

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

**Histologická analýza terapie melanomu B16-F10 pomocí agonistů  
TLRs a fagocytárních receptorů.**

Diplomová práce

**Bc. Divoká Petra**

Vedoucí práce: RNDr. Ženka Jan, CSc.

České Budějovice 2014

### **Diplomová práce:**

Divoká, P., 2014: Histologická analýza terapie melanomu B16-F10 pomocí agonistů TLRs a fagocytárních receptorů. [Histologic analysis of melanoma B16-F10 therapy by agonist of TLRs and phagocyte receptors. Mgr. Thesis, in Czech.]- 91 p., Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

### **Cíle práce:**

Cílem této práce bylo přispět k objasnění působení agonistů TLR a fagocytárních receptorů na melanom B16-F10 s využitím histologické analýzy. [The aim of this Thesis was to contribute to clarification of the effect of both TLR and phagocytic receptor agonists on melanoma B16-F10 using histological analysis.]

Prohlašuji, že jsem tuto magisterskou práci vypracovala samostatně, pouze s použitím v ní 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 dne 12.3.2014

**Anotace:**

Cílem předložené práce bylo přispět k objasnění působení ligandů TLR a fagocytárních receptorů při léčbě melanomu B16-F10 na myším modelu. Bylo testováno několik ligandů fagocytárních receptorů a jejich kombinace s lipopolysacharidem (LPS). Ligandy fagocytárních receptorů byly použity ve formě umožňující kotvení do nádorových buněk, jednalo se o tyto sloučeniny: f-MLFKK-BAM<sub>4000</sub>, laminarin-BAM<sub>4000</sub>, mannan-BAM<sub>4000</sub>.

Získané výsledky potvrdily, že dříve pozorovaná mohutná synergie působení LPS (aktivace TLR4) a aktivace fagocytárních receptorů ligandy kotvenými na nádorové buňky nachází na histologické úrovni vysvětlení v podobě rozsáhlé nekrotizace nádorové masy.

**Anotation:**

The aim of submitted Thesis was to contribute to illustration on effect of TLR and fagocyte receptors in melanoma B16-F10 treatment with mouse model. Currently, a consequence of different ligands of fagocyte receptors and their combination with liposacharide (LPS) was tested. Ligands of fagocyte receptors was used in form enabled inside tumor cells anchoring. It deals with these compounds: f-MLFKK-BAM<sub>4000</sub>, laminarin-BAM<sub>4000</sub>, mannan-BAM<sub>4000</sub>.

Gained results confirmed that previously observed huge synergy of LPS (activation of TLR4) and activation of phagocytic receptors by ligands anchored to tumor cells found the clarification in the form of extensive necrotization of tumor mass at the histological level.

**Poděkování:**

Ráda bych touto cestou poděkovala především mému školiteli RNDr. Janu Ženkovi, CSc. za jeho odborné vedení a za nesmírné úsilí, s jakým se snaží léčbě rakoviny přijít na kloub. Dále bych chtěla vyjádřit své díky i MUDr. Kataríně Lukáčové za odbornou pomoc během vyhodnocování histologické studie. Děkuji také laboratoři doc. Ing. Martinovi Kváče, Ph.D. za umožnění práce v jejich laboratorních prostorách a jeho týmu za cenné praktické rady. Ze srdce děkuji také své rodině za plnou podporu, bez níž by tato práce nemohla vzniknout.

## Obsah:

1. Úvod .....	1
2. Melanom .....	2
2.1. Původ melanomu, fyziologie melanocytu a zbarvení kůže .....	2
2.2. Fotoprotekce melaninu.....	3
2.3. Melanin a karcinogeneze .....	4
2.4. Maligní zvrát z nevu na melanom vs. vznik de novo .....	5
2.5. Rizikové faktory pro vznik melanomu .....	6
2.6. Epidemiologie melanomu .....	6
2.7. Histologie a fyziologie kůže.....	7
2.8. Histologie melanomu .....	15
2.9. Klasifikace melanomů .....	23
2.10. Prognostické faktory melanomu .....	23
2.11. Melanom B16-F10.....	24
3. Vrozená imunita .....	25
3.1. Toll-like receptory (TLRs).....	25
3.2. TLR rodina .....	26
3.3. Vedení signálu po aktivaci TLR- TLR signalizace .....	27
3.4. TLR-cílená terapeutika .....	29
3.5. Ligandy Toll-like receptorů .....	29
3.5.1. Ligandy TLR1/ TLR2/ TLR6 .....	29
3.5.2. Ligandy TLR3 .....	30
3.5.3. Ligandy TLR4 .....	30
3.5.4. Ligandy TLR5 .....	31
3.5.5. Ligandy TLR7/8 .....	31
3.5.6. Ligandy TLR9 .....	31
3.5.7. Ligandy TLR11/ TLR12 .....	32
3.5.8. Ligandy TLR13 .....	33
3.5.9. Multi-PRRs ligandy .....	33
3.5.10. Multi-TLR agonisté-potenciál pro terapeutické účely .....	34

4. Testované chemikálie .....	36
4.1. Lipopolysacharid .....	36
4.2. Laminarin .....	39
4.3. Mannan.....	40
4.4. N-formyl methioninové motivy.....	41
5. Cíle práce .....	43
6. Materiál and metodika .....	43
6.1. Chemikálie .....	43
6.2. Příprava roztoků používaných při terapii.....	44
6.2.1. Příprava 0,2mM roztoku laminarinu-BAM v PBS.....	44
6.2.2. Příprava 0,2mM roztoku laminarinu-BAM obsahujícího LPS .....	44
6.2.3. Příprava 0,2mM roztoku mannanu-BAM v PBS.....	44
6.2.4. Příprava 0,2mM roztoku mannanu-BAM obsahujícího LPS .....	45
6.2.5. Příprava 0,5mM roztoku f-MLFKK-BAM v PBS.....	45
6.2.6. Příprava 0,5mM roztoku f-MLFKK-BAM obsahujícího LPS .....	45
6.2.7. Příprava roztoku lipopolysacharidu (LPS).....	45
6.3. Laboratorní myši.....	45
6.4. Kultivace buněčné linie buněk melanomu B16-F10 .....	46
6.5. Transplantace buněk melanomu B16-F10 .....	46
6.6. Měření objemu nádorů.....	46
6.7. Měření teploty nádorů.....	46
6.8. Vyhodnocení dat.....	47
6.9. Histologická studie .....	47
6.9.1. Pitva, fixace vzorku, odvodnění a prosycení parafínem .....	47
6.9.2. Příprava bločků a krájení, odparafínování, barvení, odvodnění, montování histologických řezů.....	48
6.9.3. Pozorování řezů pod mikroskopem, fotodokumentace, histologická analýza .....	48
6.10. In vivo experimenty a jejich histologická analýza .....	49
6.10.1. Histologická analýza jednorázové a vícenásobné intratumorální aplikace LPS .....	49
6.10.2. Histologická analýza vlivu roztoku laminarinu-BAM, f-MLFKK-BAM, mannanu-BAM, lipopolysacharidu a kombinace těchto látek na melanomové nádory .....	50

7. Výsledky .....	51
7.1. Histologická analýza jednorázové a vícenásobné aplikace LPS .....	51
7. 2. Histologická analýza vlivu roztoku laminarinu-BAM, f-MLFKK-BAM, mannanu-BAM, lipopolysacharidu a kombinace těchto látek .....	55
8. Diskuze .....	62
9. Závěr .....	64
10. Seznam použité literatury.....	65
11. Příloha .....	76

## 1. Úvod.

Rakovina je jedním z nejnebezpečnějších lidských onemocnění se stále vzrůstající incidencí. V roce 2010 bylo do Národního onkologického registru České Republiky (NOR) nově nahlášeno celkem 82 606 případů zhoubných novotvarů a novotvarů in situ, z toho 42 933 případů u mužů a 39 673 případů u žen. Počet nově zjištěných nádorů v absolutním počtu vzrostl oproti roku 2009 u mužů i u žen přibližně o 4%. Také přepočtem na věkový standard incidence meziročně vzrostla u mužů (o 2%) i u žen (o 3%).<sup>1</sup>

Přestože incidence zjištěných novotvarů (i z důvodu celoplošných onkologických screeningů) stále stoupá, léčba rakoviny není stále tak úspěšná, jak by bylo třeba. Klasické chirurgické odstranění primárního tumoru a přiléhající uzliny a následná radioterapie a chemoterapie cytostatiky, kdy tato léčba sice stále poskytuje na základě rozdílných časů dělení rakovinné a zdravé buňky určité výsledky, se nedá ale považovat za uspokojivou léčbu. V současné době jsou na vzestupu moderní typy léčby jako je hormonální léčba, biologická léčba a imunoterapie. Důležitou roli má také podpůrná terapie.

Jednou z možností imunoterapie je stimulace vrozené imunity pomocí molekul vyskytujících se na patogenech, tzv. Pathogen associated molecular patterns (PAMPs). Tímto směrem se ubírala i tato práce.

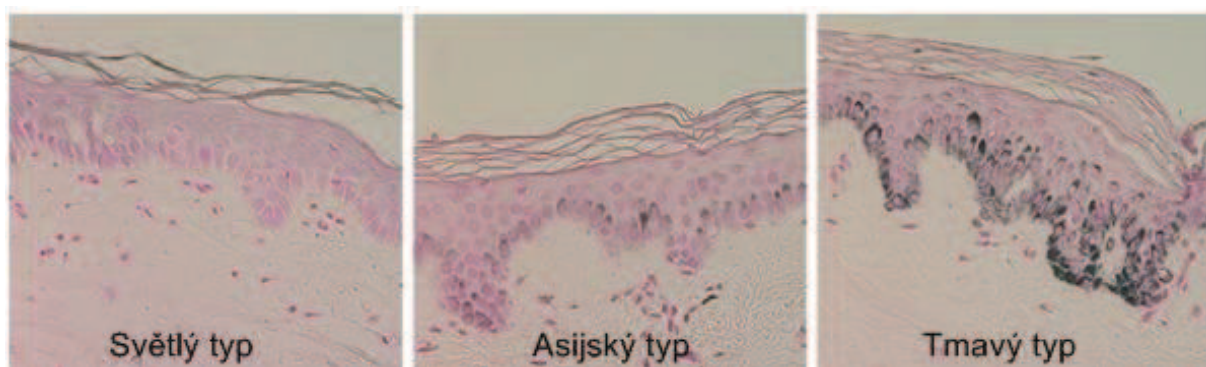


## 2. Melanom.

### 2.1. Původ melanomu, fyziologie melanocyty a zbarvení kůže.

Maligní melanom je jednou z nejagresivnějších lidských malignit a je zodpovědný za téměř 60% letálních případů rakoviny kůže.<sup>2</sup> Jde o zhoubný nádor vzniklý z nezralých pigmentových buněk (melanoblastů). Tyto buňky pocházejí z neuroektodermy, proto se melanomy mohou vyskytnout nejenom v kůži ale i například v oční tkáni, sliznici úst nebo genitálu. Z melanoblastů vznikají během vývoje jedince zralé melanocyty. U obratlovců jsou melanocyty zodpovědné za zbarvení kůže, vlasů a chlupů a za distribuci černohnědého barviva melaninu do okolních keranocytů.<sup>3</sup> Předpokládá se, že každý jednotlivý melanocyt je v kontaktu s více jak 30 keranocytů.<sup>4</sup>

Typ melaninu syntetizovaného melanocyty je u savců regulován geneticky, biochemicky i vnějšími podmínkami.<sup>5</sup> Odlišnosti v pigmentaci kůže nejsou výsledkem rozdílného množství melanocytů v pokožce, jak by se dalo předpokládat, ale v odlišné melanogenní aktivitě a následně typu produkovaného melaninu (Obr. 1). Eumelanin je produkován a ukládán v eliptických melanosomech, oproti tomu pheomelanin je vytvářen v menších okrouhlých melanosomech. Buňky melanosomů u černochů mají mnohem delší osy než melanosomy u bělochů (800 nm versus 400 nm). Existují také spíše jako jednotlivé subjekty, zatímco u světlých typů mají sklony tvořit clustery a fungovat jako komplex.<sup>6</sup>



Obr. 1: Tvorba melaninu u rozdílných typů pleti.<sup>7</sup>

Barveno hematoxylin-eozinem. Množství melanocytů je podobné, jednotlivé typy pleti se od sebe liší na histologické úrovni zejména množstvím vyprodukovaného tmavého barviva melaninu.

