \text{diluční (ředicí) faktor vzorku}}{\text{reakční čas} * \text{V}}$$

B= množství (pmol) fluoresceinu uvolněného mezi  $T_{\text{počáteční}}$  a  $T_{\text{konečný}}$

reakční čas =  $T_{\text{počáteční}} - T_{\text{konečný}}$  (minuty)

V = objem vzorku (ml)

MPO aktivita je tedy udávána v pmol/min/ml což jsou mikrojednotky/ml. Jedna jednotka MPO je množství enzymu, které oxiduje MPO substrát k získání 1  $\mu\text{mol}$  fluoresceinu za minutu při pokojové teplotě.



### **3.19.2 Příprava vzorků pro stanovení množství uvolněné MPO a studium in vitro interakcí neutrofilů s nádorovými buňkami a ligandem**

V prvním kroku byly sklizeny melanomové buňky B16-F10 (postup viz Příprava buněčných linií pro transplantaci) a naředěny tak, aby bylo dosaženo množství 500 000 buněk/ml média s FCS. Následně bylo do destičky s V dnem do prvních sedmi jamek napipetováno 100 $\mu$ l, tedy 50 000 melanomových buněk na jamku. Do prvních třech jamek pak bylo přidáno 100  $\mu$ l roztoku obsahujícího 0,2 mM manan-BAM + médium s FCS. Ke druhým třem jamkám bylo přidáno 100  $\mu$ l PBS + médium s FCS. Následovala inkubace buněk s ligandem, která probíhala 30 min při 37°C v 5% CO<sub>2</sub> atmosféře. Poté byla destička stočena (2 min/4°C/424g) a supernatant slit. K prvním šesti jamkám byla přidána suspenze neutrofilů (1,25 mil neutrofilů/ml média s neinaktivovaným FCS, příprava viz Izolace neutrofilů) v množství 200  $\mu$ l na jamku. Do jamky 7 bylo přidáno 200  $\mu$ l média s neinaktivovaným FCS a do následujících třech jamek bylo napipetováno 200  $\mu$ l suspenze neutrofilů (1,25mil/ml média s neinaktivovaným FCS). Buněčné suspenze byly ve všech jamkách opatrně rozsuspendovány pipetou se širokým otvorem. Následně byla destička uložena do CO<sub>2</sub> termostatu na 2 hod při 37°C. Po proběhlé inkubaci bylo odebráno a do černé destičky přeneseno 50  $\mu$ l supernatantu. Do této destičky bylo dále přidáno 50  $\mu$ l supernatantu sonikovaných B16-F10 (jamka 11), 50  $\mu$ l supernatantu sonikovaných neutrofilů (jamky 12, 13, 14) a 50  $\mu$ l MPO Assay Buffer + Master reaction Mix, sloužící k zjištění intenzity pozadí. Takto připravené vzorky byly použity ke stanovení aktivity MPO.

### **3.19.3 Příprava vzorků pro stanovení množství uvolněné MPO v nádorové tkáni po aplikaci LPS**

Pro tento pokus bylo použito 6 myší kmene C57BL/6N s již transplantovaným melanomem. Třem myším bylo intratumorálně aplikováno LPS a zbývajícím třem PBS. Po 24 hodinách od aplikace terapie byly myši usmrceny a nádor vyjmut a přenesen v uzavřené nádobě na ledu s malým množstvím chlazeného PBS. U všech nádorů byla zvážena hmotnost. Poté následovala homogenizace nádoru rozdrčením v třecí misce. Homogenizát nádoru byl pomocí PBS přenesen do zkumavky a doplněn na objem 5 ml a poté následovala sonikace (postup viz Sonikace). Z takto připraveného vzorku bylo odebráno 1,3 ml a přeneseno do 1,5 ml zkumavky. Všechny zkumavky byly následně stočeny při 13000 g po dobu 10 min a 4°C. Vzniklý supernatant byl použit k stanovení MPO aktivity.

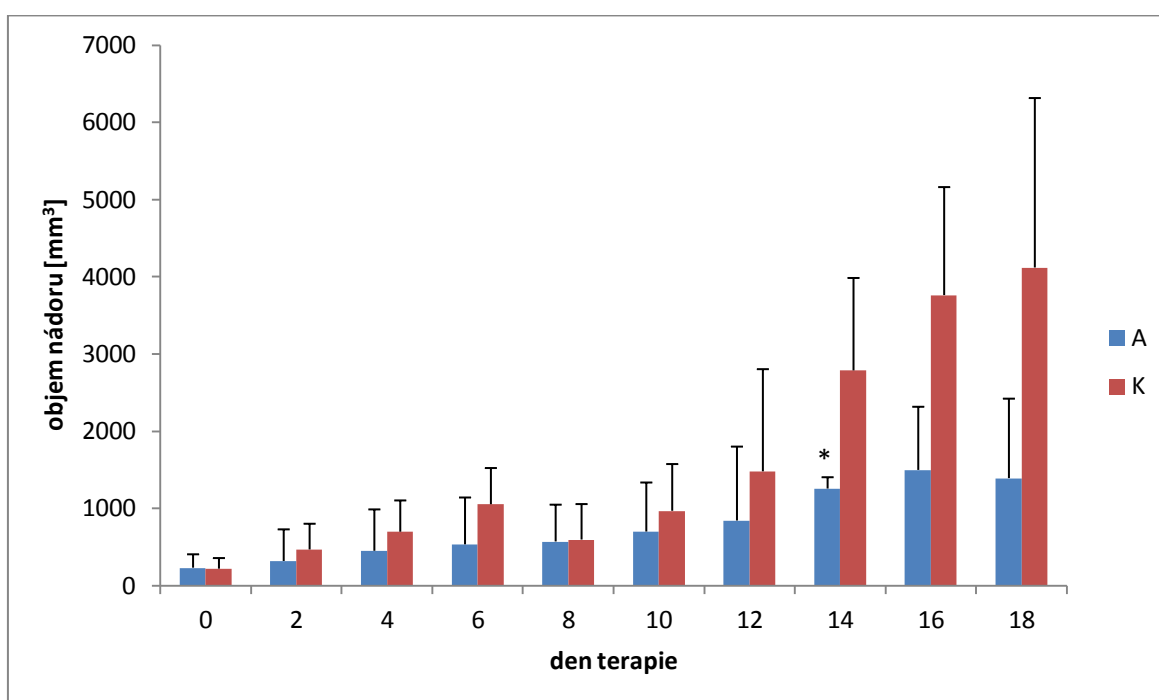
### **3.19.4 Příprava vzorků pro stanovení množství MPO uvolněné do mezibuněčného prostoru nádorové tkáně po aplikaci ligandů**

V tomto experimentu byly použity supernatanty připravené pro stanovení koncentrace cytokinů v nádorové tkáni (příprava viz Pokus č. 6: Stanovení hladiny cytokinů v nádorech léčených manan-BAM, LPS a jejich směsí).

## 4. Výsledky

### 4.1 Pokus č. 1: Studium vlivu terapeutické směsi (manan-BAM+LPS) na redukci nádorového růstu u SCID myši, pulzní režim léčby

Cílem tohoto pokusu bylo ověřit, zda na redukci nádorového růstu má při použití terapeutické směsi manan-BAM+LPS vliv vrozená imunita. Z grafu (Obr. 1) je již na první pohled patrné, že toto terapeutikum (skupina A) výrazně snižuje velikost nádorů oproti kontrolní skupině myši (skupina K). Byla zaznamenána průměrně 35,8 % redukce nádorového růstu. Tato redukce byla čtrnáctý den terapie statisticky významná.

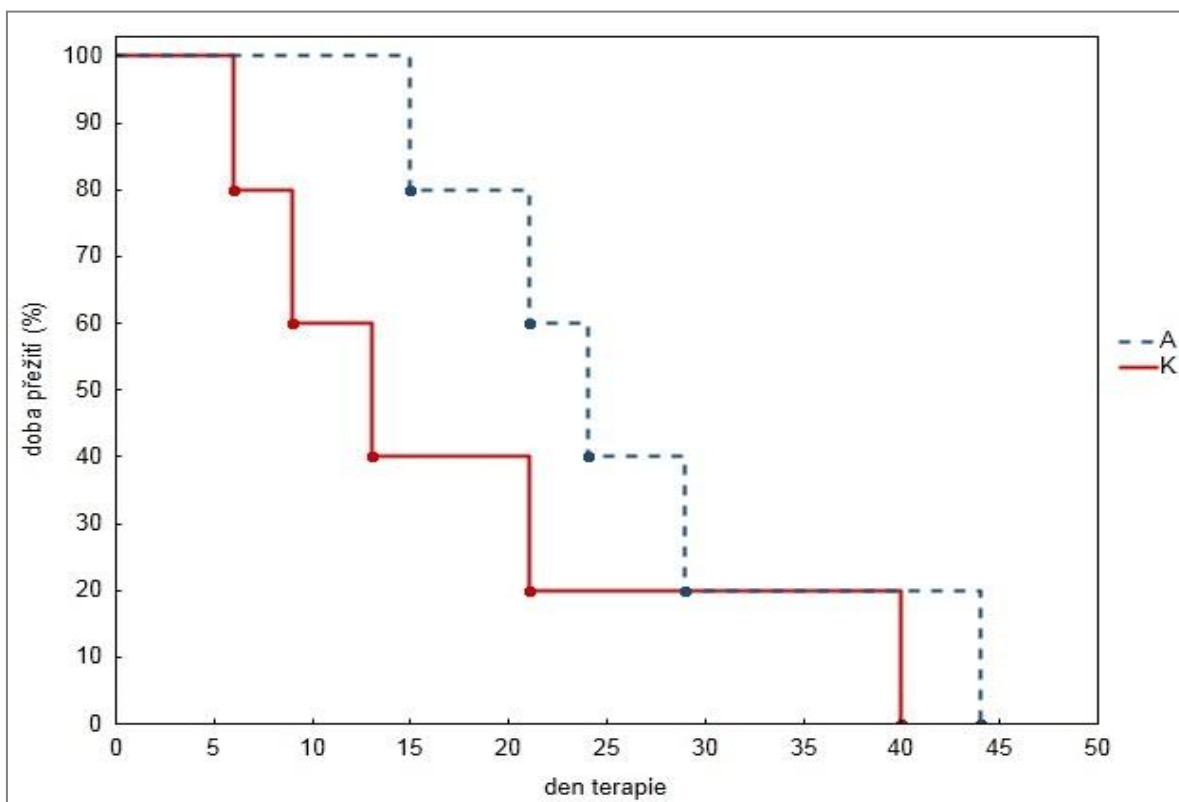


**Obr. 1:** Vliv mananu kotveného pomocí BAM ve spojení s LPS na velikost nádorů u SCID myši.

**A-** manan-BAM + LPS, **K-** kontrola PBS

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

Na Obr. 2 je zaznamenána doba přežití jednotlivých skupin myší. Léčebná skupina sice dosáhla o něco delšího přežití, nebylo však nijak statisticky významné.

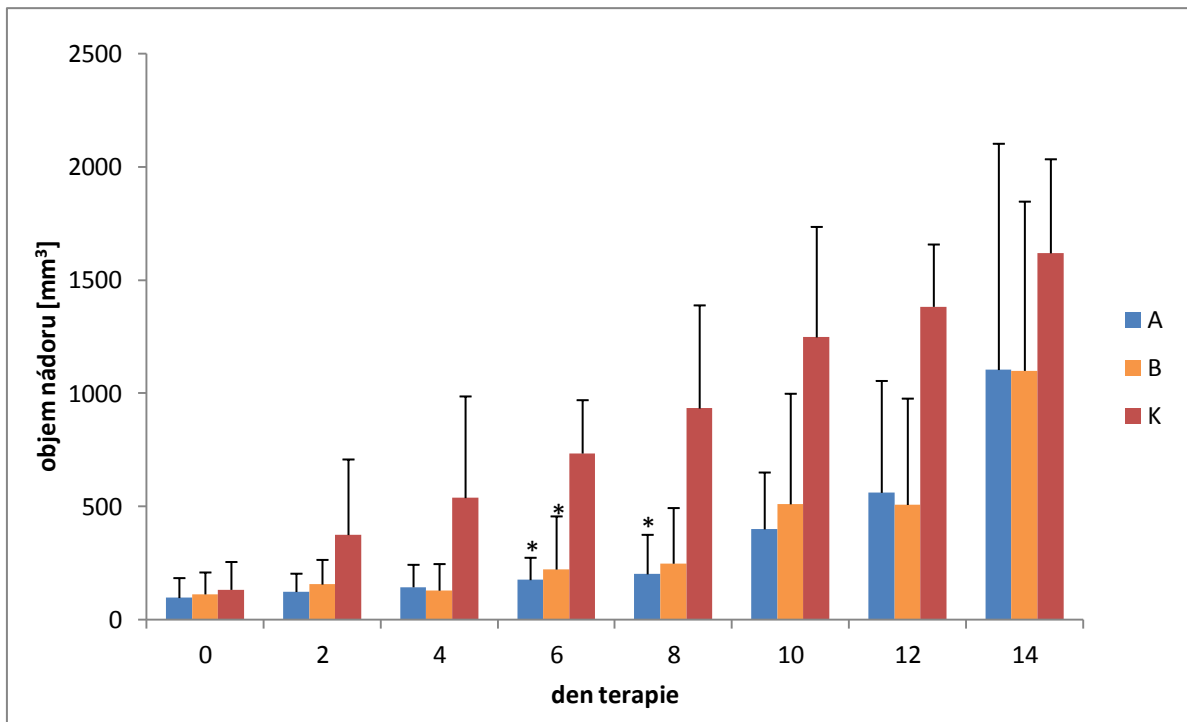


**Obr. 2:** Vliv terapeutické směsi manan-BAM +LPS na přežívání SCID myší.

A- manan-BAM + LPS, K- kontrola PBS

#### **4.2 Pokus č. 2: Studium vlivu terapeutické směsi (Zymosan-BAM +LPS, manan-BAM+LPS) na redukci nádorového růstu u SCID myší, aplikace terapeutika obden**

Smyslem tohoto pokusu bylo zjistit, zda i terapie aplikovaná obden vyvolá snížení velikosti nádorů u SCID myší. Z grafu (Obr. 3) je zřejmé, že tato terapie je velmi účinná. Šestý den od započetí terapie bylo zaznamenáno statisticky významné snížení nádorového růstu jak u skupiny A (manan-BAM+LPS) tak u skupiny B (Zymosan-BAM+LPS). U skupiny léčené kotveným mananen +LPS byla zaznamenána 64,4% průměrná redukce nádorového růstu, u skupiny s kotveným Zymosanem+LPS byla tato průměrná redukce 62,2%. Osmý den vykazovala statistický významný pokles objemu nádoru pouze skupina A.