## 2.2. Fotoprotekce melaninu.

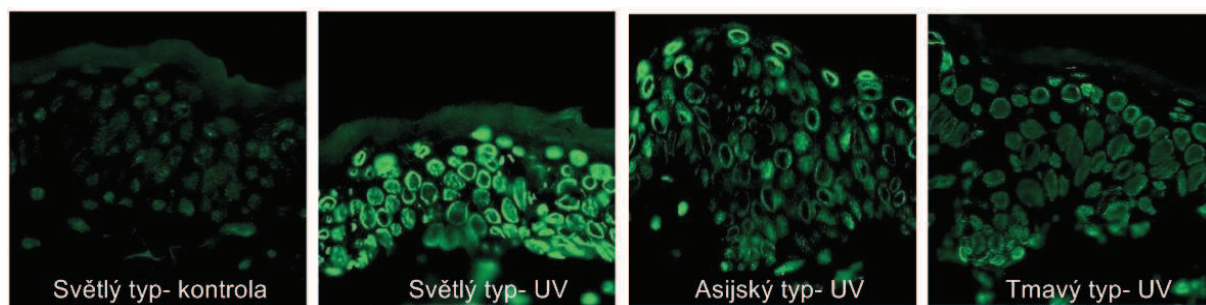
Typ syntetizovaného melaninu neovlivňuje jen vzhled a zabarvení kůže, ale zejména melaninem zprostředkovanou ochranu proti škodlivému spektru slunečního záření.<sup>5</sup> Podle epidemiologických dat lze předpokládat, že mezi pigmentací kůže a incidencí sluncem způsobených rakovin kůže existuje inverzivní korelace<sup>8</sup>, běloši mají až 70 krát vyšší pravděpodobnost získat touto formou rakovinu kůže než jaká je u černochů<sup>9</sup>.

Ochráného efektu melaninu, obzvláště eumelaninu, je dosaženo jeho schopností sloužit jako bariéra rozptylující UV záření a také jako absorpční filtr redukující penetraci UV skrz epidermis.<sup>10</sup> Tmavá pleť, která obsahuje více eumelaninu než světlá kůže, je lépe chráněna proti poškození buněk UV zářením a tedy eumelanin má vyšší fotoprotektivní účinky než pheomelanin. Melanin je u černochů navíc dvakrát účinnější ve srovnání s bělochy v zamezení proniknutí UV-B záření.<sup>9,11</sup> Melanosomy u tmavé pleti jsou resistantní k degradaci lysosomálními enzymy, zůstávají tedy nedotčeny a tvoří supranukleární kapsule v keratinocytech a melanocytech, což významně přispívá k fotoprotekci proti UV zářením indukovanému poškození buněk.<sup>12,13</sup> Oproti tomu v lehce pigmentované kůži jsou melanosomy degradovány a zůstává po nich „melaninový prach“ v superbasálních vrstvách. Tato redukce melanosomů ve vyšší vrstvě epidermis je považována za velice důležitý faktor karcinogeneze, proto je důležité najít kompromis mezi fotoprotekcí kůže a karcinogenezí. Další důležitou vlastností eumelaninu je jeho funkce jako zachytávače „scavengera“ volných radikálů.<sup>14</sup>

De Winter<sup>15</sup> zkoumal, jestli opakované vystavení UV záření vede k fotoprotekci. Jeho studie shrnuje, že vystavení repetitivnímu UV záření zvyšuje pigmentaci a tloušťku kůže a snižuje jeho náchylnost k erythemu o 75%. Podle Brennera<sup>7</sup> fotoprotekce melaninem nezávisí pouze na jeho množství, ale také na jeho distribuci v kůži. Provedl klinické studie s více jak 90 osobami odlišných etnických původů (7 etnik) vystavil je záření 1 MED (minimální erytémové dávce UV záření [ $J/cm^2$ ], která vyvolá do 24h zarudnutí u určitého typu kůže v závislosti na fototypu), poté provedl analýzu biopsií kůže. Tyto analýzy po ozáření ukazovaly, že DNA poškození bylo významně větší u světlejších (více UV senzitivních) typů kůže a významně nižší u tmavších (více UV resistentních) typů, jak je ukázáno na Obr. 2 a to i přesto, že osoby s tmavší pletí přijaly přinejmenším 3 až 4 krát větší množství UV záření. Ve

všech typech kůže se ukázalo poškození DNA vyšší v horních vrstvách epidermis, oproti tomu nižší vrstvy kůže byly chráněny oblastmi kůže obsahujícími melanin.<sup>7</sup>

Ukázalo se také, že UV záření neindukuje jen méně DNA poškození u tmavší pleti, ale také vyšší množství tvorby apoptotických buněk. To naznačuje, že tmavší pleť je také více účinná v odstraňování poškozených buněk. Tato kombinace velice redukuje karcinogenní risk.<sup>7, 16, 17</sup>



Obr. 2: Rekce kůže po UV ozáření v rámci rozdílných barevných typů kůže.<sup>7</sup>

Kůže byla ozářena UV zářením v dávce 1 MED, které vyvolalo zlomy v DNA a tvorbu cyklobutano-pyrimidinových dimerů -CPD (jedny z nejzávažnějších karcinogenních produktů vzniklých po ozáření kůže). CPD byly detekovány fluorescenční technikou s použitím FITC-značených protilátek. Významně vyšší hladina CPD byla detekována u světlých typů kůže ve srovnání s asijským nebo tmavým typem.

### 2.3. Melanin a karcinogeneze.

Melanin je všeobecně považován za látku chránící proti UV zářením indukovanému poškození buněk. Nicméně melanin může mít i toxické vlastnosti, obzvláště po vystavení UV záření.<sup>18</sup> V Korytowskiho in vitro pokusech<sup>19</sup> se ukázalo, že melanin je schopný reagovat s DNA a vytvářet ROS (reaktivní kyslíkové radikály) po UVA ozáření. ROS poté může způsobovat jednořetězcové zlomy v DNA buněk kůže.<sup>19, 20</sup>

Pheomelanin má oproti eumelaninu sklony k fotodegradaci a přispívá k poškození po UV záření tím, že může generovat peroxid vodíku a superoxidové anionty.<sup>21, 22, 23</sup> Navíc je pheomelanin spojen s vyšším množstvím apoptotických buněk vzniklých v reakci na UV záření.<sup>24</sup> Pheomelanin také zvyšuje uvolňování histaminu, který přispívá k vytvoření erythemu a edemu po vystavení slunci u osob se světlou pletí.<sup>25</sup> Během in vivo studií na myších se ukázalo, že melanin a obzvláště pheomelanin je UVA a UVB senzitizer, který způsobuje buněčnou smrt.<sup>26</sup> Streutker přišel na to, že albinózní jedinci s deficitem tyrosinázy v melanocytech (které tedy nemohou produkovat melanin) mají větší sklon k rakovině kůže nemelanomového typu a zároveň mají nižší incidenci maligního melanomu.<sup>27</sup> Proto je možné, že pheomelanin má slabé karcinogenní účinky přispívající k tvorbě melanomu.<sup>7</sup>

Celkově můžeme konstatovat, že lidská kůže si vyvinula dva hlavní mechanismy obrany proti poškozujícím vlivům UV záření: zesílení kůže a stimulace syntézy melaninu. Schopnost přizpůsobit obsah melaninu obsaženého v buňkách epidermis po vystavení UV záření je založena na individuálním melanogéním potenciálu, který má souvislost s trvalým zbarvením kůže.<sup>7</sup>

#### **2.4. Maligní zvrát z nevu na melanom vs. vznik de novo.**

Klinické a histologické studie naznačují, že melanom se může vyvinout z pigmentového névu (mateřského znaménka). V těchto datech pacientů se procento melanomů vzniklých z již dříve existujícího névu pohybuje mezi 18% až 85%.<sup>28</sup> Bylo prokázáno nejenom zvětšení névu, ale také například přítomnost barevných změn oproti předchozímu ložisku.<sup>29</sup> Tyto barevné změny neprobíhají rovnoměrně přes celé mateřské znaménko, ale místy se objevují aktivnější světlejší projasněná místa a regresivní namodralé až zarudlé oblasti.<sup>30</sup> Za další znaky maligního zvrátu jsou považovány jasně neohrazené okraje, bolestivost névu a jeho krvácivost.

Přestože procentuálně mají melanomy spojitost s nevy, většina studií demonstruje, že více jak polovina melanomů se objevuje de novo. Aktuální riziko, že se jakýkoliv nevus transformuje na melanom, bylo odhadnuto na velice nízké.<sup>31</sup> Toto bylo potvrzeno i v rozsáhlých studiích roku 2003 (841 mužů a 739 žen ve věkovém rozpětí od 11-95 let; rozměry tumoru 0.05-17,4 mm), kdy jen 26.2% melanomů bylo histologicky prokazatelně asociováno s nevy. Z tohoto množství bylo 43.0% spojeno s dysplastickými nevy a 57.0% s dalšími typy névů.<sup>31</sup> Podrobné vysvětlení jednotlivých typů melanomu následuje v kapitole 2.8. Histologie melanomu.

Současná literatura tedy považuje maligní zvrát névu spíše za minoritní (s nejvyšší pravděpodobností vzniku u dysplastického pigmentového névu) a ukazuje, že většina melanomů vzniká de novo z původně zdravé tkáně.

Odhaduje se, že 2-8% populace má na těle tento dysplastický nevus. Proto je třeba věnovat více pozornosti tomuto typu névu jako prekurzoru a rizikovému faktoru pro maligní zvrát v melanom.<sup>29</sup> Tito pacienti tvoří geneticky i fenotypicky heterogenní skupinu se současným rizikem melanomu závislým na faktorech jako je množství dysplastických névů na těle a jestli se dysplastický nevus nebo melanom objevil již dříve v rodinné anamnéze pacienta.<sup>32,33</sup> Nejenom přítomnost dysplastického névu, ale také zvýšený počet běžných získaných znamének, je spojen se zvýšeným rizikem pro vznik melanomu.<sup>29, 34</sup>

## **2.5. Rizikové faktory pro vznik melanomu.**

Existuje komplex interakcí exogenních faktorů prostředí a endogenních faktorů, které ovlivňují vznik melanomu. Většina případů (více jak 65%) je spojena se škodlivým UV zářením. Především jde o krátkodobé intenzivní slunění až spálení kůže. Dalšími rizikovými faktory je bledá pleť, blond nebo rezaté vlasy, množství pih a sklon se spálit a hůř se opalovat (phototyp 1-3).<sup>1, 35, 36</sup> Dále k těmto faktorům patří i dřívější diagnostika melanomu u jedince nebo v rodině, větší množství mateřských znamének, nález dysplastických névů nebo névů větších jak 6 mm.<sup>29, 32, 33, 34</sup> Dále jde také o jedince s porušenou obranyschopností, například po transplantacích u autoimunitních nemocí, kdy tito pacienti absolvují dlouhodobou léčbu immunosupresivy. Mezi další faktory všeobecně u rakovin kůže se také řadí mužské pohlaví a vyšší věk jedince.<sup>1, 37</sup>

## **2.6. Epidemiologie melanomu.**

Jak již bylo psáno výše, melanomem a jinými typy rakoviny kůže trpí zejména populace se světlejším typem pleti, tedy zejména evropské státy.

V České Republice bylo v roce 2010 diagnostikováno 22 642 „melanomů a jiných zhoubných nádorů kůže“ (dg. 43 a 44), kdy incidence u mužů byla 228,7 mužů s nálezem / 100 000 mužů a incidence žen 202,4 žen s nálezem / 100 000 žen. Z tohoto množství bylo 2 058 nálezů klasifikováno jako „zhoubný melanom kůže“ (dg. 43). Incidence „zhoubného melanomu kůže“ vzrostla mezi léty 1970- 2010 v ČR (Tab. I) u mužů o 6,8% a u žen o 6,2%.<sup>1</sup>

Tab. I: Vývoj incidence novotvarů v letech 1970-2010 (Data převzata z Novotvarů 2010 Národního onkologického registru ČR).<sup>1</sup>

Rok	Diagnóza C43-Zhoubný melanom kůže		Diagnóza C44-Jiné zhoubné nádory kůže	
	Ženy	Muži	Ženy	Muži
1970	165	151	1884	1784
1975	279	249	2610	2492
1980	281	284	2731	2709
1985	324	306	3172	3240
1990	422	412	3294	3491
1995	695	573	4990	5132
2000	724	734	5965	6183
2001	732	756	6382	6456
2002	819	770	6704	7286
2003	855	863	7154	7460
2004	811	849	7355	7827
2005	946	916	8003	8692
2006	835	934	7930	8680
2007	1041	1003	9043	9734
2008	887	1020	8997	9525
2009	977	1127	9153	10029
2010	1028	1030	9811	10773

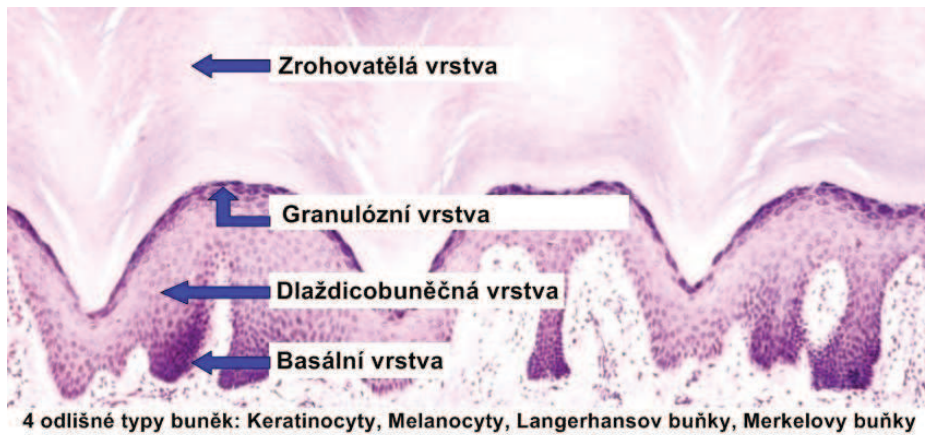
V Evropě se Česká Republika v roce 2012 zařadila v odhadované incidenci melanomu u mužů na 8. místo hned za Švýcarskem, Norskem, Švédskem, Holandskem, Dánskem, Slovinskem, Finskem. Incidence je asi o třetinu vyšší než průměrná incidence v EU.<sup>38</sup>

## 2.7. Histologie a fyziologie kůže.

Znalosti a porozumění histologii a funkcím zdravé kůže jsou důležité pro další podrobnější studium dermatopatologie, kam v našem případě melanom spadá. Kůže je složena z buněk s rozličnými funkcemi zahrnujícími mechanickou ochranu, fotoprotekci, výživu, metabolismus a regeneraci. Kůže je rozdělena do dvou zřetelně oddělených ale funkčně spolupracujících vrstev (epidermis and dermis).

**Epidermis** je složená primárně z keratinocytů (>90%) s minoritní populací Langerhansových buněk, melanocytů a neurodermálních tělísek (Merkelových buněk). Architektonicky je epidermis pod povrchem bohatá na buňky s invaginací směrem dolů označovanou rete-ridges

a interdigitální mesenchymové buňky tzv. dermální papily. Epidermis je oddělena od dermis strukturálně i chemicky složitou basální membránou.<sup>39</sup> Jednotlivé vrstvy epidermis jsou podrobně popsány v následujícím odstavci a pro názornost jsou zobrazeny na Obr. 3.

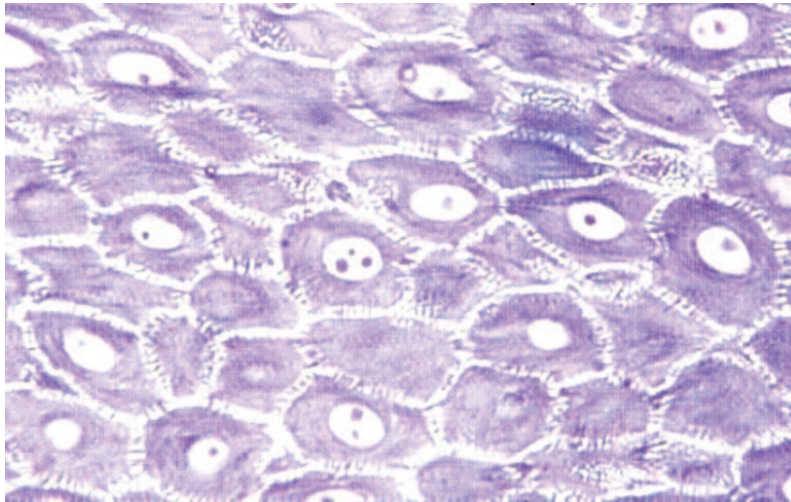


Obr. 3: Histologický řez epidermis a její rozvrstvení. <sup>40</sup> Barveno hematoxylin-eozinem (HE).

**Keratinocyty**, základní buňky epidermis, obsahují mezibuněčné mosty a dostatečné množství cytoplazmy. Jsou uspořádány do 4 vrstev: basální vrstva (stratum basalis), dlaždicová buněčná vrstva (stratum spinosum), granulózní vrstva (stratum granulosum) a zrohovatělá vrstva (stratum corneum). Termín stratum malphigii je používán na nižší 3 vrstvy, které obsahují bazální, dlaždicové a granulární buňky a tvoří jaderně životaschopnou epidermis.

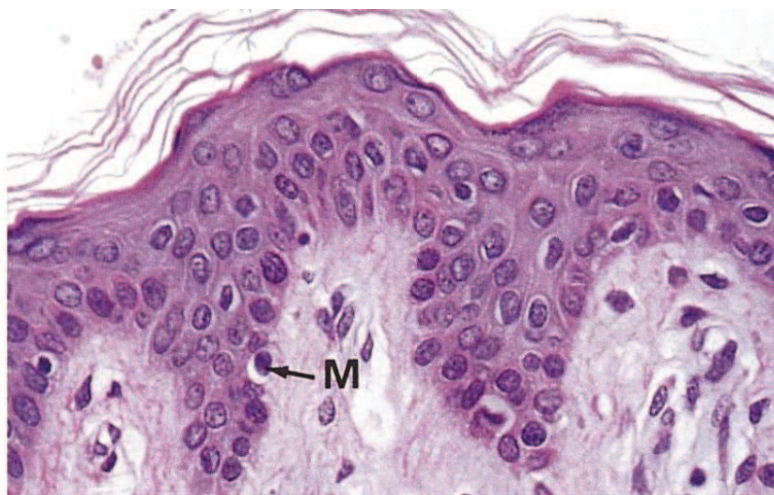
Bazální buňky (stratum basalis) tvoří jednu sloupcovitou vrstvu, která leží podél dlouhé osy kolmé k dělicí linii mezi epidermis a dermis. Často obsahují pigment melanin z přilehlých melanocytů. Rozsah a distribuce tohoto pigmentu odpovídá barvě kůže. Bazální buňky jsou navzájem propojeny jedna s druhou a nad nimi ležícími dlaždicovými buňkami pomocí mezibuněčných můstků (desmosomů viz. Obr. 4).<sup>39</sup>

Buňky dlaždicové vrstvy (stratum spinosum) jsou obvykle 5-10 vrstev široké. Tyto buňky jsou odděleny mezerami, které jsou předěleny desmozomy. Směrem k povrchu se stávají více zploštělé. Buňky granulózní vrstvy (stratum granulosum) jsou zploštělé a jejich cytoplazma je vyplněna keratohyaluronickými granulemi, které jsou silně bazofilní a nepravidelné co do velikosti i tvaru. Šířka granulózní vrstvy v normální kůži je všeobecně úměrná šířce rohové vrstvy (stratum corneum). Buňky normálního stratum corneum jsou bezjaderné, tedy prakticky mrtvé.<sup>39</sup>



Obr. 4: Desmozomy v dlaždicobuněčné vrstvě.<sup>40</sup> Barveno toluidine blue metodou.