**Obr. 3:** Vliv terapeutických směsí (manan-BAM+LPS, Zymosan-BAM+LPS) na velikost nádorů u SCID myši.

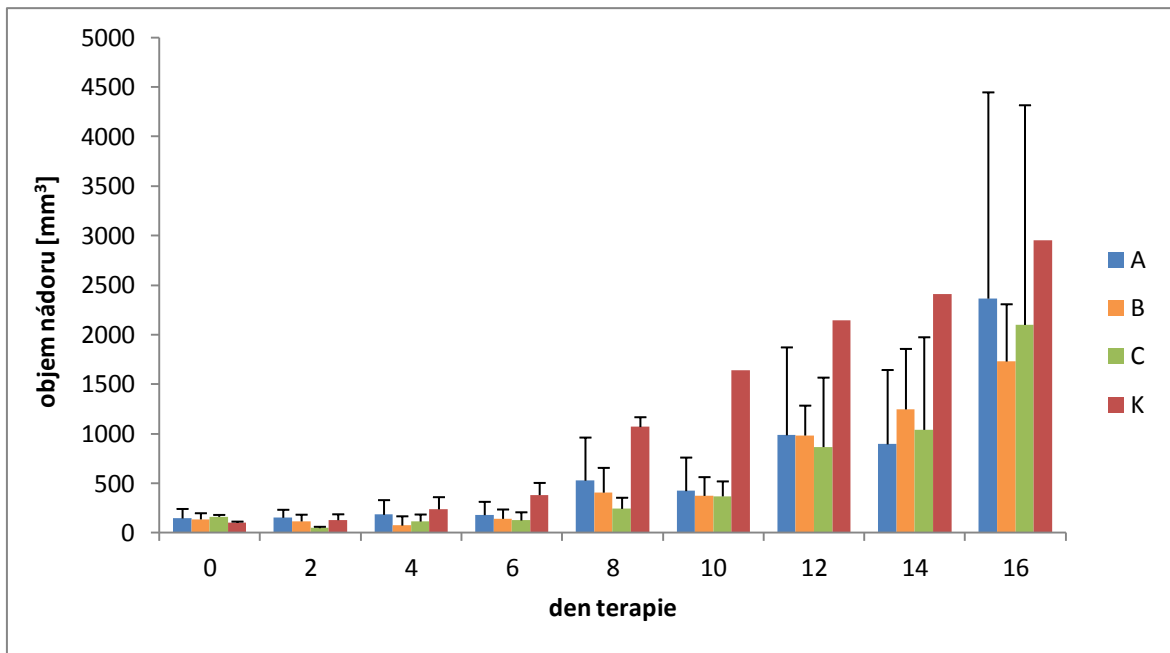
**A-** manan-BAM+LPS, **B-** Zymosan-BAM+LPS, **K-** kontrola PBS

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

Po ukončení pokusu byl zjišťován počet metastáz u jednotlivých skupin. Metastázy byly nalezeny pouze u skupiny kontrolní a to u 66% myši ze skupiny s intenzitou 2 metastázy/myš.

### 4.3 Pokus č. 3: Studium mechanismů vrozené imunity s použitím CD11b deficientních myši, pulzní režim léčby

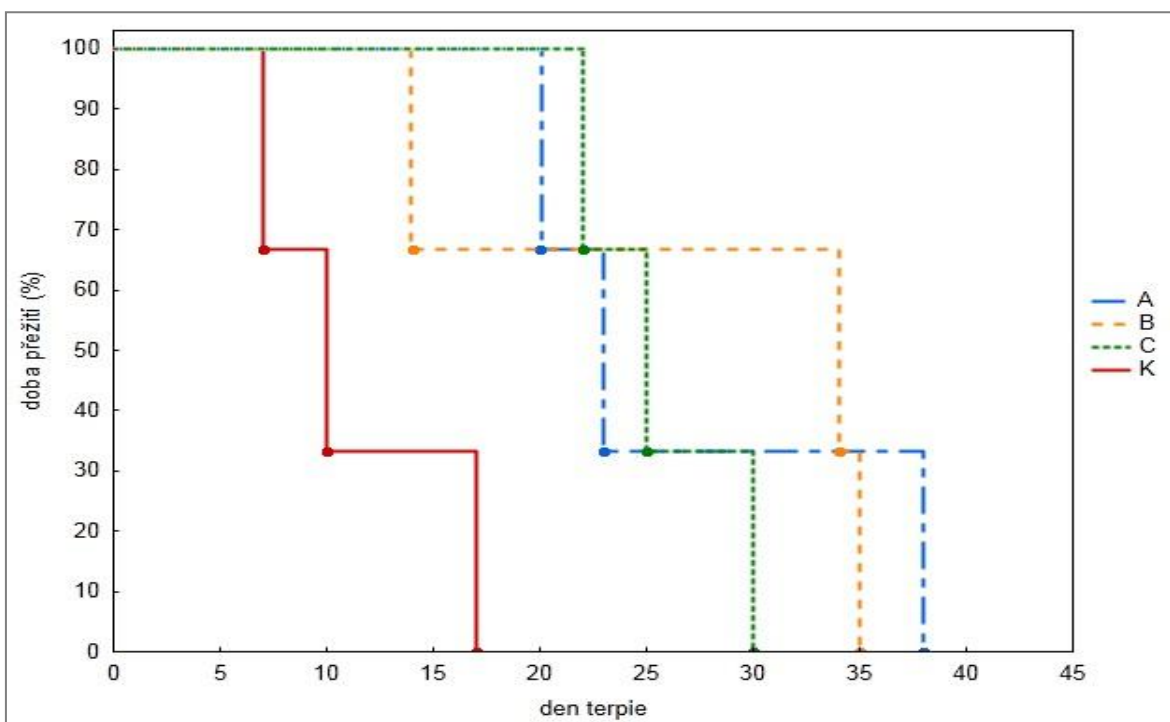
Tento pokus měl za úkol přispět k objasnění mechanismů vrozené imunity uplatňujících se při redukci nádorového růstu. Byly použity imunodeficientní myši, které nemají exprimován CR3 receptor komplementu. Z grafu (Obr. 4) vyplývá, že ve všech léčených skupinách došlo jen k statisticky nevýznamné redukci nádorového růstu.



**Obr. 4:** Vliv terapie na imunodeficientní myši CD 11b<sup>-/-</sup>.

**A-** manan-BAM, **B-** LPS, **C-** manan-BAM+LPS, **K-** kontrola PBS

Na Obr. 5 je znázorněna délka přežití jednotlivých myší. V kontrolní skupině bylo zaznamenáno výrazně kratší přežití jednotlivých myší, avšak nedosáhla statistické významnosti.

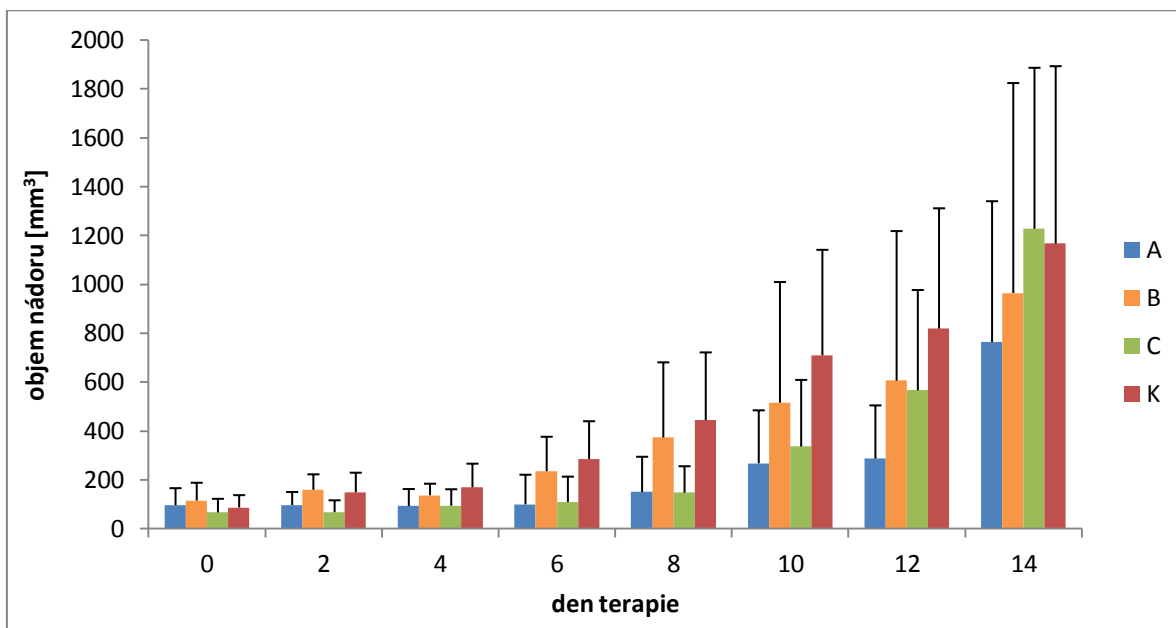


**Obr. 5:** Doba přežití imunodeficientních myší CD11b<sup>-/-</sup>.

**A-** manan-BAM, **B-** LPS, **C-** manan-BAM+LPS, **K-** kontrola PBS

#### 4.4 Pokus č. 4: Studium mechanismů vrozené imunity s použitím CD11b deficientních myší, aplikace terapeutika obden

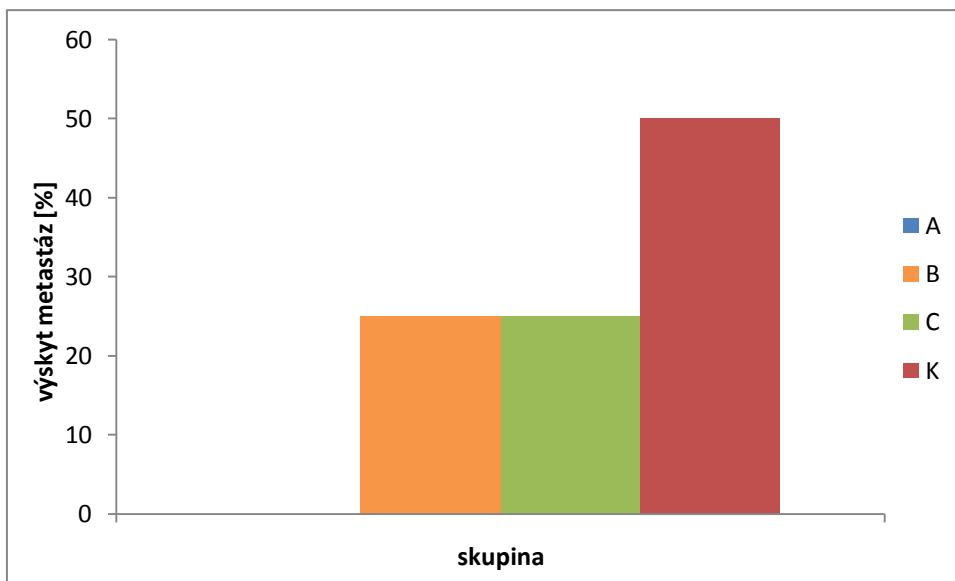
V tomto pokusu byl sledován vliv terapie aplikované obden u imunodeficientních myší. Z grafu (Obr. 6) je patrné, že léčené skupiny vykazovaly snížení růstu nádoru oproti kontrole, ale statistické významnosti nebylo dosaženo.



**Obr. 6:** Vliv terapie na velikost nádorů u CD11b deficientních myší.

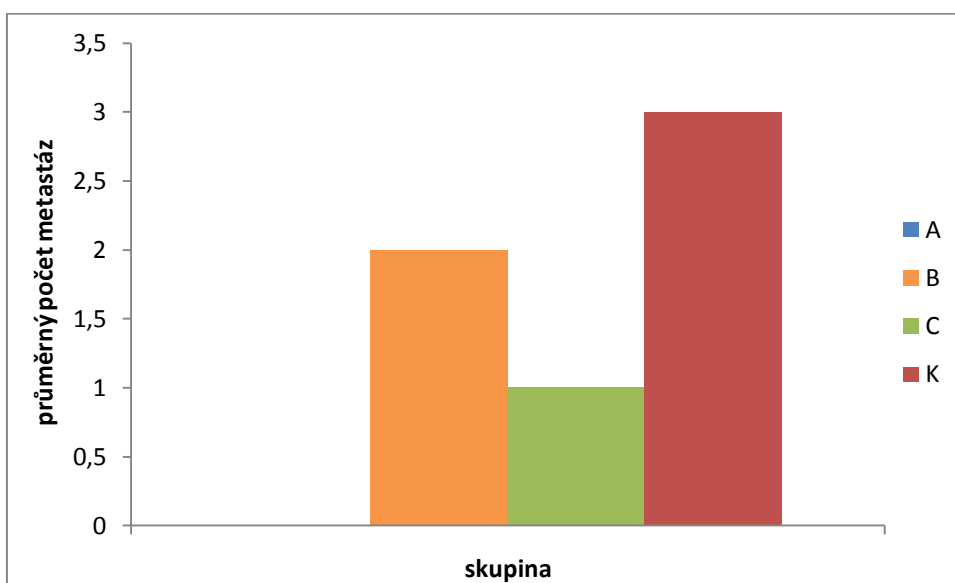
**A-**manan-BAM +LPS, **B-** Zymosan-BAM+LPS, **C-** LPS, **K-** kontrola PBS

Na následujících grafech je zaznamenán vliv terapie na výskyt metastáz. Na Obr. 7 je znázorněno procentuální zastoupení metastáz u jednotlivých skupin myší. Pouze u skupiny A (manan-BAM+LPS) nebyly žádné metastázy detekovány. V grafu (Obr. 8) je pak uveden průměrný počet metastáz u myší kde byly metastázy nalezeny.



**Obr. 7:** Procentuální zastoupení výskytu metastáz po aplikaci terapie u imunodeficientních myši.

*A-manan-BAM +LPS, B- Zymosan-BAM+LPS,C- LPS, K- kontrola PBS*



**Obr. 8:** Průměrný počet metastáz vyskytující se u myši s detekovanými metastázami.

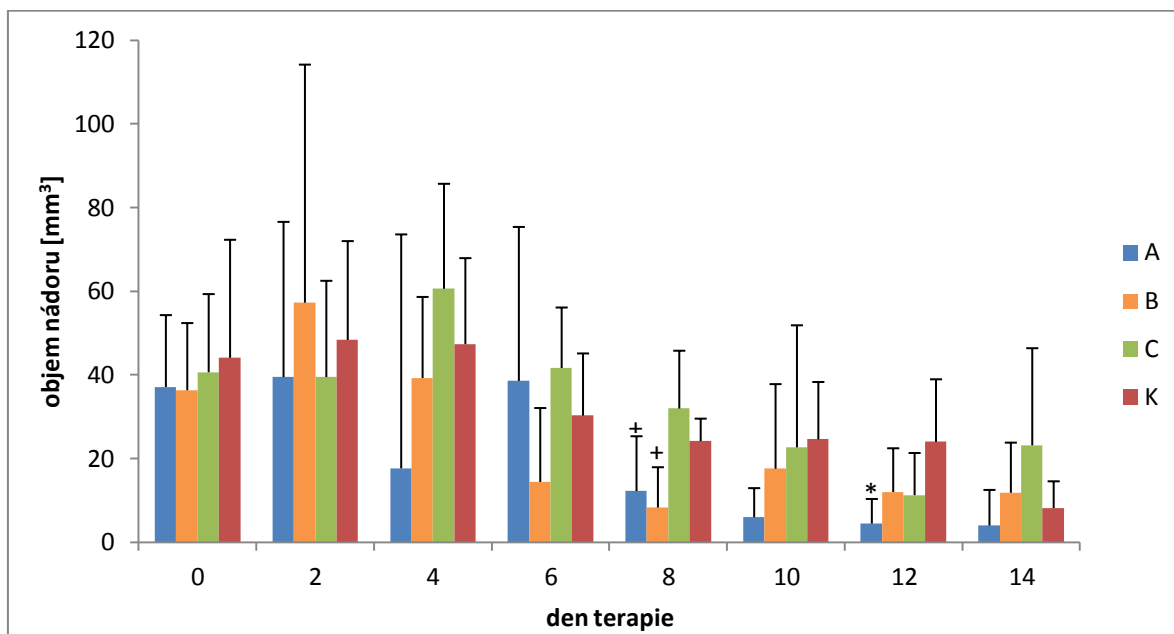
*A-manan-BAM +LPS, B- Zymosan-BAM+LPS,C- LPS, K- kontrola PBS*

#### 4.5 Pokus č. 5: Ověření účinnosti terapie na sarkomu S-180 transplantovaném myším kmene BALB/c

Cílem tohoto pokusu bylo ověřit, zda námi používaná terapie je účinná také u jiného typu nádoru. Na Obr. 9 jsou graficky znázorněny průměrné objemy nádorů naměřené u



jednotlivých skupin myši. Byl použit méně agresivní typ nádoru sarkom S-180, proto byla zaznamenána snižující se velikost nádoru i u kontrolní skupiny. I přes to bylo dosaženo statisticky významné redukce nádorového růstu u skupiny léčené manan-BAM v kombinaci s LPS.