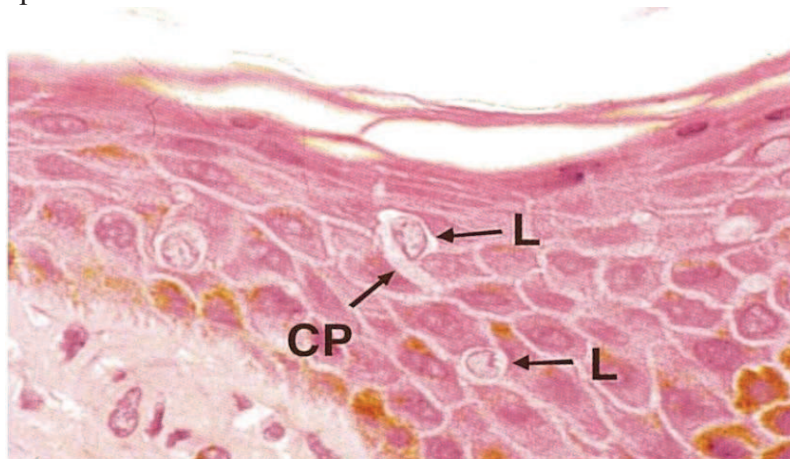
**Melanocyty** – jsou buňky jasné (vlastně jde o artefakt fixace - cytoplazma se smršťuje a soustředí se kolem jádra a tím vytváří prostor). Melanocyty vytváří pigment melanin. Melanocyty vypadají jako malé buňky. Obvykle se nachází v blízkosti bazální vrstvy. Dochází v nich k drobným cytoplazmatickým procesům, kdy dochází k přenosu melanosomů (obsahujících granule melaninu) ze sousedících keratinocytů do dalších přilehlých keratinocytů. Z tohoto důvodu většinu pigmentu v buňkách najdeme spíše v keratinocytech než v melanocytech. Melanocyty jsou odvozeny z neuroektodermální lišty a přesouvají se během vývoje do svého konečného umístění v epidermis. Tento sklon k cestování se může podílet na potenciálu melanomů metastazovat. Jednotlivý melanocyt je připojen k asi 36 keratinocytům, tento útvar se nazývá "epidermální melaninová jednotka".<sup>39</sup>



Obr. 5: Melanocyty v kůži.<sup>40</sup>  
Barveno hematoxylin-eozinem. (M) melanocyt.



**Langerhansovy buňky** (Obr. 6) jsou pojmenovány po Paul Langerhansovi a jsou umístěny těsně nad středem páteřní zóny epidermis. Jde o antigen prezentující dendritické buňky, které se podílí na imunitním dohledu. Z důvodu lepší prezentace antigenů se Langerhansovy buňky pohybují mezi keratinocyty. Aby k těmto pohybům mohlo dojít, musí v těchto buňkách probíhat rozsáhlé cytoplasmatické procesy. Langerhansovy buňky jsou menší než keratinocyty, ale obsahují relativně velkou cytoplazmu. Obvykle se nacházejí uvnitř vrstvy spinosum basale.<sup>39</sup>



Obr. 6: Langerhansovy buňky.<sup>40</sup>  
Barveno hematoxylin-eozinem. (L) Langerhansovy buňky, (CP) cytoplasmatické výběžky.

**Merkelovy buňky** jsou pojmenovány po Friedrichovi Merkelovi. Jde o unikátní malé buňky na bázi epidermální rete-ridges spojené s nervovými zakončeními v epidermis. Jejich funkcí je hmatový vjem.<sup>39</sup>

Druhá vrstva kůže se nazývá **dermis**. Skládá se z husté vláknité pojivové tkáně, jejíž převážnou složkou tkáně je kolagen. Obsahuje především kolagen typu I a III. Tato struktura kolagenových vláken slouží jako základ pro vytvoření dvou vrstev dermis (papilární a retikulární vrstva).

Papilární vrstva dermis přiléhá k pokožce a skládá se z relativně malých, jemně strukturovaných kolagenových vláken. Tato vrstva je pojmenována po dermální papile (výstupku dermální pojivové tkáně na bázi epidermis).

Retikulární vrstva dermis leží pod papilární vrstvou a skládá se z větších a hruběji tvarovaných kolagenových vláken (jako síť).<sup>39</sup>

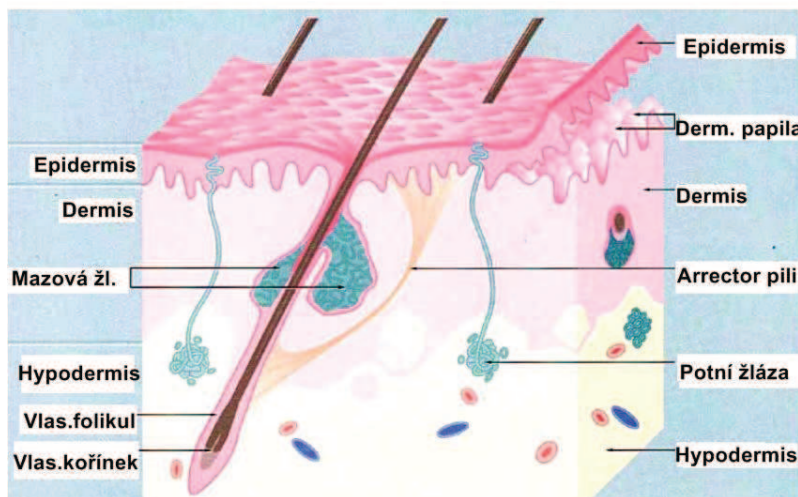
Pojivová tkáň dermis slouží, stejně jako běžné pojivové tkáně v celém těle, k několika různým funkcím. Tuhá kolagenní vlákna a pružná elastická vlákna zajišťují mechanickou pevnost pro

pleť. Báze dermis slouží jako podklad pro šíření živin a odpadních látek až do různých jiných tkáňových komponent. Žírné buňky, lymfocyty a makrofágy v pojivové tkáni mají důležitou funkci pro imunitní systém. Dermis spolu s přidruženými cévami a nervy je schopna aktivně reagovat na poškození, kdy výsledkem je obranná reakce zánětu, po níž následují hojivé procesy, růst a opravy.<sup>39</sup>

V dermis se nachází také elastická vlákna, podkožní tuk a epidermální žlázy, vlasové folikuly, nehty a volná nervová zakončení. Elastická vlákna syntetizovaná fibrocyty tvoří asi 30% suché hmotnosti dermis. **Podkožní tuk**, složený z adipocytů, tvoří primární mikrolobuly. Agregací primárních mikrolobulů (microlalůček) vznikají sekundární lobuly, obklopené prstencem buněk. Tomuto útvaru se říká septum trabeculae. Tepny a žíly v podkožním tuku jsou umístěny v hlavní vláknité (fibrózní) septě.<sup>39</sup>

### Specializované struktury kůže.

Kůže obsahuje, jak jsem uvedla výše, několik specializovaných struktur potní žlázy, mazové žlázy, vlasové folikuly, nehty a nervová zakončení. Na Obr. 7 vidíte tyto specializované struktury ve zjednodušeném schématu řezem kůže.<sup>39</sup>



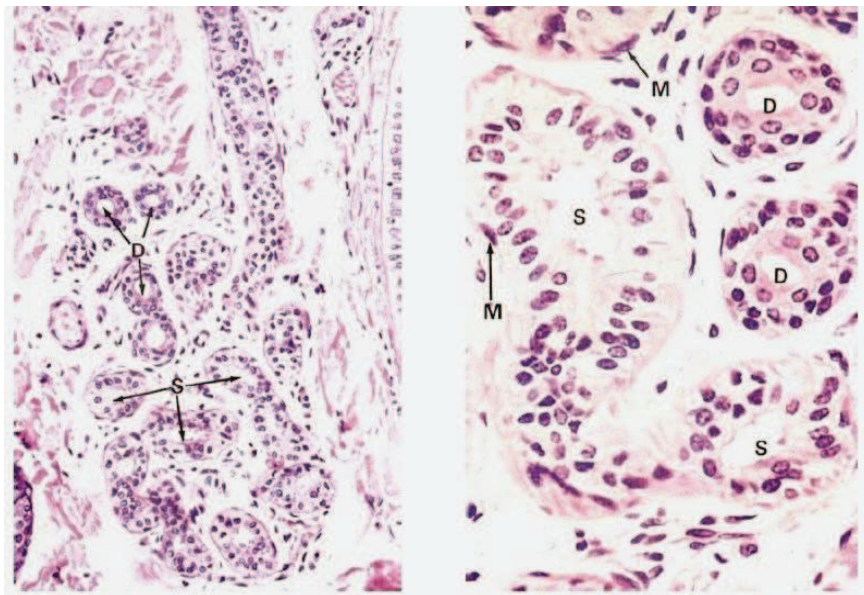
Obr. 7: Specializované struktury kůže.<sup>40</sup>

**Potní žlázy** jsou jednoduché tubulární žlázy. Sekreční část žlázy sahá hluboko do dermis, kde se tento tubus stočí do poměrně kompaktního klubíčka. Tento dukt komunikuje s vnějším prostředím díky překrývání dermis a epidermis. Sekreční část se skládá z velkých kuboidálních (krychlovitých) buněk. Podél nich se nachází vnořené svalové buňky. Po jejich

kontrakci dochází k vyloučení potu. Buňky tvořící dukt jsou obvykle dvoustvré stratifikované kuboidální epitelové buňky. Tyto buňky jsou zbarveny intenzivněji než ty obsahující sekreční částí ductu. Primární funkcí potních žláz je pocení, které v zásadě slouží k ochlazení těla odpařováním (termoregulaci). Z tohoto důvodu je množství potu regulováno v závislosti na tělesné teplotě.<sup>39</sup>

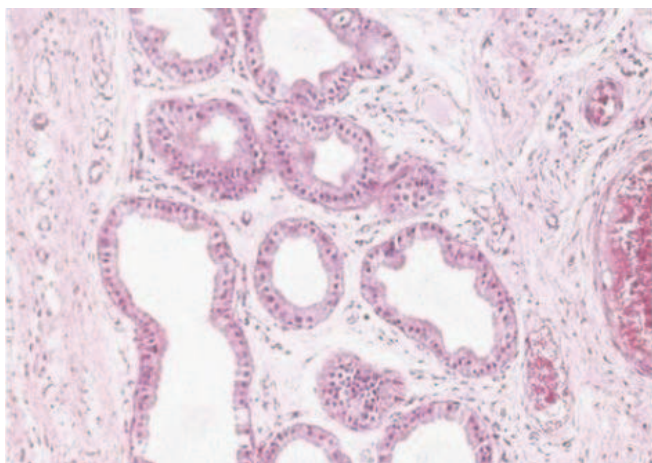
Potní žlázy mají vliv i na množství vody uvnitř buněk a na iontovou rovnováhu. Přestože pot obsahuje sůl, za normálních okolností pot, který vychází z povrchu kůže má nižší koncentraci soli než původní tekutina produkovaná sekrečními buňkami potní žlázy. Je to díky tomu, že se sůl vstřebává duktem. Účinnost této reabsorpce soli se řídí aldosteronem v reakci na tělesnou bilanci soli.

Existují dva druhy potních žláz, obyčejné ekrinní potní žlázy (na většině těla viz. Obr. 8) a velké apokrininní potní žlázy (v axilární, pubické a perianální oblasti viz. Obr. 9). Oba typy potních žláz mají stejný základní tvar, apokrininní žlázy mají ale vyšší buňky a větší průměr.<sup>39</sup>



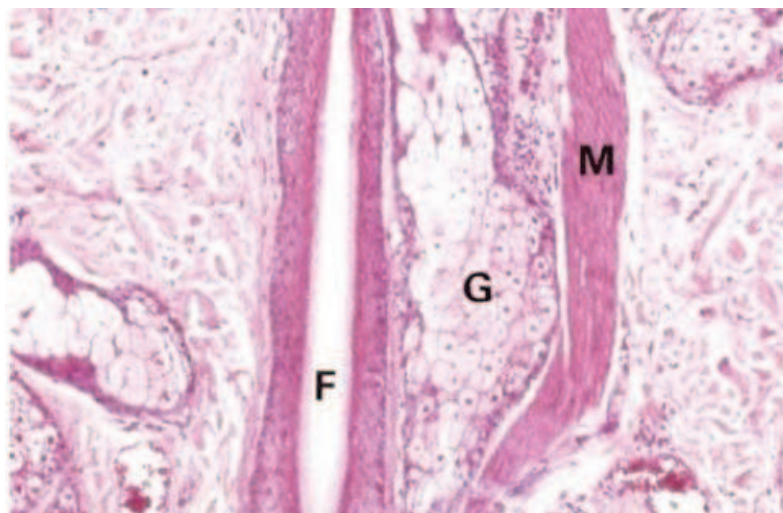
Obr. 8: Ekrinní potní žláza.<sup>40</sup>

Barveno hematoxylin-eozinem. (S) potní žláza, (D) ductus, (M) melanocyt.



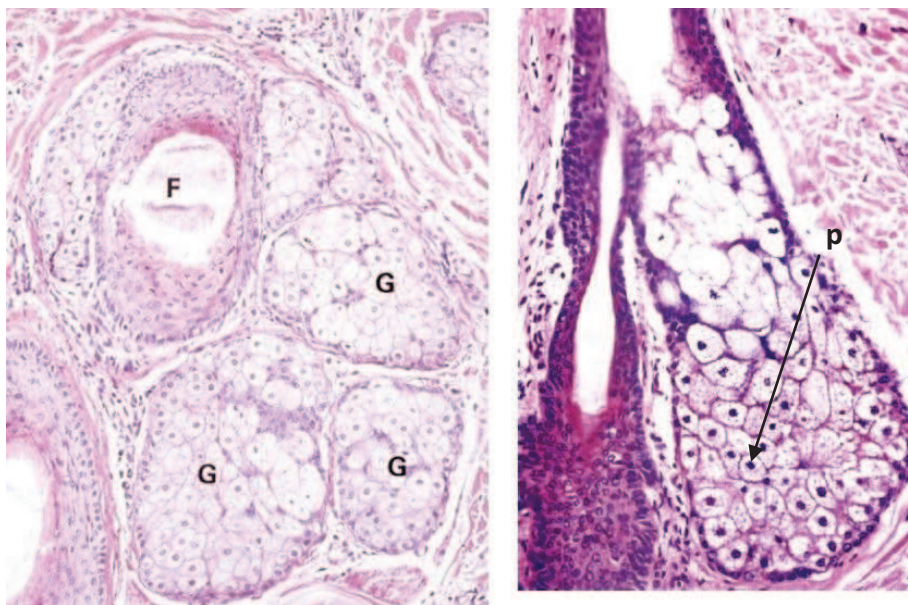
Obr. 9: Apokrinní potní žláza nacházející se u vlasového folikulu.<sup>40</sup>  
Barveno hematoxylin-eozinem.

**Vlasové folikuly** jsou tubulárně invaginované linie stratifikovaného dlaždicového epitelu podobného epidermis. U bazální části každého folikulu dochází k procesům buněčného dělení, růstu a zrání buněk, kdy se z nich v podkoží stává válcovitý sloupec mrtvých, zrohovatělých buněk (vlasu), které jsou postupně vytlačovány z folikulu. Vlasové folikuly jsou spojeny s mazovými žlázami, stejně jako s volnými nervovými zakončeními a hladkým svalstvem (pilosebaceózní aparát). Síť nervových zakončení rozpozná vychýlení vlasu a také řídí napřímení vlasu ("husí kůže"). Toto napřímení vlasu je ovlivněno malým svazkem hladkých svalových buněk, tzv. pili arrector, připojených k pojivové tkáni v plášti kolem každé mazové žlázy vlasu. Mazové žlázy sekretují tuk do okolí vlasu. Vlasový růst je poměrně komplexní, což má za následek značné rozličnosti ve fázích růstu vlasu (tj. fáze růstu, regrese, odpočinku).<sup>39</sup> Na Obr. 10 můžete vidět jednotlivé části vlasu a okolní struktury.



Obr. 10: Vlasový folikul.<sup>40</sup> Barveno hematoxylin-eozinem. (F) vlasový stvol, (G) mazová žláza, (M) arrector pili.

**Mazové žlázy** (Obr. 11) jsou spojeny s vlasovými folikuly. Histologicky jsou mazové žlázy zcela odlišné od všech ostatních žláz. Jsou holokrinní, což znamená, že během sekrece je vylučována celá buňka. Proces této holokrinní sekrece se podobá zrání keratinocytů. Buňky vzniklé mitózou u základu žlázy jsou vytlačovány nově vznikajícími buňkami směrem k povrchu. Po cestě se buňky plní lipidy a poté odumřou. Sekrece se tedy skládá z produktů rozpadlých buněk i z buněk samotných, které jsou posunuty do lumenu přidruženého vlasového folikulu. Takže v podstatě jsou mazové žlázy malé skupiny buněk epidermis, ve kterých se hromadí maz (směs lipidů). V umírajících buňkách mazových žláz můžeme pozorovat typický vzhled pyknotického jádra jako jednoho z rysů buněčné smrti.<sup>39</sup>



Obr. 11: Mazová žláza u vlasového folikulu.<sup>40</sup>  
(F) vlasový folikul, (G) mazová žláza, (p) pyknotické jádro.

### **Inervace kůže.**

Kůže je bohatě inervována. Senzorické nervové zakončení reagují na tlak, vibrace, teplo, chlad, svědění, bolest. Motorické nervové zakončení ovládající průtok krve, sekreci potu a vzpřímení vlasu. Jde o několik typů inervace: volná nervová zakončení, Merkelovy dotyková tělíska, Meissnerova tělíska, Paciniho tělíska, Ruffiniho nervová ukončení a receptory vlasového folikulu.<sup>39</sup>

**Volná nervová zakončení** končí v epidermis a pronikají téměř až do stratum corneum. **Merkelova dotyková tělíska** jsou nervová zakončení spojené s Merkelovými buňkami na bázi epidermis v lysé kůži dlaní a chodidel. **Meissnerova tělíska** jsou zapouzdřená nervová ukončení v dermální papile, nejčastěji v palmární a plantární kůži, obzvláště v konečcích

prstů. **Paciniho tělíska** se nachází hlouběji v dermis, jde o jednoduchá nervová zakončení, ale každé je obklopeno multilamelární oválnou strukturou připomínající cibulku. Paciniho tělíska reagují na tlak. **Ruffiniho nervová ukončení** mají četné jemné větvení vycházející z jednoho axonu s tenkou kapsulí naplněnou tekutinou. **Receptory vlasového folikulu** jsou nezapouzdřená nervová zakončení omotaná kolem vlasových folikulů.

Papilární vrstva dermis je bohatě zásobována **kapilárami**, větší cévy se mohou vyskytovat v hlubších vrstvách dermis. Pokožka nepotřebuje vysoce zásobit živinami ani kyslíkem, tato bohatá vaskulární síť slouží především k regulaci tělesné teploty. Regulace množství krve proudící povrchovými kapilárami umožňuje buď zachování nebo snížení teploty těla. **Arteriovenózní bypass**, řízený sdruženými svěrači, umožňuje přímý přesun krve z tepen do žil. K tomuto dochází v hlubších i povrchových vrstvách dermis.<sup>39</sup>

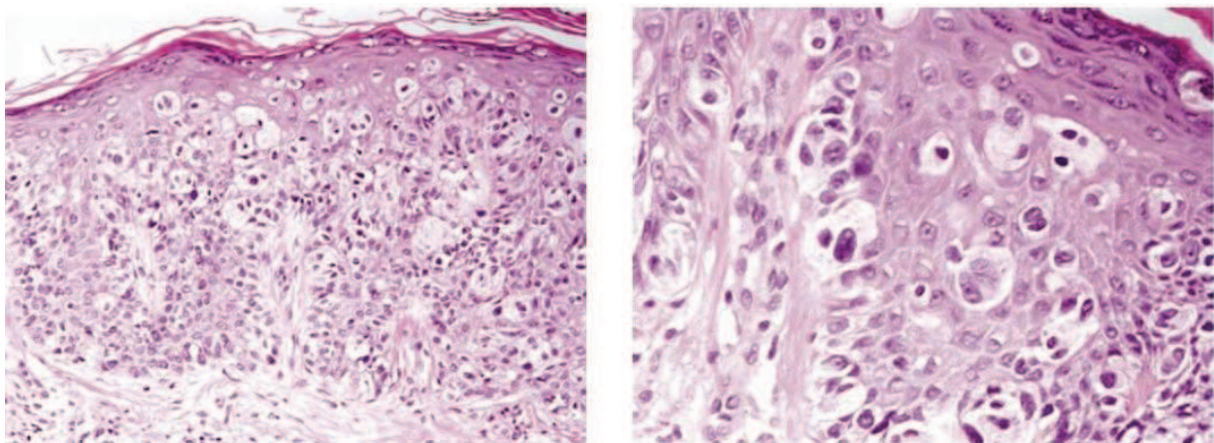
## 2.8. Histologie melanomu.