**Obr. 9:** Vliv terapie na sarkom S-180 transplantovaný myším kmene BALB/c.

**A-**manan-BAM +LPS, **B-** Zymosan-BAM+LPS, **C-** LPS, **K-** kontrola PBS

Hladina statisticky významného rozdílu vůči skupině K: \*  $P \leq 0,05$

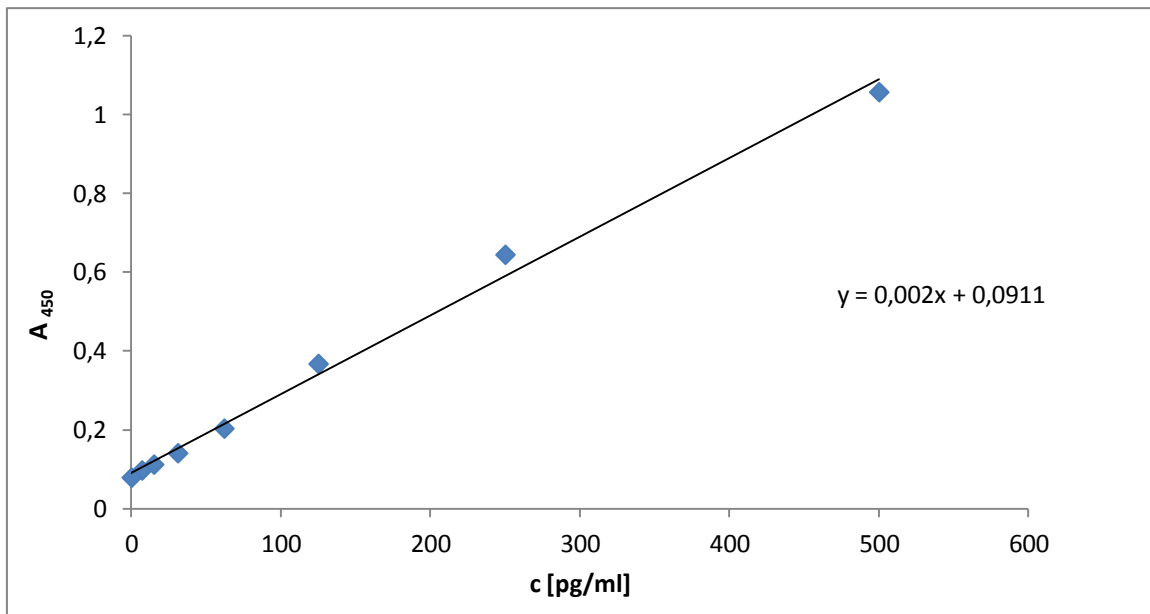
Hladina statisticky významného rozdílu vůči skupině C: +  $P \leq 0,05$

#### 4.6 Pokus č. 6: Stanovení hladiny cytokinů v nádorech léčených manan-BAM, LPS a jejich směsí

Cílem tohoto pokusu bylo zjistit koncentraci cytokinů produkovaných v nádoru v časovém intervalu 48 hodin. Bylo zjišťováno, zda se mění produkce jednotlivých cytokinů (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, TGF- $\beta$  a IFN $\gamma$ ), v závislosti na jednotlivých látkách a v čase. Zjištěné koncentrace byly přepočteny na 1 mm<sup>3</sup> nádoru.

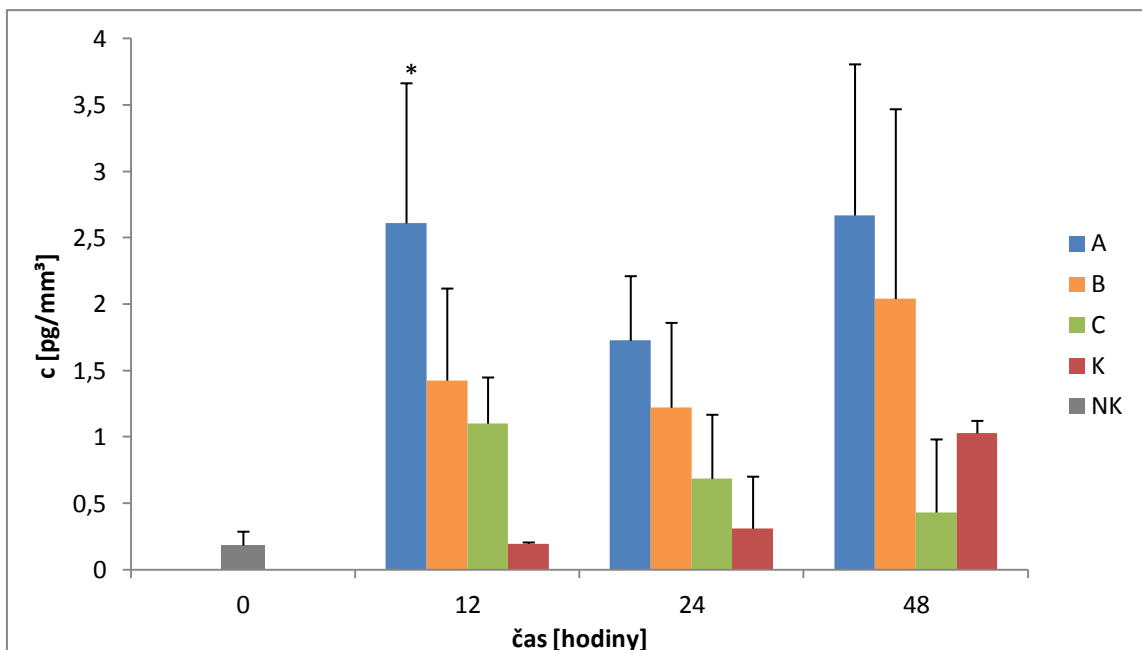
##### 4.6.1 IL-1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ )

Pro stanovení koncentrace cytokinu byla nejprve sestrojena kalibrační přímka (Obr. 10). Pomocí rovnice regrese byla následně vypočtena koncentrace IL-1 $\beta$  a převedena na objem nádoru.



**Obr. 10:** Kalibrační přímka pro stanovení IL-1β.

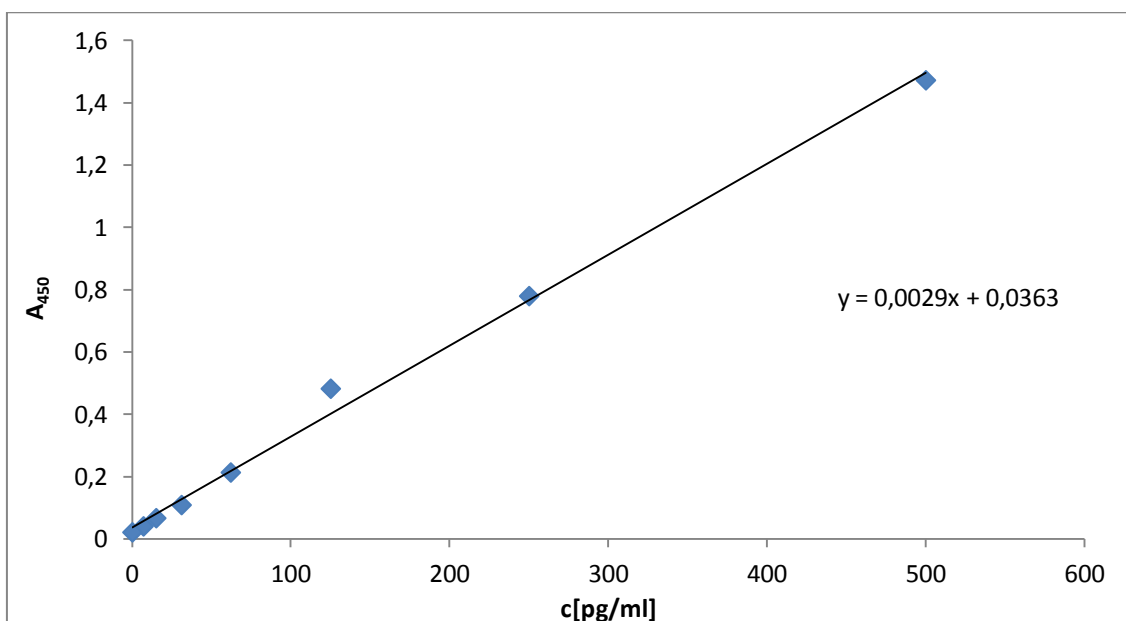
V následujícím grafu (Obr. 11) jsou zaznamenány koncentrace IL-1β po aplikaci léčiva a v rozmezí 48 hodin. Nejvyšší koncentrace IL-1β byla naměřena u skupiny A (manan-BAM) a už po 12 hodinách byl tento nárůst statisticky významný. Zvýšená koncentrace byla zaznamenána také u skupiny obsahující pouze LPS (skupina B). Nádory, které byly léčeny směsí manan-BAM+LPS (skupina C) vykazovaly mírný nárůst koncentrace po 12 a 24 hodinách od zahájení léčby, v čase 48 hodin byla koncentrace dokonce nižší než u skupiny kontrolní.



**Obr. 11:** Koncentrace IL-1 $\beta$  v nádoru naměřená v průběhu 48 hodin od zahájení terapie. **A**-*manan-BAM*, **B**- *LPS*, **C**- *manan-BAM+LPS*, **K**- kontrola *PBS*, **NK**- negativní kontrola  
Hladina statisticky významného rozdílu vůči kontrole: \*  $P \leq 0,05$

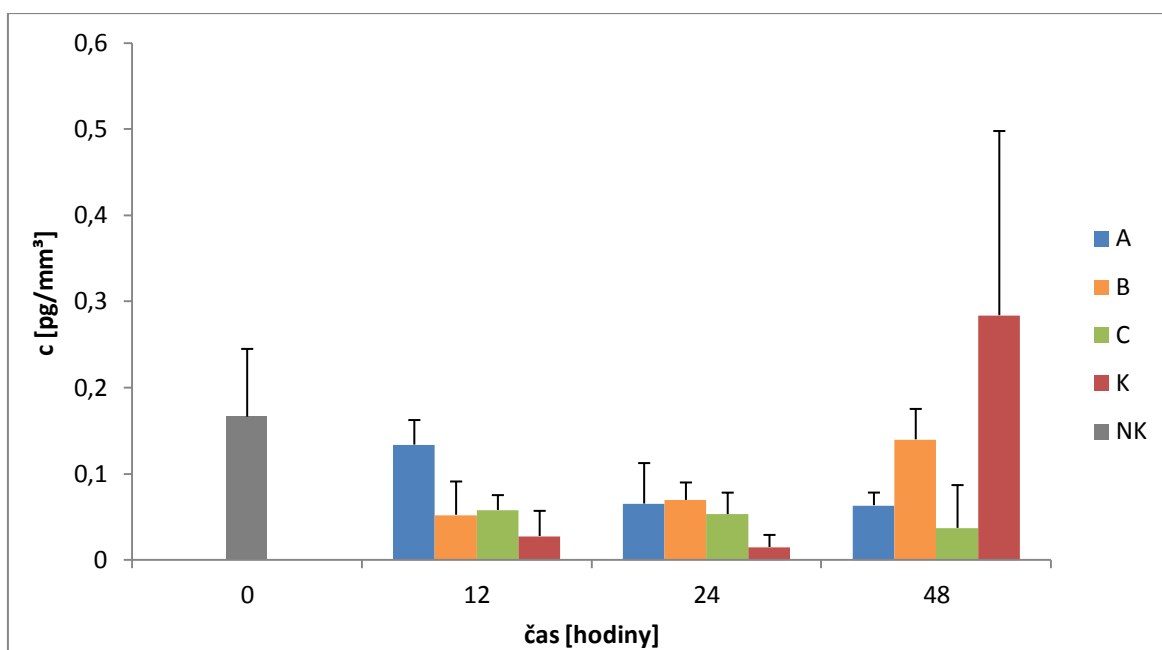
#### 4.6.2 TNF- $\alpha$ (tumor necrosis faktor $\alpha$ )

Pro zjištění koncentrace TNF- $\alpha$  byla sestrojena kalibrační přímka a určena její rovnice regrese (Obr. 12).



**Obr. 12:** Kalibrační přímka pro stanovení TNF- $\alpha$ .

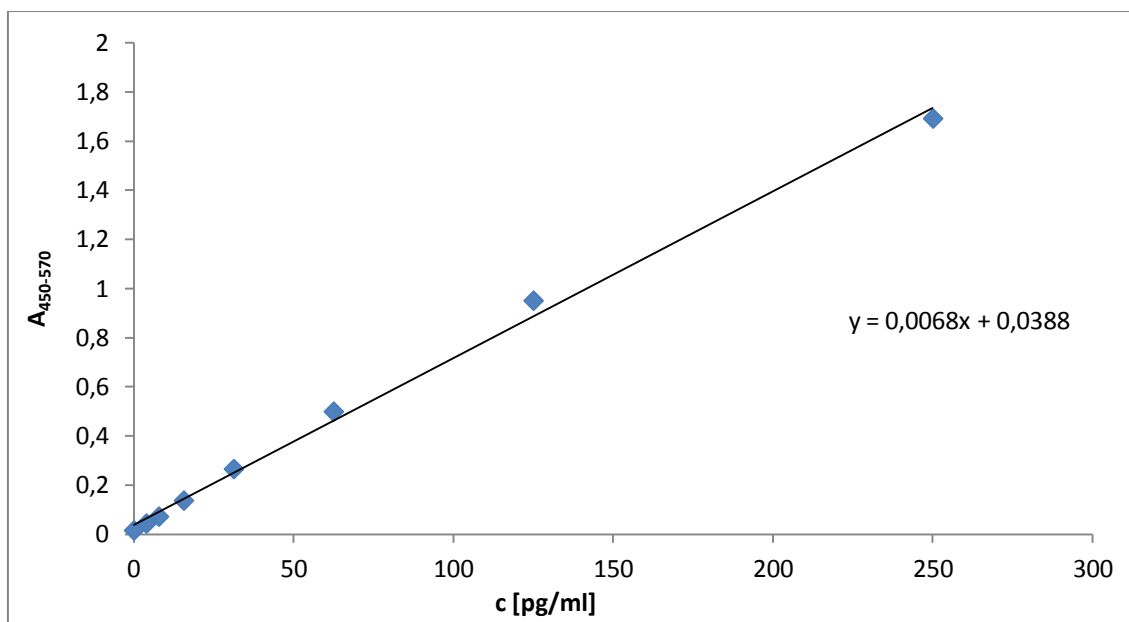
Naměřené koncentrace TNF- $\alpha$  (Obr. 13) byly velmi nízké, téměř ve všech případech byly dokonce nižší než koncentrace naměřené u negativní kontroly. Ve 12 hodin byla nejvyšší hodnota naměřena u skupiny obsahující manan-BAM (skupina A). Ve 24 hodin byly koncentrace TNF- $\alpha$  u skupin A, B a C téměř vyrovnané, koncentrace u kontrolní skupiny byla o něco nižší. Ve 48 hodin byla překvapivě nejvyšší hodnota naměřena u kontrolní skupiny, zvýšená koncentrace byla zaznamenána také u skupiny s LPS (skupina B).