Histologicky rozlišujeme několik typů melanomu: *superficial spreading melanoma*, *nodular melanoma*, *lentigo maligna melanoma*, *acral lentiginous melanoma* a *mucosal lentiginous melanoma*. Nejčastěji se vyskytuje ***superficial spreading melanoma (SSMs)***- superficiálně rozšířený melanom (75% všech melanomů). Mezi epidermis u tohoto typu melanomu můžeme vidět změny ve struktuře jako je slabé ohraničení melanocytů, kdy jsou jednotlivé melanocyty neorganizovaně a abnormálně distribuovány, dále přítomnost melanocytů nad bazální vrstvou (tzv. Pagetoidní rozšíření/migrace) a dyskompaktní (ne pospolu držící) shluky melanocytů. Tento podtyp melanomu je charakterizován laterálním rozšířením maligních melanocytů mezi epidermis. Pro srovnání u benigního névu jsou velmi ostré laterální okraje.<sup>41</sup>

Epidermální melanocyty u tohoto typu melanomu jsou neorganizovaně distribuovány. Je také běžné, že jednotlivé buňky jsou navzájem přilehlé do shluků buněk v blízkosti ještě menších shluků podél rete ridges až dokonce v suprapapilární vrstvy. Benigní melanocytická proliferace je oproti tomu charakterizována pravidelně rozprostřenými shluky melanocytů omezených pouze na bázi ofrete ridges. Dalším znakem superficiálně rozšířeného melanomu je Pagetoidní migrace melanocytů, která má sklony rozšířit se do šířky léze, zatímco u benigního névu je tato migrace spíše ohnisková. Můžeme se také setkat s Pagetoidní migrací ve střední vrstvě epidermis ve vřetenovitých „spindle“ a epiteloidních buňkách névu na genitálu a kongenitální névech. Ve všech těchto případech jsou Pagetoidní buňky lokalizovány v centrální části léze.<sup>41</sup>

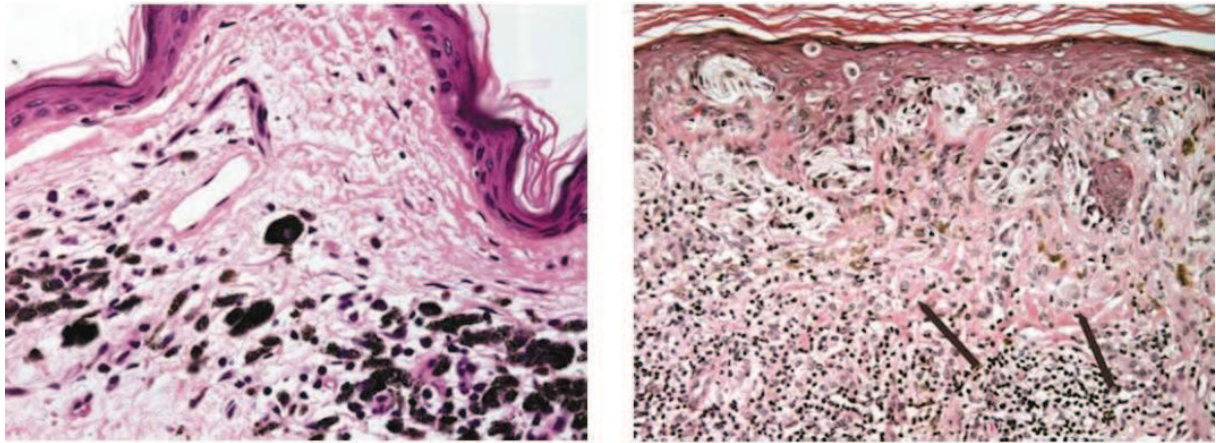
Intraepidermální melanomové buňky jsou často velké s bohatou eosinofilní cytoplasmou, vesikulárním jádrem a velmi objemným eosinofilním jadérkem (může být i multiplicitní). Buňky jsou pleomorfní a lze v nich najít mitózy. Méně časté maligní buňky mohou být i menší a významně hyperchromatické s malým množstvím cytoplasmy (small nevoid melanoma). Buňky kůže u tohoto typu melanomu nejsou vyzrálé, mají nízkou mitotickou aktivitu a nerovnoměrnou zánětlivou odpověď, příležitostně i s fibrózou s neovascularizací Obr. 12. Jakmile se buňky melanomu rozšíří do papilární dermis, zmenší se tak, že cytoplazma, jádro i jadérko nejsou tak dobře rozpoznatelné. Melanocyty při bázi běžného névu připomínají poněkud větší lymfocyty. V oblasti papilární dermis se vyskytují poměrně velké shluky melanocytů. Při průniku névu do nižších vrstev kůže se shluky melanocytů zmenší.<sup>41</sup>

Zánětlivá reakce může také sloužit jako podpůrná diagnóza melanomu. Asymetrický zánětlivý infiltrát často obklopuje invazivní melanomy, ale je neobvyklý u benigní melanocytické proliferace (Obr. 13). V infiltrátu se také vyskytují lymfocyty, které následně způsobují nekrózy buněk melanomu. Regrese je také často přítomna u mnoha invazivních melanomů. Je definována jako částečná odpověď hostitele na maligní neoplasma vyústějící v ložiskové zeslabení procesu. Histologicky jsou tyto změny podobné jako při tvorbě jizev a jako následek vzniká ložisková expanze papilární dermis. Vyskytuje se zde také zvýšení krevního zásobení.<sup>41</sup>

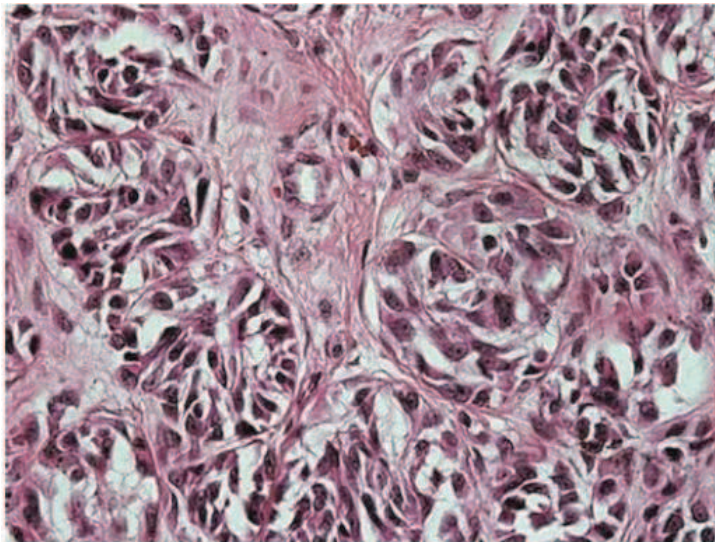


Obr. 12: Superficiálně rozšířený melanom.<sup>41</sup>

Barveno HE. Na obrázku vlevo- náhodně rozmístěné atypické melanocyty (jako samostatné buňky i v hnízdech) na všech úrovních epidermis. Na obrázku vpravo- hojně se vyskytující Pagetoidní buňky.



Obr. 13: Superficiálně rozšířený melanom-regrese, fibróza, infiltrace.<sup>41</sup>  
 Barveno HE. Nalevo- velice častá regrese charakterizována ztrátou intraepidermálních melanocytů, neovaskularizace, fibrózy a hustý infiltrát lymfocytů a melanofágů. Napravo- hostitelská imunitní odpověď.



Obr. 14: Superficiálně rozšířený melanom-výrazné jadérko.<sup>41</sup>  
 Barveno HE. I v nižších vrstvách epidermis je u melanocytů patrné vesikulární jádro a výrazné jadérko, což je znakem nedostatečné zralosti těchto buněk.

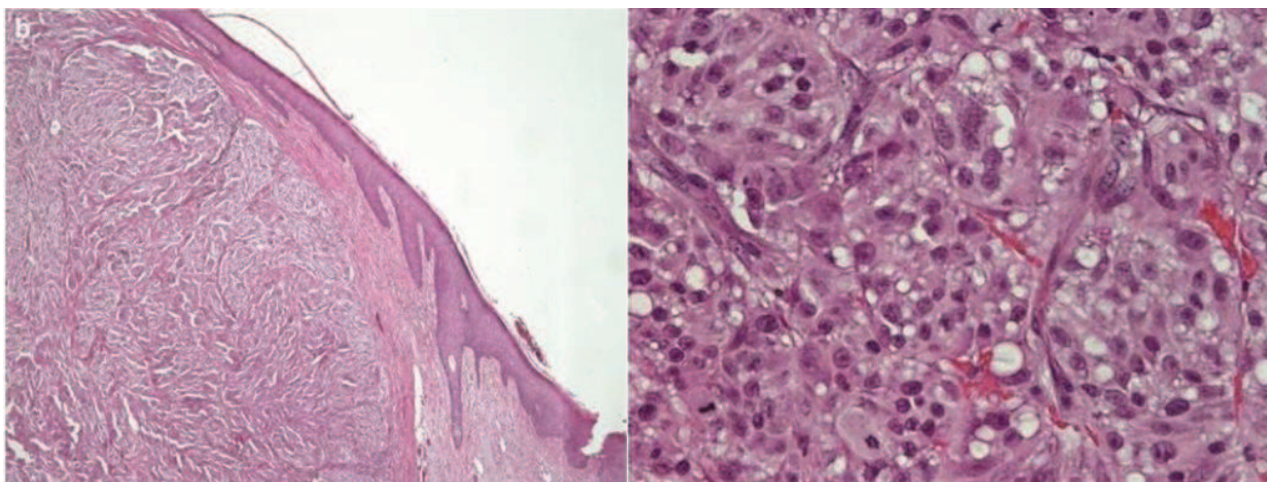
Dalším relativně běžným typem melanomu je **nodular melanoma**- nodulární melanom. Tento tumor se nejčastěji vyskytuje ve středním věku a nachází se spíše na trupu těla. Nodulární melanomy mají většinu společných rysů společných se superficiálně rozšířeným melanomem (SSMs), ale liší se v jednom významném rysu- nodulární melanom nevykazuje šíření v laterální oblasti.<sup>41</sup>

Ve skutečnosti je tento typ melanomu velice ostře ohraničen. Navíc se složky dermis nerozširují laterálně, spíše vzniká ostrá demarkační linie mezi epidermis paralelně



s rozšířením tumoru v dermis. To také koresponduje s klinickým vzhledem tohoto neoplazmatu a také s faktem, že tento typ melanomu má horší prognózu, ovšem srovnatelnou se superficialně rozšířeným melanomem o stejné hloubce invaze. Nicméně nodulární melanom nemá radiální růst jako SSMS- buňky pod invadující dermis vstupují okamžitě do vertikální růstové fáze, což koresponduje s rapidním růstem a rychlým metastázováním tohoto typu melanomu. U většiny nodulárních melanomů je tento agresivní růst směrem do spodních vrstev zřejmý z obrovských dermálních shluků a vrstev cytologicky atypických melanocytů. Nodulární melanomy jsou charakterizovány epiteloidními melanocyty s velkou cytoplazmou, vesikulárním jádrem a výraznými jadérky.