**Obr. 13:** Koncentrace TNF- $\alpha$  v nádoru naměřená v průběhu 48 hodin od zahájení terapie. **A**-manan-BAM, **B**- LPS, **C**- manan-BAM+LPS, **K**- kontrola PBS, **NK**- negativní kontrola

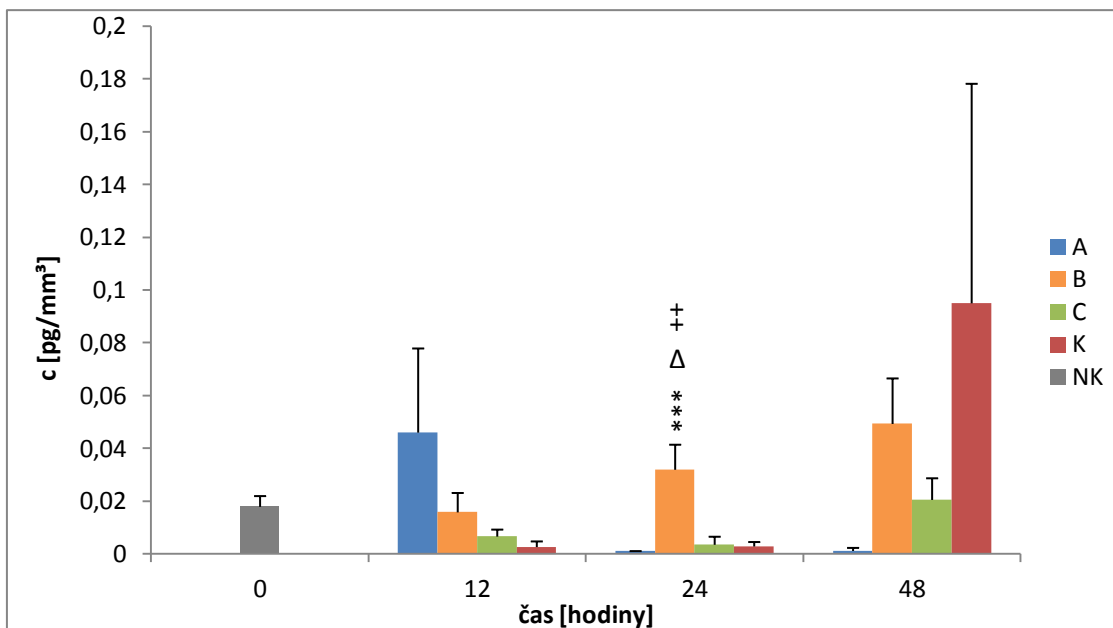
### 4.6.3 IL-6 (interleukin 6)

Na Obr. 14 je znázorněna kalibrační přímka a její rovnice regrese sloužící k určení koncentrace IL-6.



**Obr. 14:** Kalibrační přímka sloužící ke stanovení koncentrace IL-6.

Následující graf (Obr. 15) znázorňuje koncentrace IL-6 po aplikaci léčiva v rozmezí 48 hodin. Naměřené koncentrace IL-6 byly téměř na hranici detekovatelnosti. Skupina léčená pomocí LPS (skupina B) vykazovala v čase postupný nárůst koncentrace. Ve 12 ti hodinách byl u této skupiny zaznamenán výrazný, statisticky významný nárůst koncentrace a to jak proti kontrole, tak proti ostatním skupinám A a C. Po 48 hodinách od zahájení terapie byl nejvyšší nárůst koncentrace IL-6 zaznamenán u kontrolní skupiny (skupina K).



**Obr. 15:** Koncentrace IL-6 v nádoru naměřená v průběhu 48 hodin od zahájení terapie.

**A-** manan-BAM, **B-** LPS, **C-** manan-BAM+LPS, **K-** kontrola PBS, **NK-** negativní kontrola

Hladina statisticky významného rozdílu vůči kontrole: \*  $P \leq 0,05$ , \*\*  $P \leq 0,01$ , \*\*\*  $P \leq 0,005$

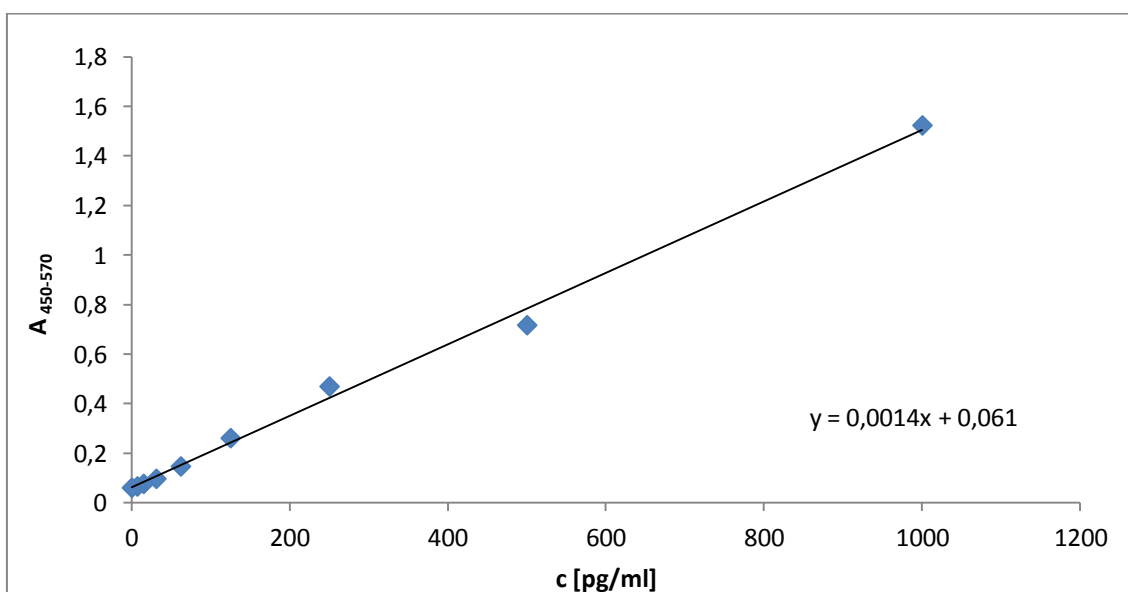
Hladina statisticky významného rozdílu vůči skupině A:  $\Delta P \leq 0,05$ ,  $\Delta \Delta P \leq 0,01$

Hladina statisticky významného rozdílu vůči skupině C: +  $P \leq 0,05$ , ++  $P \leq 0,01$

#### 4.6.4 IL-8 (interleukin-8)

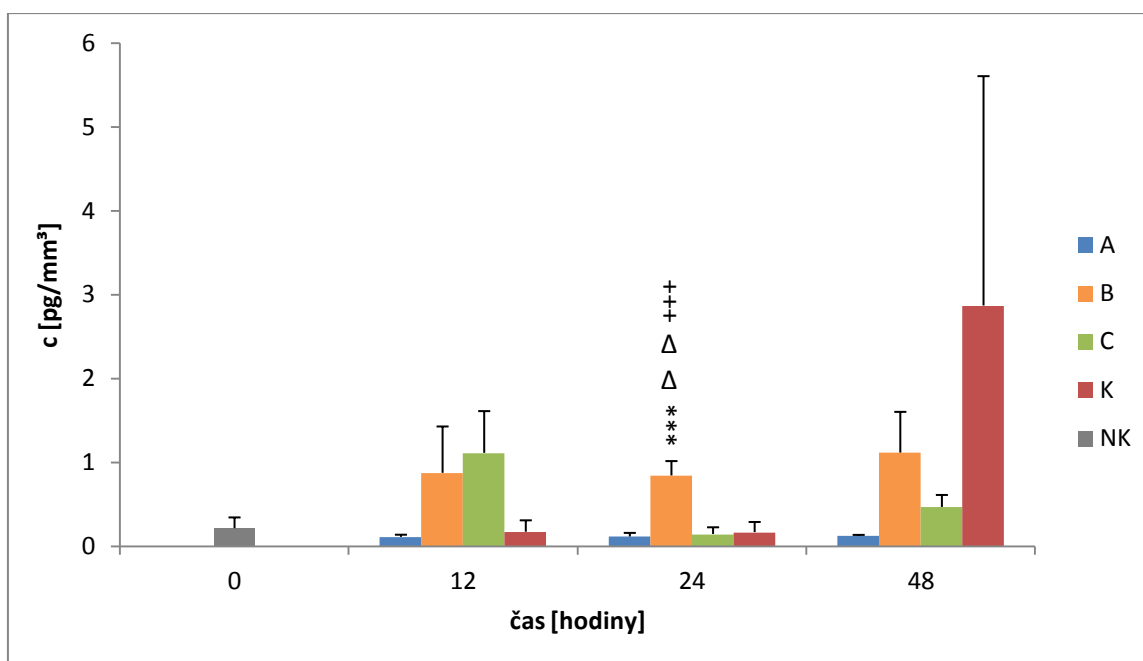
Pro stanovení koncentrace IL-8 byla nejprve sestrojena kalibrační přímka (Obr. 16).

Pomocí rovnice regrese byla následně vypočtena koncentrace tohoto cytokinu.



**Obr. 16:** Kalibrační přímka sloužící ke stanovení koncentrace IL-8.

Koncentrace cytokinu IL-8 v průběhu času jsou zaznamenány v grafu (Obr. 17). Ve všech třech časových intervalech byla zaznamenána zvýšená koncentrace IL-8 pouze u skupiny obsahující samotné LPS (skupina B). Ve 24 hodin dosáhla koncentrace IL-8 u této skupiny statistické významnosti oproti všem ostatním skupinám. Zvýšená koncentrace byla zaznamenána také u skupiny obsahující manan-BAM+LPS po 12 ti hodinách od započetí léčby. Ve 48 hodin nejvyšší koncentrace dosáhla kontrolní skupina.



**Obr. 17:** Koncentrace IL-8 v nádoru naměřená v průběhu 48 hodin od zahájení terapie.

**A**-manan-BAM, **B**- LPS, **C**- manan-BAM+LPS, **K**- kontrola PBS, **NK**- negativní kontrola

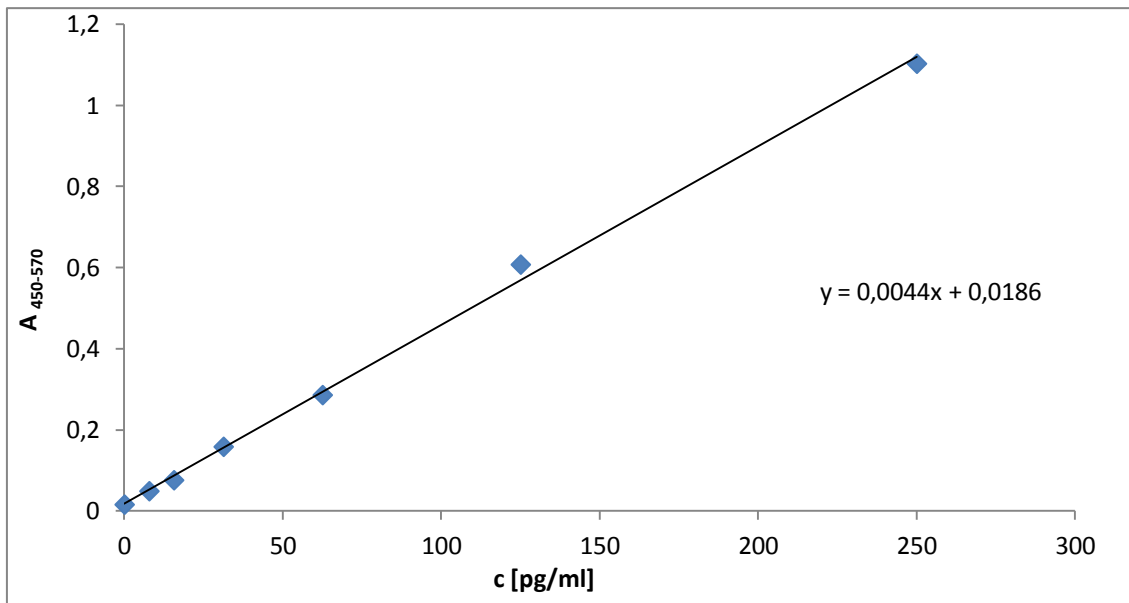
Hladina statisticky významného rozdílu vůči kontrole: \*  $P \leq 0,05$ , \*\*  $P \leq 0,01$ , \*\*\*  $P \leq 0,005$

Hladina statisticky významného rozdílu vůči skupině A:  $\Delta P \leq 0,05$ ,  $\Delta \Delta P \leq 0,01$ ,  $\Delta \Delta \Delta P \leq 0,005$

Hladina statisticky významného rozdílu vůči skupině C: +  $P \leq 0,05$ , ++ $P \leq 0,01$ , +++  $P \leq 0,005$

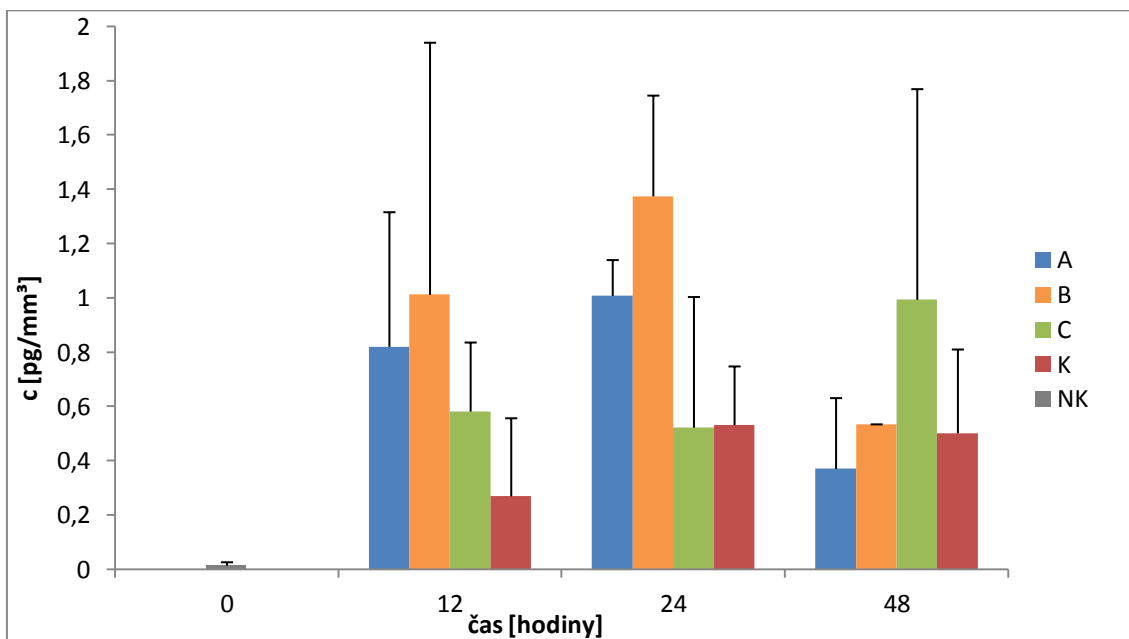
#### 4.6.5 TGF- $\beta$ (tumor growth faktor $\beta$ )

Pro zjištění koncentrace daného cytokinu byla nejprve sestrojena kalibrační přímka a z ní vypočtena rovnice regrese (Obr. 18). Z této rovnice byla následně vypočtena koncentrace TGF- $\beta$  z nádoru.



**Obr. 18:** Kalibrační přímka sloužící ke stanovení koncentrace TGF-β.

Změny hladin TGF-β zaznamenané po aplikaci léčby v časovém rozmezí 48 hodin jsou znázorněné na Obr. 19. V prvních 24 hodinách byl zaznamenán nárůst koncentrace TGF-β u skupin léčených manan-BAM a LPS (skupina A a B). Další nárůst koncentrace nebyl zaznamenán, naopak ve 48 hodin byl patrný výrazný pokles koncentrace cytokinu u těchto dvou skupin. Po 48 hodinách nejvyšší koncentrace dosáhla skupina obsahující manan-BAM+LPS (skupina C).

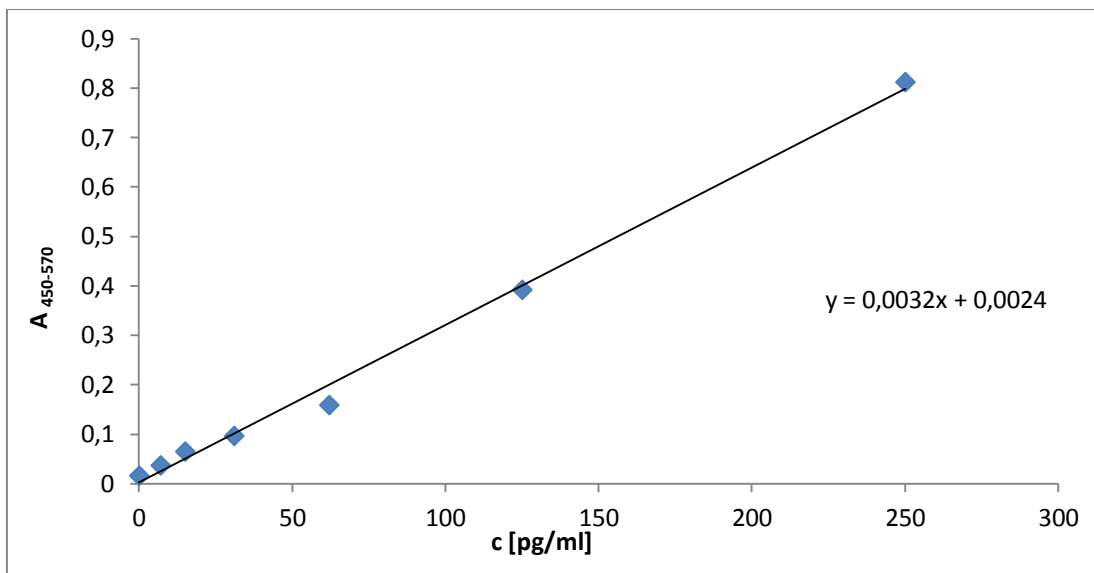


**Obr. 19:** Koncentrace TGF-β v nádoru naměřená v průběhu 48 hodin od zahájení terapie. **A**-manan-BAM, **B**- LPS, **C**- manan-BAM+LPS, **K**- kontrola PBS, **NK**- negativní kontrola



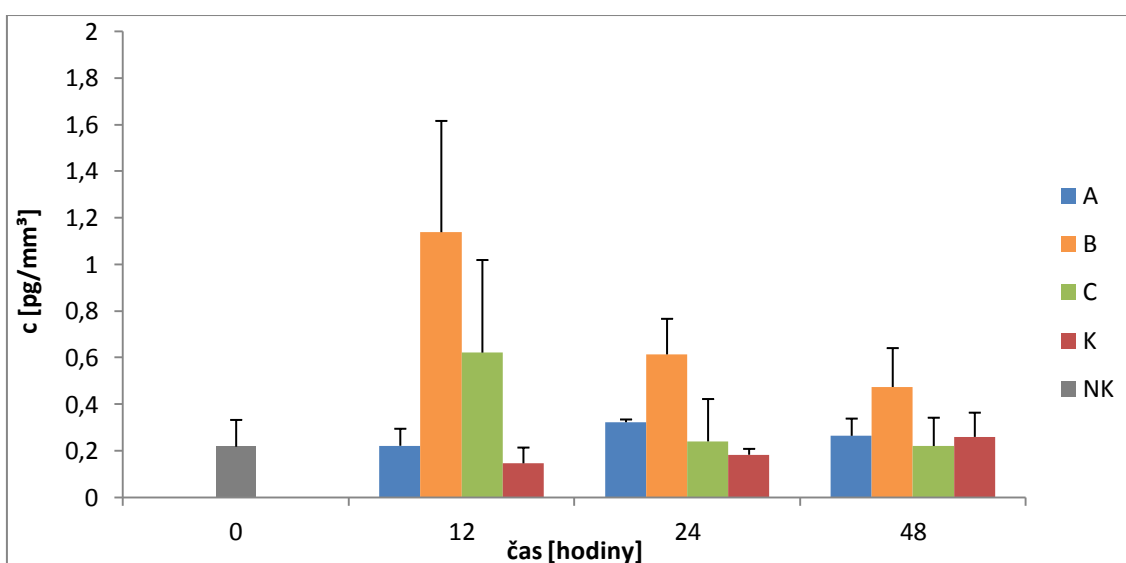
#### 4.6.6 IFN- $\gamma$ (interferon $\gamma$ )

Na následujícím grafu (Obr. 20) je znázorněna kalibrační přímka a její rovnice regrese, které byly použity k výpočtu koncentrace IFN- $\gamma$ .



**Obr. 20:** Kalibrační přímka sloužící ke stanovení koncentrace IFN- $\gamma$ .

V následujícím grafu (Obr. 21) jsou zaznamenány změny koncentrace IFN- $\gamma$  po aplikaci léčiva v rozmezí 48 hodin. Nejvyšších hodnot koncentrace dosahoval tento cytokin ve 12 hodin po aplikaci léčiva. Skupina, které bylo podáváno LPS (skupina B), vykazovala postupně snižující se koncentraci IFN- $\gamma$  v čase. Podobný trend byl zaznamenán i u skupiny léčené směsí manan-BAM+LPS (skupina C).

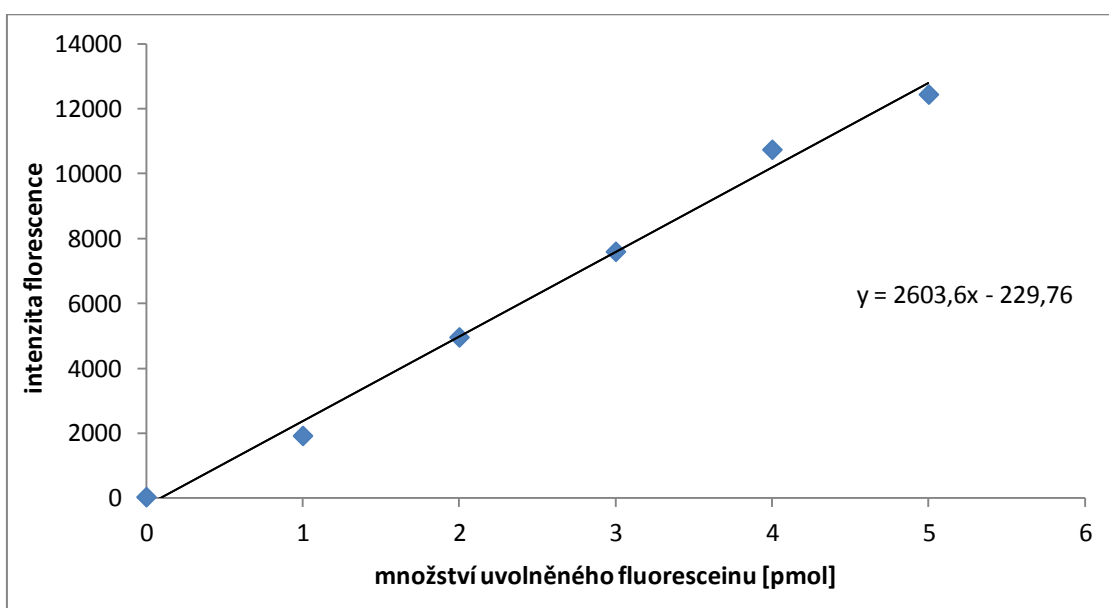


**Obr. 21:** Koncentrace IFN- $\gamma$  v nádoru naměřená v průběhu 48 hodin od zahájení terapie. **A**-manan-BAM, **B**- LPS, **C**- manan-BAM+LPS, **K**- kontrola PBS, **NK**- negativní kontrola

## 4.7 Pokus č. 7: Zavedení a optimalizace metody sloužící k určení míry degranulace neutrofilů při interakci s nádorovými buňkami a ligandem

Cílem tohoto pokusu bylo zjistit, zda neutrofilů zabíjí nádorové buňky procesem exocytózy azurofilních granul. Markerem tohoto procesu je uvolnění MPO do venkovního prostředí. Na detekci a zjištění množství tohoto enzymu, uvolněného při interakci s nádorovými buňkami, byly založeny následující pokusy.

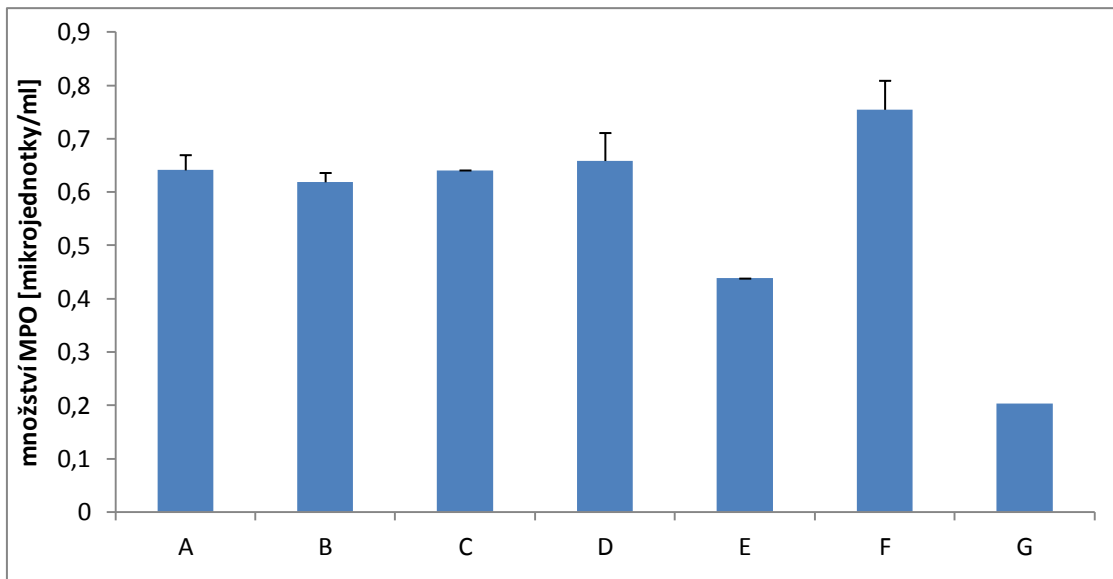
V každém pokusu byla nejprve sestrojena kalibrační přímka (Obr. 22), díky které bylo zjištěno množství uvolněného fluoresceinu.



**Obr. 22:** Kalibrační přímka pro stanovení uvolněné MPO.

### 4.7.1 Zavedení metody stanovení množství uvolněné MPO a studium in vitro interakcí neutrofilů s nádorovými buňkami a ligandem

Tento pokus měl za účel pomoci objasnit, zda při interakci neutrofilů s nádorovými buňkami dochází k degranulaci neutrofilů a exocytóze primárních granul spojené s uvolňováním MPO. Byly testovány různé kombinace s ukotvením ligandu – mananu na nádorové buňky nebo bez něj. Z grafu je patrné (Obr. 23), že při měření MPO nedošlo k výraznějším rozdílům v množství uvolněné MPO u jednotlivých skupin. O něco vyšší byla zaznamenaná hladina MPO pouze u sonikovaných neutrofilů (skupina F).

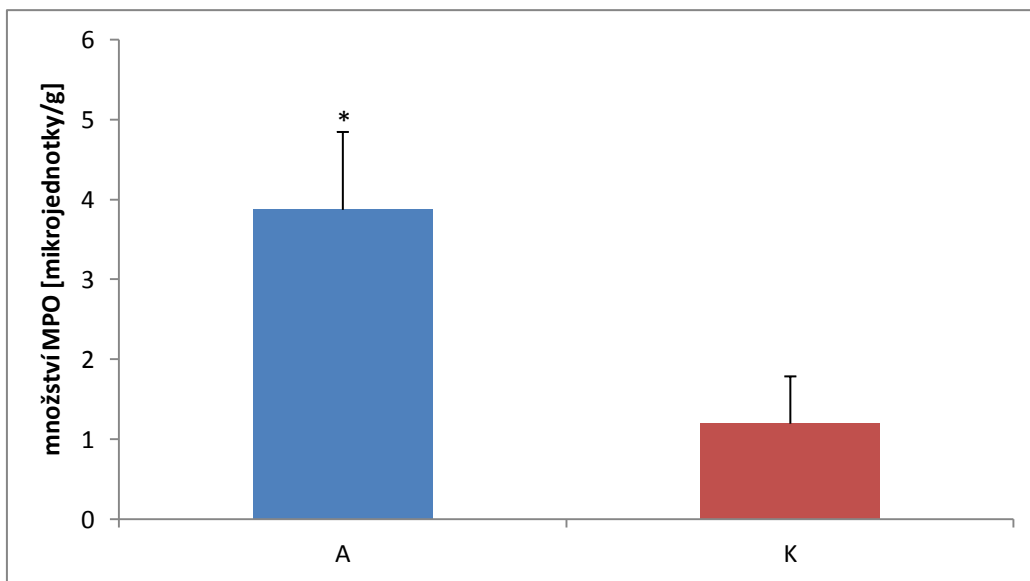


**Obr. 23:** Množství MPO naměřené při in vitro interakci neutrofilů s nádorovými buňkami a ligandem.

*A-neutrofilý+nádorové buňky s ukotveným manan-BAM, B- neutrofilý+ nádorové buňky, C- samotné nádorové buňky, D-samotné neutrofilý, E- sonikované nádorové buňky, F- sonikované neutrofilý, G- kontrola-pufr+master mix*

#### **4.7.2 Zavedení metody a stanovení množství uvolněné MPO v nádorové tkáni po aplikaci LPS**

Tento pokus sloužil k ověření, zda do nádoru migruje zvýšený počet neutrofilů po aplikaci LPS. Jak je patrné z Obr. 24, se náš předpoklad vyplnil, protože u skupiny, které bylo aplikováno LPS, došlo k výraznému nárůstu hladiny MPO oproti skupině kontrolní. Tento nárůst byl statisticky významný.