Pagetoidní buňky nejsou tak hojné jako u SSMS. Ulcerace (zvrhedovatění) je ale u tohoto melanomu běžná. Kožní složky nodulárního melanomu jsou histologicky nerozlišitelné od SSMS melanomu ve vertikální růstové fázi. Melanocyty jsou zvětšené s výrazným často velmi eosinofilním jádrem, které ale nemá žádné sklony pro maturaci. Mitotická aktivita se pohybuje od velmi vysoké až k velmi nízké. Velké vrstvy buněk nahrazují dermis se ztrátou formace shluků (hnízd). Často můžeme také vidět regresi. Je v celku běžné, že melanocyty vykazují mezi normálními dermálními buňkami rozličnou histologickou morfoloii: buňky spirálovitého tvaru, epiteloidní buňky a izolovaná populace balónových buněk (obsahují lipidem naplněnou cytoplasmu). Ve většině případů diagnostika tohoto typu melanomu není obtížná.<sup>41</sup>



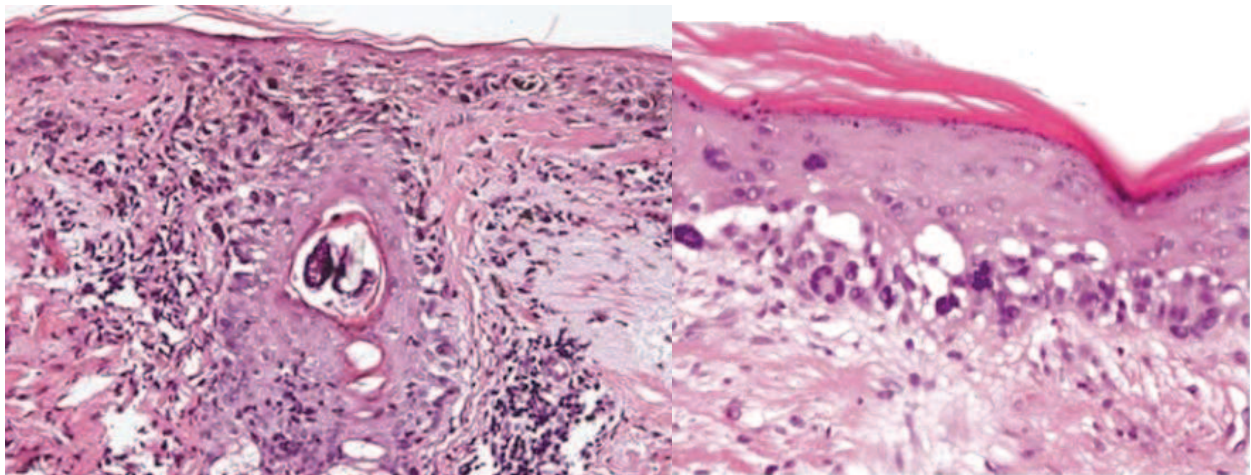
Obr. 15: Nodulární melanom.<sup>41</sup>

Barveno HE. Nalevo- ostrá ohraničení množících se melanocytů charakteristická pro tento typ melanomu, rozsáhlá proliferace atypických melanocytů v dermis. Napravo- významně atypické obvykle epiteloidní melanocyty, často nezralé s často pozorovatelnou mitotickou aktivitou.

*Lentigo maligna* a *lentigo maligna melanoma* reprezentují téměř výhradně melanomy situované na hlavě a krku u starších osob. Existuje několik rysů odlišujících tento typ od předešlých dvou: epidermis je atrofická (poškození sluncem), Pagetoidní rozšíření melanocytů je u tohoto typu neobvyklé a je k vidění spíše při progresi tohoto onemocnění společně s invazí do dermis. Častější jsou ale splývající melanocyty podél dermální epidermální junkce, často rozšiřující se hlouběji do epitelia dermis.

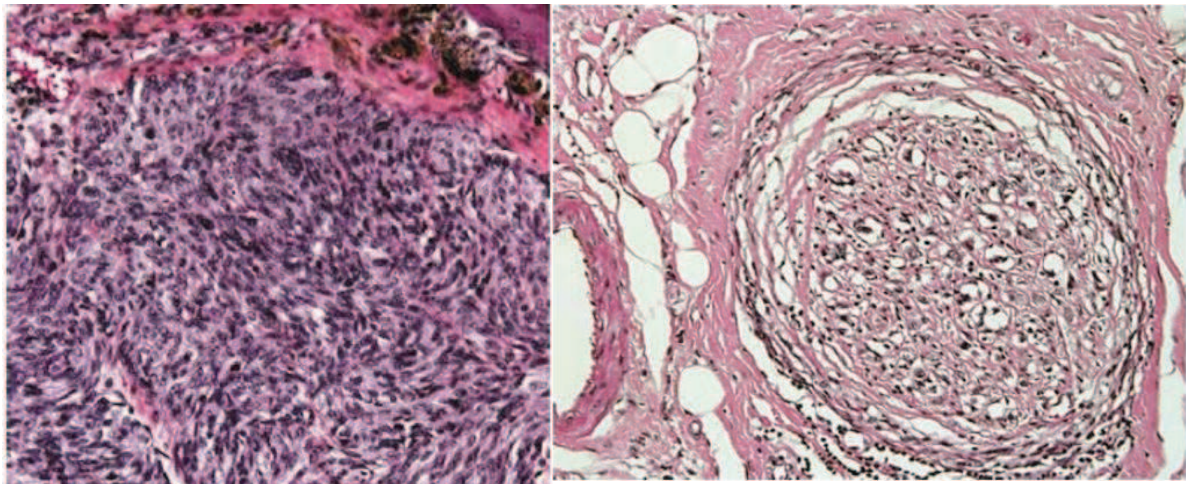
Buňky jsou běžně hyperchromatické a malé. Jaderný chromatin je hustý a jádérka nejsou tak často dobře rozpoznatelná viz. Obr. 16 nalevo. Často jsou ovšem přítomné vícejaderné buňky melanomu (zahrnující „starburst form“) viz Obr. 16 napravo. Rozlišení od „aktinické melanocytosy“ (zvyšující meziepidermální melanocyty sekundárně po slunečním ozáření) je velmi obtížné. Melanocyty mají sklony být hyperchromatické a lehce zvětšené a neliší se významně od jejich maligních kolegů. Hlavním rysem pro rozlišení je množství Pagetoidních migrace a rozšíření melanomu směrem dolů kožním lalokem.<sup>41</sup>

*Lentigo maligna melanoma* je melanom invadující do dermis. U tohoto subtypu melanomu je dermis bez výjimky charakterizována významnou sluneční elastózou. Často se zde nacházejí i rozvolněné cévy v oblasti superficiálního vaskulárního plexu. Atypické melanocyty jsou přítomny jako hnízda (shluky) a jednotlivé buňky v kůži. Kožní melanocyty jsou nejčastěji běžně zobrazeny ve větvenovitém tvaru. Buňky jsou hyperchromatické a nějakým způsobem atypické, často bez jádra a výrazného eosinofilního jádérka, které můžeme vidět u jiných typů melanomu, Obr. 17 nalevo. Stejně jako u jiných typů melanomu je mitotická aktivita často lehce prokazatelná. Větvenovitě tvarované melanocyty jsou u cév mezi retikulární dermis a je na nich také vidět perineurální invaze. V tomto případě takto výrazné cévy mají pro diagnostiku klíčovou roli, Obr. 17 napravo. Buňky melanomu mohou být nalezeny osamocené i při stromální proliferaci. Stroma kůže je mucinozní s rozličnými stupně buněčnosti (cellularity) nebo relativně sklerotické. V některých případech (desmoplastický melanom) jsou invadující nádorové buňky velmi drobné a připomínají kožní jizvu.<sup>41</sup>



Obr. 16: Lentigo maligna melanoma.<sup>41</sup>

Barveno HE. Nalevo-Lentigo maligna je charakteristické jednotlivými melanocyty sdruženými podél dermální epidermální junction a také u kožních žláz. Melanocyty jsou malé a hyperchromatické, nevyskytuje se často Pagetoidní migrace. Vždy jsou ale pod vrstvou sluneční elastózy. Napravo-vícejaderné buňky tohoto typu melanomu (starburst cells).



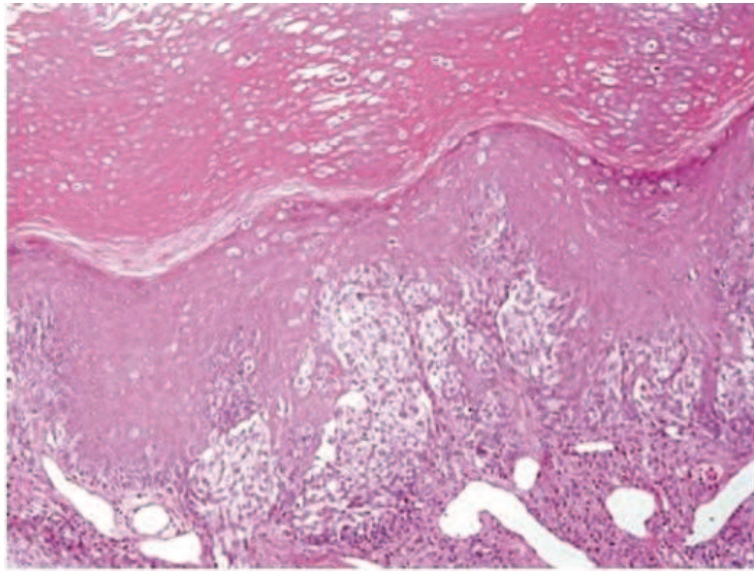
Obr.17: Lentigo maligna melanoma.<sup>41</sup> Barveno HE.

Nalevo- proliferace cívkovitého (vřetenovitého) tvaru, hyperchromatické melanocyty. Napravo- atypické melanocyty kroužící okolo zvětšených cév v retikulární dermis.

***Acral lentiginous melanoma*** – akrální lentigózní melanom je relativně ne příliš často se vyskytující typ melanomu, nacházející se na akrálním povrchu. Tyto tumory často vznikají na nehtovém lůžku pod nehtem a proto jsou často nalezeny až v pozdních fázích choroby. U tohoto typu melanomu jsou melanocyty přítomny v hnízdech (shlucích) a také jako jednotlivé buňky podél dermal epidermal junction. Pagetoidní migrace směrem nahoru je rozšířená v celé šířce léze. Pagetoidní rozšíření je také vidět u benigního akrálního névu, ale v tomto případě je také mnohem více omezené a má sklon být také drobnější a vertikálně orientované.

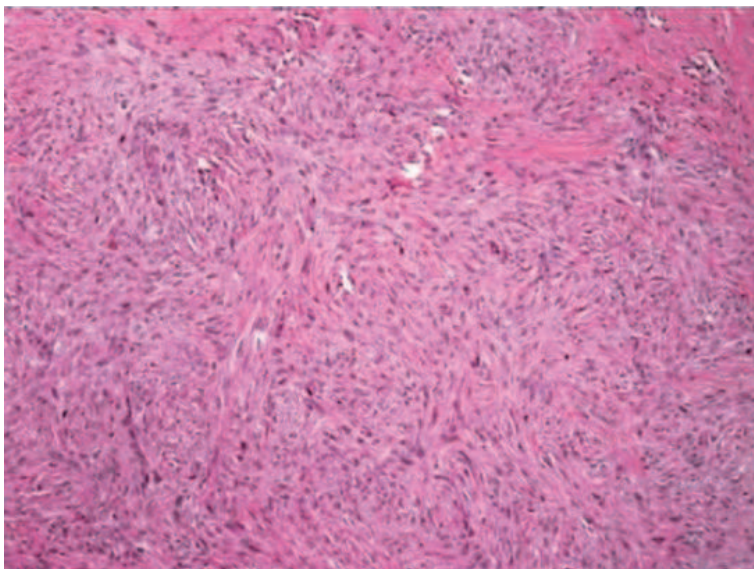
Intraepidermální melanocyty připomínají melanocyty u lentigo maligna. Jsou nejčastěji hyperchromatické a spirálovité. Jadérka nejsou příliš viditelná (Obr. 18).<sup>41</sup>

Dermální invaze je charakterizována proliferací vřetenovitého tvaru a hyperchromatickými melanocyty v kůži. Je zde také významná tendence agregace okolo cév. Mitotická aktivita je poměrně variabilní (Obr. 19).<sup>41</sup>



Obr. 18: Acral lentiginous melanoma. <sup>41</sup> Barveno HE.