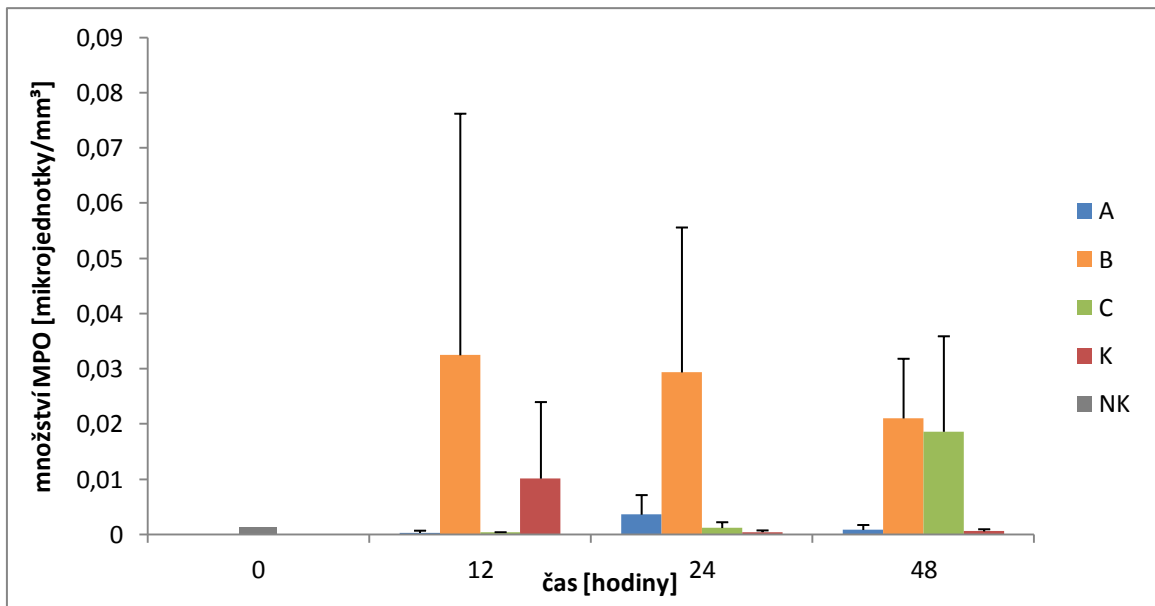
**Obr. 24:** Množství MPO naměřené z nádorové tkáně po aplikaci LPS.

**A** - LPS, **K**- kontrola PBS

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

#### **4.7.3 Zavedení metody a stanovení množství MPO uvolněné do mezibuněčného prostoru nádorové tkáně po aplikaci ligandů**

Cílem tohoto pokusu bylo zjistit, zda aplikace manan-BAM a jeho kombinace s LPS vede během 48 hodin k uvolnění MPO do mezibuněčného prostoru. Zjistili jsme, že u skupiny obsahující samotné LPS (skupina B) byla aktivita MPO zvýšena v průběhu celých 48 hodin. U ostatních skupin byl zaznamenán nárůst hladiny uvolněné MPO pouze u skupiny obsahující manan-BAM+LPS (skupina C), a to ale až ve 48 hodin (Obr. 25).



**Obr. 25:** Množství MPO naměřené z nádorového supernatantu během 48 hodin.

**A-** manan-BAM, **B-** LPS, **C-** manan-BAM+LPS, **K-** kontrola PBS, **NK-** negativní kontrola

## 5. Diskuze

Cílem této diplomové práce byla snaha přispět k objasnění mechanismů vrozené imunity podílejících se na degradaci nádorových buněk s instalovanými ligandy fagocytárních receptorů. Za tímto účelem byly prováděny jak *in vivo* pokusy, ve kterých byly použity převážně imunodeficientní myši, tak také *in vitro* pokusy, založené na sledování produkce cytokinů v nádorové tkáni po aplikaci terapeutické látky a na zavedení a optimalizaci metody sloužící k měření hladiny myeloperoxidázy (MPO), která se uvolňuje při degranulaci neutrofilů.

První dva experimenty byly prováděny na SCID myších, za účelem potvrzení naší hypotézy, že redukce nádorového růstu po aplikaci fagocytárního a signálního ligandu (manan-BAM+LPS, Zymosan-BAM +LPS), je způsobena vrozenou imunitou. To, že pro účinnou redukci nádorového růstu je potřeba kombinace aktivace těchto dvou receptorů, bylo prokázáno již v mnoha předešlých pokusech (Janotová a kol. 2014). Plně to podporuje teorii Underhilla a Gantnera (2004), kteří upozorňují na nutnost spolupráce rozpustných signálních PAMPs s aktivací fagocytárních receptorů za pomoci fagocytárních ligandů, které jsou vázané na povrch mikroorganismů.

V prvním pokusu na SCID myších (transplantován melanom) byla použita pulzní terapie, která probíhala měsíc a byla aplikována ve dnech 0,1,2,...8, 9, 10,...16, 17,18,...24, 25, 26. Při tomto režimu bylo u skupiny léčené směsí manan-BAM+LPS dosaženo průměrně 35,8 % redukce nádorového růstu. Tento pulzní režim byl testován také u myši kmene C57BL/6N, kde skupina léčená směsí manan-BAM+LPS vykazovala dokonce 94,7% redukci nádorového růstu, kromě toho bylo také zaznamenáno statisticky významné prodloužení přežití léčených myší ( $P \leq 0,005$ ) (Janotová a kol. 2014). V našem pokuse se bohužel nepodařilo dosáhnout statisticky významného přežití léčené skupiny myší.

V druhém pokuse (SCID myši s transplantovaným melanomem) bylo schéma léčby odlišné, terapeutická látka byla podávána obden celkem šestkrát. Při tomto způsobu aplikace léčby bylo u skupiny, které byl aplikován manan-BAM+LPS dosaženo dokonce 64,4 % redukce nádorového růstu. Skupina léčená terapeutickou směsí Zymosan-BAM+LPS dosáhla ve stejném časovém rozmezí 62,2 % redukci nádorového růstu. U obou těchto skupin byla redukce nádorového růstu přechodně statisticky významná ( $P \leq 0,05$ ). Po ukončení pokusu byl sledován výskyt metastáz u jednotlivých skupin myší. Metastázy v plicích byly zaznamenány pouze u skupiny kontrolní a to u 66% myší ze skupiny, u ostatních skupin nebyla žádná metastatická ložiska zaznamenána. V pokusech prováděných

Janotovou a kol. (2014) se stejnou terapeutickou látkou (manan-BAM + LPS) a stejným režimem, pouze na odlišném kmeni myši (C57BL/6N) bylo dosaženo 88,6% redukce, která byla v některé dny statisticky významná. Proloužení přežití této skupiny myši nebylo statisticky významné.

Z námi dosažených výsledků je patrné, že terapie manan-BAM + LPS i terapie pomocí Zymosan-BAM + LPS (Zymosan obsahuje jako imunologicky aktivní látky především manan v kombinaci s beta glukánem) na SCID myších funguje. Je tedy pro její fungování zásadní účast vrozené imunity, neboť SCID myši nemají T a B lymfocyty. Účinek této imunoterapie je však nižší ve srovnání s modelem C57BL/6 – melanom B16-F10. Vysvětlení můžeme spatřovat ve spoluúčasti získané imunity na redukci nádorového růstu. Nádory na imunodeficientních myších, jako jsou SCID rostou obecně 2x rychleji, než na myších s plně rozvinutou imunitou (Ženka, ústní sdělení).

Zatímco u myši s plně vyvinutou imunitou se jevil jako výhodnější pulzní režim, u SCID myši jsme zaznamenali opačnou tendenci. Výhodnost pulzního režimu u LPS můžeme spojovat se vznikem rezistence na LPS (Greisman a kol. 1975) Proč však u SCID myši tento jev nepozorujeme je však s ohledem na komplexnost systémů obtížně vysvětlitelné.

V dalších dvou *in vivo* pokusech byly použity CD11b (CR3 – komplementový receptor 3) deficientní myši. Tento receptor je velmi důležitý pro vazbu C3b fragmentu tvořeného při aktivaci komplementu, který je velmi významným opsoninem. Nejprve si povšimneme působení manan-BAM, případně jeho směsi s LPS. Jak prokázala Janotová a kol. (2014), je pro působení manan-BAM rozhodující lektinová aktivace komplementu a následné působení fagocytů na C3b opsonizované buňky.

V pokuse č. 3 byla aplikována pulzní terapie a v následujícím pokuse byla terapeutická látka aplikována obden. U obou režimů byly zaznamenány podobné výsledky. K určité redukci nádorového růstu sice docházelo, nebyla však nijak statisticky významná.

Experiment tedy prokázal důležitost rozpoznání buněk opsonizovaných C3b komplementovým receptorem CR3. Samotná tvorba terminálního komplementového komplexu ani nespécifické působení zánětlivého infiltrátu indukovaného LPS neměly na nádorový růst dostatečný vliv. Pouze synergie infiltrace vyvolané LPS s manan-BAM indukovanou komplementovou řadou s možností CR3 - C3b interakce vede k účinné inhibici nádorového růstu (Janotová a kol. 2014). Naše výsledky tedy potvrdily závěry Janotové a kol. (2014) týkající se mechanismu působení manan-BAM.

Zajímavý je fakt, že u skupiny, které byl podáván Zymosan-BAM+LPS došlo rovněž jen k velmi malé redukci nádorového růstu, přestože bylo zjištěno, že tato kombinace

vyvolává u myši kmene C57BL/6N mohutnou synergii a vede až k 98% redukci nádorového růstu (Waldmannová 2012). Na základě pozorování Browna a kol. (2002), který uvádí, že hlavním receptorem rozpoznávajícím  $\beta$ -glukan u neopsonizovaného Zymosanu je Dectin-1 a nikoliv CR3, bychom předpokládali, že myši deficientní v tomto receptoru budou na léčbu reagovat dobře. Možným vysvětlením by mohlo být to, že Zymosan-BAM aplikovaný společně s LPS snadno aktivuje komplement a stává se tedy C3b opsonizovaný. Takto opsonizovaný Zymosan je pak primárně rozpoznáván CR3 receptorem a nikoliv Dectinem-1 (Hadas a kol. 2010).

Poslední *in vivo* pokus byl prováděn za účelem ověření terapie na odlišném typu nádoru. Byl proto použit sarkom S-180 transplantovaný myším kmene BALB/c. Problémem sarkomu-180 je, že se u něj může objevit spontánní regrese, která je dána snižující se fosfolipidovou aktivitou (Jones a kol. 1939). Toto bylo zaznamenáno i v námi prováděném pokuse, kdy se velikosti nádorů u kontrolní skupiny v průběhu terapie samovolně zmenšovaly. I přesto ale dosáhla skupina léčená směsí manan-BAM+LPS 12. den statisticky významného snížení nádorového růstu, tudíž můžeme tvrdit, že tato terapie je účinná i u tohoto typu nádoru.

Experimenty, ve kterých byly sledovány koncentrace jak prozánětlivých (TNF $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-8 a IFN $\gamma$ ), tak protizánětlivých cytokinů (TGF-beta), měly za cíl objasnit děje probíhající uvnitř nádoru. Především nás zajímalo, zda se kombinace fagocytárních a signálních ligandů (manan+LPS) projeví na změně koncentrace jednotlivých cytokinů.

Problémy vyskytující se při studiu cytokinů a jejich úloze v zánětlivých a imunitních odpovědích jsou dány jejich pleiotropním, synergickým nebo antagonickým účinkům. Ačkoliv byla prováděna řada studií zabývajících se působením jednotlivých cytokinů, je velmi složité porozumět jejich síťovému působení. Aktivované buňky totiž produkují více cytokinů současně v odpovědi na daný podnět, a proto je velmi složité hodnotit účinek jednotlivých cytokinů (Balkwill a Burke 1989). Za tímto účelem jsou v některých studiích prováděny multiplexové analýzy, které kombinují princip sendvičové imunologické analýzy s fluorescenčními technikami, což jim umožní současnou analýzu mnoha různých cytokinů současně (Yurkovetsky a kol. 2007).

To, že melanom opravdu produkuje řadu cytokinů, zaznamenal ve své práci např. Yurkovetsky a kol. (2007). Zjistil, že u pacientů s melanomem byla naměřena statisticky zvýšená koncentrace cytokinů IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IFN- $\alpha$ , TNF- $\alpha$  a některých dalších. Sérové hladiny cytokinů jako je např. IL-2, IL-4, IL-10 nebo INF- $\gamma$  byly detekovatelné, ale nevykazovaly statistickou významnost oproti kontrolní skupině. Některé z těchto cytokinů



(např. IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8...) podporují růst nádorových buněk a zvyšují schopnost nádoru přežít. Díky parakrinnímu působení mohou stimulovat proliferaci endoteliálních buněk, migraci, angiogenezi a metastazování. Některé cytokiny (IL-1, IL-6, TGF- $\beta$ , TNF a IFN) mohou mít také inhibiční účinky, ale pouze na melanocyty nebo časně léze, v pokročilých stádiích melanomu už jsou neúčinné (Lázár-Molnár a kol. 2000).

V námi prováděných pokusech byl zaznamenán zvýšený nárůst koncentrace cytokinů u skupin, kterým bylo podáváno samotné LPS. To, že LPS podporuje produkci některých cytokinů, bylo zjištěno už dříve. Jak je známo LPS aktivuje TLR receptory, které následně spouští kaskádu intracelulárních signálů, které zahrnují aktivaci NF $\kappa$ B, což vede k produkci časných cytokinů jako je např. IL-1, IL-6 a TNF- $\alpha$  (Hopkins 2003). V pokusech, které prováděl Bobrowski a kol. (2005) bylo zjištěno, že myši léčené pomocí LPS vykazovaly zvýšenou produkci některých cytokinů už po dvou hodinách od aplikace. Statisticky zvýšená koncentrace byla zaznamenána u cytokinů – IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$  a TNF- $\alpha$ . Po 24 hodinách byl zaznamenán statisticky významný nárůst ještě u IL-1 $\beta$ , IL-5, IL-12 a GM-CSF (Bobrowski a kol. 2005).

Na základě našich experimentů sledujících změny hladin jednotlivých cytokinů, ale bohužel není možné vysvětlit dříve pozorovanou mohutnou protinádorovou synergii signálních a fagocytárních ligandů. Možným vysvětlením, proč nedošlo k námi očekávané změně koncentrace u skupiny léčené manan-BAM+LPS, by mohl být fakt, že pro uvolnění cytokinů je důležitá funkce manózoového receptoru (MR) (Heinsbroek a kol. 2008). Ten je ale v tomto případě pravděpodobně potlačen přítomností LPS (Shepherd a kol. 1990), a proto se nemůže účinně zapojit do produkce cytokinů. Další možnou hypotézou je to, že při podání této směsi došlo k masivnímu nárůstu koncentrace MBL, díky kterému mohlo dojít k inhibici cytokinů produkovaných LPS stimulací. To, že vysoké dávky MBL (10-20  $\mu$ g/ml) mohou vyvolat snížení produkce TNF- $\alpha$  a IL-12 stimulované LPS zaznamenal při svých pokusech (Wang a kol. 2011). Toto jsou ale pouze hypotézy a k jejich ověření by bylo nutné provést další pokusy.

Naše výsledky odpovídají názoru Janotové a kol. (2014), že pro zánětlivou infiltraci a s ní související změny hladin cytokinů je důležitá prezence LPS. Kotvené ligandy spojené s fagocytózou pak hrají roli v nasměrování imunitního útoku a k jeho intenzitě nepřispívají.

Hlavním smyslem posledního pokusu bylo zjistit, zda jsou nádorové buňky zabíjeny pomocí neutrofilů extracelulárně - tedy pomocí látek uvolněných při exocytóze granúl z neutrofilů. To, že neutrofilové zabíjí nádorové buňky pomocí degranulace zmiňuje ve své práci také Di Carlo a kol. (2001), která pozorovala, že v oblasti vytvoření nekrotického

ložiska je přítomna velká masa degranulovaných neutrofilů s uvolněnými granuly, které se nachází v blízkém kontaktu s nádorovými buňkami a zobrazují známky nevratného poškození. K tomuto přímému zabití nádorových buněk neutrofilů došlo pravděpodobně za přítomnosti cytoklinů IL-2 a TNF- $\alpha$  (Di Carlo a kol. 2001).

První z těchto pokusů byl zaměřen na sledování *in vitro* interakcí neutrofilů s nádorovými buňkami, na nichž byl navázán ligand (manan-BAM+LPS). Mezi jednotlivými skupinami nebyl zaznamenán téměř žádný rozdíl, dokonce ani sonikované neutrofilů, u kterých bychom očekávali zvýšenou hladinu MPO, nebyla změna příliš markantní. Pravděpodobně to bylo způsobeno tím, že při izolaci neutrofilů z peritoneální dutiny za pomoci thioglykolátového média dochází k aktivaci neutrofilů (Itou a kol. 2006). Díky této chemické stimulaci a následným mechanickým a teplotním změnám mohlo dojít k uvolnění granul již během procesu přípravy a proto pak nemohla být aktivita MPO detekována. Aby se předešlo těmto problémům, budou v následujících pokusech používány neutrofilů izolované z kostní dřeně (Ženka, ústní sdělení). Vhodnější by také možná bylo zvýšit poměr neutrofilů k targetům, poměr 5:1 se zdá být nedostačující.

V dalším experimentu byla zjišťována celková aktivita MPO v nádoru po stimulaci LPS. U skupiny myší, kterým bylo LPS aplikováno, byla po 24 hodinách zaznamenána statisticky zvýšená aktivita MPO, podařilo se nám tedy ověřit, že LPS funguje jako silný stimulant neutrofilní infiltrace. Zda přitom došlo k uvolnění MPO z neutrofilů nemůžeme na základě tohoto experimentu určit, neboť jsme stanovovali celkovou MPO po sonikaci tkáně.

V případě stanovení aktivity MPO uvolněné do mezibuněčného prostoru nádoru, byla taktéž zaznamenána zvýšená aktivita MPO u skupiny obsahující samotné LPS. To, že LPS je silný stimulant degranulace neutrofilů bylo pozorováno už dříve, ve své práci to zmiňuje např. Gill a kol. (1998), který potvrdil, že LPS působí jako nejsilnější stimul pro degranulační aktivitu neutrofilů při srovnání s některými cytokiny a stimulačními faktory.

Zajímavé ale je, že tento trend nebyl zaznamenán v případě, že bylo LPS aplikováno společně s kotveným mananem. U této skupiny bylo zaznamenáno uvolnění MPO do mezibuněčného prostoru až ve 48 hodin od aplikace léčby. To si vysvětlujeme tím, že takto kotvený ligand na nádorovou buňku nevyvolá exocytózu a uvolnění granul neutrofilu do prostoru okolo buněk hned, ale těsně přisedne k nádorové buňce a vytvoří jakousi kapsu, do které se granula vylíjí a tím může efektivněji a cíleně nádorovou buňku zabít. Tuto teorii zmiňuje ve své práci i Klebanoff (2005). Z této kapsy se granula uvolní až po více než 24 hodinách od započetí léčby, kdy už jsou nádorové buňky degradovány.

Tyto pokusy založené na sledování aktivity MPO při degranulaci neutrofilů, sloužily spíše jako předpokusy, které by měly napomoci k zavedení a optimalizaci této metody, proto v rozvoji těchto metod a objasnění mechanismů neutrofilů budou pokračovat některé další práce.

Hlavním smyslem této práce bylo alespoň částečně objasnit mechanismy vedoucí k redukci nádorového růstu vyvolaného působením signálních a fagocytárních receptorů a tím přispět k nalezení účinné terapie, která by v budoucnu mohla být použita i k léčbě lidských pacientů. Některé domněnky se nám podařilo ověřit, ale stále zbývá mnoho otázek, na které zatím neumíme odpovědět. Proto i další výzkumy se budou touto problematikou nadále zabývat.

## 6. Souhrn

- Byla potvrzena účinnost léčby (manan-BAM+LPS a Zymosan -BAM+LPS) u imunodeficientních myší SCID a tím i role vrozené imunity v této terapii.
- Byla zjištěna důležitost exprese komplementového receptoru 3 (CR3) pro dosažení účinné redukce nádorového růstu vyvolaného synergii signálních a fagocytárních motivů (manan-BAM+LPS a Zymosan -BAM+LPS).
- Účinnost terapeutických směsí manan-BAM+LPS a Zymosan-BAM +LPS byla prokázána i při léčbě sarkomu – 180 transplantovaného myším kmene BALB/c.
- Dříve pozorovaná mohutná protinádorová synergie signálních a fagocytárních ligandů není založena na synergii v produkci prozánětlivých cytokinů.
- Bylo potvrzeno, že LPS funguje jako silný aktivátor degranulace neutrofilů.
- Bylo zjištěno, že stimulace neutrofilů pomocí manan-BAM+LPS vede k uvolnění MPO do mezibuněčného prostoru až ve 48 hodin od započetí terapie, do té doby pravděpodobně zůstává v uzavřeném prostoru mezi neutrofilem a nádorovou buňkou.

## 7. Seznam zkratek

APC	antigen-prezentující buňka (antigen-presenting cell)
ATP	adenosintrifosfát
BAM	biokompatibilní kotva pro membrány (Biocompatible Anchor for cell Membrane)
CD	označení povrchových molekul leukocytů (cluster of differentiation)
CNS	centrální nervový systém
CR3	komplementový receptor 3
CTL	cytotoxické T lymfocyty
DAF	membránový protein (decay accelerating factor )
DAMPs	s poškozením asociované molekulární vzory (damage associated molecular patterns)
DC	dendritická buňka (dendritic cell)
ELISA	imunologická metoda (z anglického Enzyme – Linked ImmunoSorbent Assay)
FCS	fetální telecí sérum (z anglického Fetal Calf Serum)
Foxp3	protein imunitního systému (forkhead box P3)
GM-CSF	růstový faktor stimulující granulocyto-makrofágové kolonie (granulocyte-macrophage colony stimulating factor)
IDO	enzym indoleamine- 2,3 dioxygenase
IFN	interferon
IL	interleukin
ITAM	motiv v intracelulární doméně (immunoreceptor tyrosine-based activation motif)
ITGAM	proteinová podjednotka (Integrin $\alpha$ M)
LPS	lipopolysacharid
MASP	serinová protéza spojená s MBL (MBL-associated serine protease)
MBL	lektin vázající manózu (mannan-binding lectin)
MHC	hlavní histokompatibilní komplex (major histocompatibility complex)
MR	makrofágový receptor pro manózu (manose receptor)
MPO	myeloperoxidáza
NETs	neutrofilní extracelulární sítě (neutrophil extracellular traps)

NF- $\kappa$ B	transkripční faktor (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cell)
NK	přirozený zabíječ (natural killer)
NLRs	NOD-like receptory (NOD-like receptors)
PAMPs	s patogenem asociované molekulové vzory (patogen-associated molecular patterns)
PBS	pufrovaný fyziologický roztok (Phosphate Buffered Saline)
PGE2	prostaglandin E2
PRRs	receptory rozpoznávající patogeny (pattern recognition receptors)
ROS	reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species)
SCID	těžká kombinovaná imunodeficiencie (severe combined immunodeficiency)
SR/CR	spontánní regrese / kompletní rezistence
TAMs	s nádorem asociované makrofágy (tumor-associated macrophages)
TANs	s nádorem asociované neutrofilny (tumor-associated neutrophils)
TGF	transformující růstový faktor (transforming growth factor)
TLR	Toll-like receptor
TNF	faktor nádorové nekrózy (tumor necrosis factor)
Treg	regulační T-lymfocyt (regulatory T cell)
UV	ultrafialové záření
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor (vascular endothelial growth factor)

## 8. Seznam použité literatury

**Adámková Krákorová D.** Systémová léčba sarkomů měkkých tkání dospělých vyjma GIST. *Onkologie* 2010; 4: 308-310.

**Balkwill FR, Burke F.** The cytokine network. *Immunology Today* 1989; 10: 299-304.

**Becker HD, Hohenberger W, Junginger T, a kol.** Chirurgická onkologie. Grada 2005; 880 s.

**Belizário JE.** Immunodeficient Mouse Models: An Overview. *The Open Immunology Journal* 2009; 2: 79-85.

**Bobrowski WF, McDuffie JE, Sobocinski G, Chupka J, Olle E, Bowman A, Albassam M.** Comparative methods for multiplex analysis of cytokine protein expression in plasma of lipopolysaccharide-treated mice. *Cytokine* 2005; 32: 194-198.

**Bowdish DME, Gordon S.** Macrophage Biology. In: *Protozoans in Macrophages*. Landes Biosciences 2007;1-15.

**Brown GD, Taylor PR, Reid DM, Willment JA, Williams DL, Martinez-Pomarez L, Wong SYC, Gordon S.** Dectin-1 Is A Major  $\beta$ -Glucan Receptor On Macrophages. *The Journal of Experimental Medicine* 2002; 196: 407-412.

**Caligiuri MA.** Human natural killer cells. *Blood* 2008; 112: 461-469.

**Carpentier A, Laigle-Donadey F, Zohar S, Capelle L, Behin A, Tibi A, Martin-Duverneuil N, Sanson M, Lacomblez L, Taillibert S.** Phase 1 trial of a CpG oligodeoxynucleotide for patients with recurrent glioblastoma. *Journal of Neuro-oncology* 2006; 8: 60-66.

**Cawley TN, Ballou CE.** Identification of Two *Saccharomyces cerevisiae* Cell Wall Mannan Chemotypes. *Journal of Bacteriology* 1972; 111: 690-695.

**Coley WB.** Contribution to the knowledge of sarcoma. *Annals of Surgery* 1891; 14: 199-220.

**Coley WB.** The Treatment of Inoperable Sarcoma by Bacterial Toxins (the Mixed Toxins of the *Streptococcus erysipelas* and the *Bacillus prodigiosus*). *Proceedings of the Royal Society of Medicine* 1910; 3: 1-48.

**Cui Z, Willingham MC, Hicks AM, Alexander-Miller MA, Howard TD, Hawkins GA, Miller MS, Weir HM, Du W, DeLong CJ.** Spontaneous regression of advanced cancer: Identification of a unique genetically determined, age-dependent trait in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003; 100: 6682–6687.

**Čáp R, Dobeš D, Hošek F, Hyža P.** Maligní melanom. *Vojenské zdravotnické listy* 2005; 74: 4-8.

**Damsky WE, Bosenberg M.** Mouse melanoma models and cell lines. *Pigment Cell & Melanoma Research* 2010; 23: 853-859.

**Di Carlo E, Forni G, Lollini P, Colombo MP, Modesti A, Musiani P.** The intriguing role of polymorphonuclear neutrophils in antitumor reactions. *Blood* 2001; 97: 339-345.

**Dillon S, Agrawal S, Banerjee K, Letterio J, Denning TL, Oswald-Richter K, Kasproicz DJ, Kellar K, Pare J, Dyke T, Ziegler S, Unutmaz D, Pulendran B.** Yeast zymosan, a stimulus for TLR2 and dectin-1, induces regulatory antigenpresenting cells and immunological tolerance. *The Journal of Clinical Investigation* 2006; 116: 916-928.

**Dinarello ChA.** Historical insights into cytokines. *European Journal of Immunology* 2007; 37: 34-45.

**Dinasarapu AR, Chandrasekhar A, Fujita T, Subramaniam S.** Mannose/mannan-binding lectin. *UCSD Molecule Pages* 2013; 2: 8-18.

**Ditrichová D, Tichý M.** Maligní melanom – nejzhubnější kožní nádor. *Interní medicína pro praxi* 2006; 7 a 8: 352–354.

**Dranoff G.** Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Cancer* 2004; 4: 11-22.

**Finn OJ.** Cancer Immunology. *The New England Journal of Medicine* 2008; 358: 2704-2715.

**Fong L, Engleman E.** Dendritic cells in cancer immunotherapy. *Annu Rev Immunolo* 2000; 18: 245-273.



**Fujita T, Inoue T, Ogawa K, Iida K, Tamura N.** The Mechanism of Action of Decay-Accelerating Factor (DAF). DAF Inhibits the Assembly of C3 Convertases by Dissociating C2a and Bb. *The Journal of Experimental Medicine* 1987; 166: 1221-1228.

**Gill EA, Imaizumi T, Carveth H, Topham MK, Tarbet EB, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA.** Bacterial lipopolysaccharide induces endothelial cells to synthesize a degranulating factor for neutrophils. *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 1998; 12: 673-684.

**Goodman MG, Wormsley SB, Spinosa JC, Piro LD.** Loxoribine induces chronic lymphocytic leukemia B cells to traverse the cell cycle. *Blood* 1994; 84: 3457-3464.

**Greisman S, Young E, Workman J, Olodart R, Hornick R.** Mechanisms of endotoxin tolerance. The role of the spleen. *The Journal of Clinical Investigation* 1975; 56: 1597-1607.

**Hadas S, Reichert F, Rotshenker S.** Dissimilar and Similar Functional Properties of Complement Receptor-3 in Microglia and Macrophages in Combating Yeast Pathogens by Phagocytosis. *Glia* 2010; 58: 823-830.

**Hajdu SI.** A Note From History: Landmarks in History of Cancer, Part 1. *Cancer* 2011; 117: 1097-1102.

**Hajdu SI.** A Note From History: Landmarks in History of Cancer, Part 2. *Cancer* 2011; 117: 2811-2820.

**Hajdu SI.** A Note From History: Landmarks in History of Cancer, Part 3. *Cancer* 2012; 118: 1155-1168.

**Hajdu SI.** A Note From History: Landmarks in History of Cancer, Part 4. *Cancer* 2012; 118: 4914-4928.

**Hanahan D, Weinberg RA.** Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 2011;144: 646-674.

**Hanahan D, Weinberg RA.** The Hallmarks of Cancer. *Cell* 2000; 100: 57-70.

**Hatina J.** Imunologie nádorů – současný stav a poznatky z 1. mezinárodní konference základní a klinické imunogenomiky. Část I – interakce nádoru a imunitního systému. *Klinická onkologie* 2005; 18: 119-125.

**Heinsbroek SEM, Taylor PR, Martinez FO, Martinez-Pomarez L, Brown GD, Gordon S.** Stage-Specific Sampling by Pattern Recognition Receptors during *Candida albicans* Phagocytosis. *PLoS Pathogens* 2008; 4: 1-11.

**Hicks AM, Riedlinger G, Willingham MC, Alexander-Miller MA, Von Kap-Herr C, Pettenati MJ, Sanders AM, Weir HM, Du W, Kim J, Simpson AJG, Old LJ, Cui Z.** Transferable anticancer innate immunity in spontaneous regression/complete resistance mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006; 103: 7753-7758.

**Hopkins SJ.** The pathophysiological role of cytokines. *Legal Medicine* 2003; 5: 45–57.

**Houghton AM, Rzymkiewicz DM, Ji H, Gregory AD, Egea EE, Metz HE, Stolz DB, Land SR, Marconcini LA, Kliment CR, Jenkins KM, Beaulieu KA, Mouded M, Frank SJ, Wong KK, Shapiro SD.** Neutrophil Elastase-Mediated Degradation of IRS-1 Accelerates Lung Tumor Growth. *Nature Medicine* 2010; 16: 219-223.

**Inaba M, Tazuko T, Fujimoto S, Sakuraiy MK, Ohnishi Y, Ueyama Y, Nomura T.** Evaluation of response rates to various antitumor agents of human gastric tumours implanted in nude mouse. *Japanese Journal of Cancer Research* 1986; 77: 190-196.

**Ip WKE, Takahashi K, Ezekowitz RA, Stuart LM.** Mannose-binding lectin and iKate Immunity. *Immunological Reviews* 2009; 230: 9-21.

**Itou T, Collins V, Thorén FB, Dahlgren C, Karlsson A.** Changes in Activation States of Murine Polymorphonuclear Leukocytes (PMN) during Inflammation: a Comparison of Bone Marrow and Peritoneal Exudate PMN. *Clinical and Vaccine Immunology* 2006; 13: 575-583.

**Janotová T, Jalovecká M, Auerová M, Švecová I, Bruzlová P, Maierová V, Kumžáková Z, Čunátová Š, Vlčková Z, Caisová V, Rozsypalová P, Lukáčová K, Vácová N, Wachtlová M, Salát J, Lieskovská J, Kopecký J, Ženka J.** The Use of Anchored Agonists of Phagocytic Receptors for Cancer Immunotherapy: B16-F10 Murine Melanoma Model. *PLoS ONE* 2014; 9: 1-14.

**Jones GH, Ballou CE.** Studies on the Structure of Yeast Mannan: I. purification and some properties of an  $\alpha$ -mannosidase from an arthrobacter species. *The Journal of Biological Chemistry* 1969; 244: 1043-1051.

**Jones HB, Chaikoff IL, Lawrence JH.** Radioactive phosphorus as an indicator of phospholipid metabolism: VI. The phospholipid metabolism of neoplastic tissues (mammary carcinoma, lymphoma, lymphosarcoma, sarcoma 180). *The Journal of Biological Chemistry* 1939; 128: 631-644.

**Kanzler H, Barrat FJ, Hessel EM, Coffman RL.** Therapeutic targeting of ikate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists. *Nature Medicine* 2007; 13: 552-559.

**Kato K, Itoh Ch, Yasukouchi T, Nagamune T.** Rapid Protein Anchoring into the Membranes of Mammalian Cells Using Oleyl Chain and Poly (ethylene glycol) Derivatives. *Biotechnology Progress* 2004; 20: 897-904.

**Kauffman EC, Liu H, Schwartz MJ, Scherr DS.** Toll-Like Receptor 7 Agonist Therapy with Imidazoquinoline Enhances Cancer Cell Death and Increases Lymphocytic Infiltration and Proinflammatory Cytokine Production in Established Tumors of a Renal Cell Carcinoma Mouse Model. *Journal of Oncology* 2012; 2012: 1-11.

**Khanna R.** Missing peptides and MHC molecules. *Immunology and Cell Biology* 1998; 76: 20-26.

**Khazaie K, Blatner NR, Khan MW, Gounari F, Gounaris E, Dennis K, Bonertz A, Tsai F, Strouch MJ, Cheon E, Phillips JD, Beckhove P, Bentrem DJ.** The significant role of mast cells in cancer. *Cancer and Metastasis Reviews* 2011; 30: 45-60.

**Klebanoff SJ.** Myeloperoxidase: friend and foe. *Journal of Leukocyte Biology* 2005; 77: 598-625.

**Kobayashi SD, Voyich JM, Burlak Ch, DeLeo R.** Neutrophils in the innate immune response. *Archivum Immunologiae et Therapia Experimentalis* 2005; 53: 505-517.

**Kopecký J, Kopecký O.** NK buňky, chemokiny a chemokinové receptory. *Klinická onkologie* 2010; 23: 5-9.

**Koretz K, Brüderlein, Henne C, Möller P.** Decay-accelerating factor (DAF, CD55) in normal colorectal mucosa, adenomas and carcinomas. *British Journal of Cancer* 1992; 66: 810-814.

**Krejsek J, Kudlová M, Koláčková M.** Imunitní systém a stárnutí. *Česká geriatrická revue* 2005; 3: 36-42.

**Kumar V, Sharma A.** Neutrophils: Cinderella of innate immune systém. *International Immunopharmacology* 2010; 10: 1325-1334.

**Lacy P.** Mechanisms of Degranulation in Neutrophils. *Allergy, Asthma, and Clinical Immunology* 2006; 2: 98-108.

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

**Lin WW, Karin M.** A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *The Journal of Clinical Investigation* 2007; 117: 1175-1183.

**Lovas P, Lovasová Z, Garčicová J.** Role radioterapie v léčbě sarkomů měkkých tkání. *Onkologie* 2010; 4: 302-307.

**Mačák J, Mačáková J.** *Patologie*. Grada 2004; 347s.

**Maeda Oda JM, Guembarovski RL, Watanabe MAE.** Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) and Regulatory T Cells (Treg): The Interface of Tumor and Host Immunity. *European Journal of Clinical & medici Oncology* 2012; 4: 27-32.

**Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S.** Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Immunology* 2011; 11: 519-531.

**Martinez-Pomarez L.** The manose receptor. *Journal of Leukocyte Biology* 2012; 92: 1177-1186.

**Maruyama K, Selmani Z, Ishii H, Yamaguchi K.** Innate immunity and cancer therapy. *International Immunopharmacology* 2011; 11: 350-357.

**Medzhitov R, Janeway Ch.** Innate immunity. *The New England Journal of Medicine* 2000; 343: 338-344.

**Melo MD, Catchpole IR, Haggar G, Stokes RW.** Utilization of CD11b Knockout Mice to Characterize the Role of Complement Receptor 3 (CR3, CD11b/CD18) in the Growth of *Mycobacterium tuberculosis* in Macrophages. *Cellular Immunology* 2000; 205: 13-23.

**Meyer JP, Persad R, Gillatt DA.** Use of bacille Calmette-Guérin in superficial bladder Cancer. *Postgraduate Medical Journal* 2002; 78: 449–454.

**Nakamura K, Yoshikawa N, Yamaguchi Y, Kagota S, Shinozuka K, Kunitomo M.** Characterization of mouse melanoma cell lines by their mortal malignancy using an experimental metastatic model. *Life Sciences* 2002; 70: 791–798.

**Pathak S, Palan U.** *Immunology: Essential and Fundamental.* Science Publishers 2005, 411 s.

**Pekarek LA, Starr BA, Toledano AY, Schreiber H.** Inhibition of Tumor Growth by Elimination of Granulocytes. *The Journal of Experimental Medicine* 1995; 181: 435-440.

**Pillemer L, Ecker EE.** Anticomplementary factor in fresh yeast. *The Journal of Biological Chemistry* 1941; 137: 139-142.

**Queen MM, Ryan RE, Holzer RG, Keller-Peck C, Joreyk ChL.** Breast Cancer Cells Stimulate Neutrophils to Produce Oncostatin M: Potential Implications for Tumor Progression. *Cancer Research* 2005; 65: 8896-8904.

**Rabinovich GA, Gabrilovich D, Sotomayor EM.** Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annual Review of Immunology* 2007; 25: 267-296.

**Rallabhandi P, Bell J, Boukhvalova MS, Medvedev A, Lorenz E, Arditi M, Hemming VG, Blanco JCG, Segal DM, Vogel SN.** Analysis of TLR4 Polymorphic Variants: New Insights into TLR4/MD-2/CD14 Stoichiometry, Structure, and Signaling. *The Journal of Immunology* 2006; 177: 322-332.

**Rhodes B, Fürnrohr BG, Roberts AL, Tzicotis G, Schett G, Spector TD, Vyse TJ.** The *rs1143679* (R77H) lupus associated variant of *ITGAM* (CD11b) impairs complement receptor 3 mediated functions in human monocytes. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2012; 71: 2028-2034.

**Rosner MR, Tang J, Barzilay I, Khorana HG.** Structure of the Lipopolysaccharide from an *Escherichia coli* Heptose-less Mutant. *The Journal of Biological Chemistry* 1979; 254: 5906-5917.

**Rossi M, Young JW.** Human Dendritic Cells: Potent Antigen-Presenting Cells at the Crossroads of Innate and Adaptive Immunity. *The Journal of Immunology* 2005; 175: 1373-1381.

**Selander B, Märtensson U, Weintraub A, Holmström E, Matsushita M, Thiel S, Jensenius JC, Truedsson L, Sjöholm AG.** Mannan-binding lectin activates C3 and the alternative complement pathway without involvement of C2. *The Journal of Clinical Investigation* 2006; 116: 1425-1434.

**Shaikh PZ.** Cytokines & their physiologic and pharmacologic functions in inflammation: A review. *International Journal of Pharmacy & Life Sciences* 2011; 2: 1247-1263.

**Shepherd VL, Abdolrasulnia R, Garrett M, Cowan HB.** 1990: Down-regulation of mannose receptor activity in macrophages after treatment with lipopolysaccharide and phorbol esters. *The Journal of Immunology* 1990; 145: 1530-1536.

**Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA.** Interferon- $\gamma$ : an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of Leukocyte Biology* 2004; 75: 163-189.

**Takeda K, Akira S.** Toll-like receptors in innate immunity. *International Immunology* 2005; 17: 1-14.

**Teicher BA, Alvarez E, Ang KK a kol.** *Tumor Models in Cancer Research*. Second edition. Humana Press 2011; 693s.

**Ting JP, Lovering RC, Alnemri ES, Bertin J, Boss JM, Davis B, Flavell RA, Girardin SE, Godzik A, Harton JA, Hoffman HM, Hugot JP, Inohara N, Mackenzie A, Maltais LJ, Nunez G, Ogura Y, Otten LA, Philpott D, Reed JC, Reith W, Schreiber S, Steimle V, Ward PA.** The NLR gene family: An official nomenclature. *Immunity* 2008; 28: 285-287.

**Torosantucci A, Bromuro C, Chiani C, De Bernardis F, Berti F, Galli CH, Norelli F, Bellucci C, Polonelli L, Constantino P, Rappuoli R, Cassone A.** A novel glyco-conjugate valine against fungal pathogens. *Journal of Experimental Medicine* 2005; 202: 597-606.

**Tuong W, Cheng LS, Armstrong AW.** **Melanoma:** Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Outcomes. *Dermatologic clinics* 2012; 30: 113-124.

**Turvey SE, Broide DH.** Innate immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2010; 126: 24-32.

**Underhill DM, Gantner B.** Integration of Toll-like receptor and phagocytic signaling for tailored immunity. *Microbes and Infection* 2004; 6: 1368–1373.

**Végh V.** Nové poznatky z oblasti beta-glukanů. *Educafarm farmi news* 2009; 4: 31-32.

**Vetvicka V, Dvorak B, Vetvickova J, Richter J, Krizan J.** Orally administered marine (1→3)-β-D-glucan phycarine stimulans both humoral and cellular imunity. *International Journal of Biological Macromolecules* 2007; 40: 291-298.

**Vetvicka V, Vetvickova J.** β-glucan-indomethacin combination produces no lethal effects. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czech Republic* 2009; 153: 111–116.

**Větvička V.** Chytrý glukan. *Chemické listy* 2004; 98: 963.

**Vineis P, Schatzkin A, Potter JD.** Models of carcinogenesis: an overview. *Carcinogenesis* 2010; 31: 1703-1709.

**Vladutiu AO.** The severe combined immunodeficient (SCID) mouse as a model for the study of autoimmune diseases. *Clinical and Experimental Immunology* 1993; 93: 1-8.

**Vorlíček J, Abrahámová J, Vorlíčková H, a kol.** *Klinická onkologie pro sestry.* Grada 2006; 328 s.

**Voronov E, Shouval DS, Krelin Y, Cagnano E, Benharroch D, Iwakura Y, Dinarello ChA, Apte RN.** IL-1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis. *Proceeding of the National Academy of Sciences* 2003; 100: 2645-2650.

**Waldmannová E.** Studium nádorové terapie pomocí Zymosanu A. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Přírodovědecká fakulta, Bakalářská práce 2012; 48 s.

**Wang M, Chen Y, Zhang Y, Zhang L, Lu X, Chen Z.** Mannan-binding lectin directly interacts with Toll-like receptor 4 and suppresses lipopolysaccharide-induced inflammatory cytokine secretion from THP-1 cells. *Cellular & Molecular Immunology* 2011; 8: 265–275.

**Waugh DJJ, Wilson C.** The Interleukin-8 Pathway in Cancer. *Clinical Cancer Research* 2008; 14: 6735-6741.

**Wynn TA, Chawla A, Pollard JW.** Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature* 2013; 496: 445-455.

**Yurkovetsky ZR, Kirkwood JM, Edington H, Marrangoni AM, Velikokhatnaya L, Winans M, Gorelik E, Lokshin A.** Multiplex Analysis of Serum Cytokines in Melanoma Patients Treated with Interferon- $\alpha$ 2b. *Clinical Cancer Research* 2007; 13: 2422-2428.

**Zeković DB, Kwiatkowski S, Vrvic MM, Jakovljevic D, Moran CA.** Natural and Modified (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-Glucans in Health Promotion and Disease Alleviation. *Critical Reviews in Biotechnology* 2005; 25: 205-230.

**Zuckerberg C.** Ultrastructure of Sarcoma 180. *Cancer Research* 1973; 33: 2278-2282.

**Zvolský M.** Zhoubné nádory v roce 2010. Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR 2013; 5: 1-11.