Akrální lentiginózní melanom charakterizují hnízda i jednotlivé melanocyty mezi epidermis s rozšířenou Pagetoidní migrací směrem vzhůru.

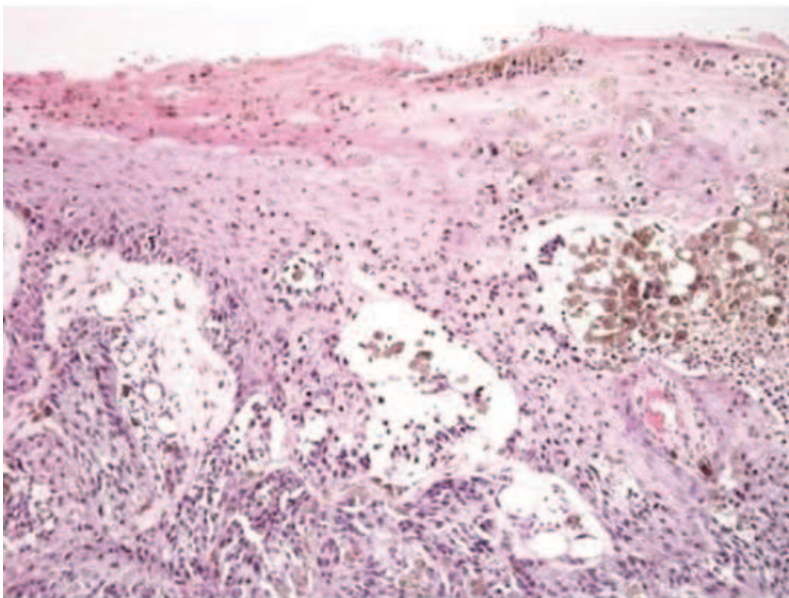


Obr. 19: Acral lentiginous melanoma. <sup>41</sup> Barveno HE.

Melanocyty vřetenovitého tvaru mezi fibrotickým stroma.

***Mucosal lentiginous melanoma*** – mukosální lentiginózní melanom má hodně společných vlastností na histologické úrovni s akrálním lentiginózním melanomem a liší se hlavně v nižších vrstvách dermis. Jednotlivé osamocené melanocyty i jejich shluky stoupají proliferací od basální vrstvy (kde vznikají) nad mukosální povrch (často nasální nebo genitální mukóza). Ulcerací je často nepočítaně. Intraepiteliální složky této melanocytické proliferace jsou charakterizovány jednou ze dvou předešlých morfologických charakteristik. V některých případech jsou buňky objemné s hojnou eosinofilní cytoplasmou. V jiných případech jsou pozorovány velice dobře rozlišitelná a objemná jádérka. Jsou také zaznamenány i melanocyty zvětšené s hyperchromatickým a vřetenovitým jádrem a relativně nepatrným množstvím cytoplazmy (Obr. 20).<sup>41</sup>

Invazivní složky mukosálního lentiginózního melanomu jsou podobné k složkám akrálního lentiginózního melanomu. Melanocyty jsou obkrouženy fascikuly a jednotlivými buňkami vnořenými mezi kolagenní svazky, což demonstruje jistý sklon tvorby v okolí cév. Můžeme také vidět roztroušené mitózy se sklonem dozrávat. Atypické buňky se většinou u toho případu neoznačují.<sup>41</sup>



Obr. 20: Mucosal lentiginous melanoma.<sup>41</sup> Barveno HE.

Mucosal lentiginous melanoma charakterizuje obrovská hnízda melanocytů na úrovni mukózních povrchů, často s ulcerací.

## 2.9. Klasifikace melanomů.

Maligní melanomy obvykle splňují všechny tyto 4 kritéria: asymetrie (asymmetry), nepravidelnost okrajů névu (border irregularity), barevná variace (color variagation), velikost diametrálně vyšší než 6mm (diameter more than 6 mm) - "Malignant Melanoma ABCD".<sup>2</sup>

Běžně se podezřelý névus zkoumá dermatoskopem, ale při jakémkoli dalším podeřeni zejména při splnění těchto kritérií výše musí být odebrát vzorek a ten dále zkoumán. Teprve biopsie je považována za definitivní diagnózu.<sup>2</sup>

Histologicky objasnil maligní melanom Wallace Clark a kolegové na superficial spreading type (SSMs), lentigo malignant type, and nodular type.<sup>42</sup> Později Dr. Richard Reed přidal čtvrtý typ nazvaný acral lentiginous malignant melanoma.<sup>43</sup> Od té doby se klasifikují melanomy do těchto skupin s relativní incidencí: superficial spreading melanoma (50%–75%), nodular melanoma (15%–35%), lentigo maligna melanoma (5%–15%), acral lentiginous melanoma (5%–10%), desmoplastic melanoma (uncommon), další nezařaditelné typy.<sup>2</sup>

Melanomy procházejí 3 klinickými a histomorfologickými kroky během progresu tumoru.<sup>44</sup>

1. Malignant Melanom vázaný na epidermis (melanoma in situ), říká se tomu radiální růstová fáze- Radial Growth Phase- (RPG-) vázaného melanomu.
2. Radiální růstová fáze-Radial Growth Phase (RGP)- microinvasivní, kdy se nějaké maligní buňky objevují v superficiální papilární dermis.
3. Vertikální růstová fáze-Vertical Growth Phase (VGP)-u melanomů, které vstoupily do tumorigenní nebo mitogenní fáze (obvykle Clark's level II and občas Clark's level III).

## 2.10. Prognostické faktory melanomu.

Posuzováno je několik faktorů patologických, klinických i dalších faktorů, mezi které patří například genetické dispozice. Mezi patologickými faktory se posuzuje zvyšující se Breslowova tloušťka tumoru<sup>45</sup>, ulcerace, mitotický poměr, Clarkova hladina (Clark level)<sup>42</sup>, absence lymfocytů infiltrujících tumor<sup>46</sup>, regrese<sup>47</sup>, mikroskopické satelity<sup>48</sup>, lymfovaskulární invaze<sup>49</sup>, angiotropismus, objem tumoru, neurotropismus, buněčný typ, lokální namnožení

buněk, histopatologický subtyp a přítomnost vertikální růstové fáze. Mezi klinické faktory patří zvýšený věk, mužské pohlaví, lokalizace léze a metastázování.<sup>2</sup>

## **2.11. Melanom B16-F10.**

Jako rakovinný model jsme si vybrali buněčný melanom B16-F10. Tato buněčná linie byla odvozena původně v roce 1970 v Jackson Laboratories ze spontánně vzniklého nádoru myši. Intravenózní aplikace tohoto melanomu vedla k usazení buněk tumoru v plicích. Tato linie B16 byla v červnu 1978 začleněna do americké databanky buněčných kultur American Type Culture Collection. V roce 1983 byla tato linie schválena pro další distribuci Národním institutem pro rakovinu- National Cancer Institute (NCI) v Marylandu, USA. Od tohoto okamžiku si celá vědecká komunita mohla vybrat mezi liniemi B16-F0, B16-F1, B16-BL/6 a B16-F10. Linie B16-F10 jak již bylo známé metastazovala do plic.<sup>50</sup> Pokud se ale buňky z těchto plicních metastáz reimplantovaly do nového hostitele, došlo k selekčnímu procesu, například k novým metastázám do mozku C 57 myši (linie B16-B10n). Tyto linie vykazovaly preference pro cerebrální vaskulaturu. Tímto způsobem se buňky tumoru dostaly do cerebrálního cortexu.<sup>51</sup> Podobným způsobem selektoval Brunson a Nicolson v následujícím roce další variantu B16 melanomové rodiny, tentokrát metastazující do vaječnicků. Tato varianta byla nazvána B16- 010.<sup>52</sup> Postupně byly šlechtěny další linie specifické pro určitý typ metastázování. Dithmar et al.<sup>53</sup> Použil linii B16-LS9 selektovanou Ruscianem et al.<sup>54</sup> pro založení nového modelu. Transcorneální implantace vedla k mimo okulárním metastázám do plic a jater. Tento typ je podobný k podmínkám nastávajícím u lidskému melanomu. A nejenom proto pomohlo selektování různých linií k vývoji dalších modelů pro studium lidské patologie.<sup>54</sup>

### 3. Vrozená imunita.

Vrozený imunitní systém je evolučně konzervovaný systém, který funguje jako první linie obrany proti invazi mikrobiálních patogenů a jiných potenciálních hrozeb pro hostitele. K rozpoznání těchto patogenů slouží **pattern recognition receptors (PRRs)**. Jde o receptory schopné rozpoznat specifické molekulární vzory spojené s patogeny, tzv. **pathogen-associated molecular patterns (PAMPs)**. Nacházejí se u mikrobů jako jsou viry, bakterie, paraziti a plísňe. Kromě toho se PRRs podílejí i na rozpoznání endogenních signálů "nebezpečí" tím, že rozpoznávají s nebezpečím spojené molekulární vzory, tzv. **danger-associated molecular patterns (DAMPs)**, což jsou endogenní molekuly uvolňované z nekrotických nebo umírajících buněk.<sup>55</sup>

Rozpoznání PAMPs nebo DAMPs motivů pomocí PRRs vyvolává zánětlivou reakci. Tato vrozená zánětlivá odpověď zahrnuje sekreci cytokinů/chemokinů, indukci antimikrobiálních peptidů, pyroptickou buněčnou smrt a přísun fagocytujících buněk. Správná koordinace různorodých cest vrozené imunity je zásadní pro efektivní destrukci a zastavení invaze patogenů a dalších hrozeb. Vrozený imunitní systém tedy nejen předchází vzniku onemocnění, ale umožňuje vysoce specializovanému adaptivnímu imunitnímu systému fungovat (jelikož spolu oba dva úzce spolupracují) a tím i zajistit dlouhodobou imunologickou paměť.<sup>55</sup>

Do hlavní PRRs rodiny vrozeného imunitního systému patří Toll-like receptory (TLR), NOD-like receptory (NLRs), RIG-I-like receptory (RLRs), cytosolické DNA senzory (CDS), lektin typu C receptory (CLR), a také důležitou roli zde zastávají inflammasomy a autofágové.<sup>55</sup>

#### 3.1. Toll-like receptory (TLRs).

**Toll-like receptory (TLRs)** jsou první identifikované a nejlépe charakterizované receptory mezi pattern recognition receptory (PRRs). Iniciují klíčové zánětlivé odpovědi a také podporují adaptivní imunitu. TLRs jsou evolučně konzervované receptory homologní k *Drosophila* Toll proteinu důležitého jako obrana proti mikrobiální infekci.<sup>56</sup>

Rozeznávají širokou paletu PAMPs motivů z bakterií, hub, parazitů a virů. Ty zahrnují lipidové komponenty bakteriální stěny (lipopolysacharid) a lipopeptidy (peptidoglykan), mikrobiální proteiny (flagelin) a nukleové kyseliny (jednořetězcová nebo dvouřetězcová RNA a CpG DNA). Dalšími motivy, které jsou TLRs schopné rozpoznat patří DAMPs motivy.

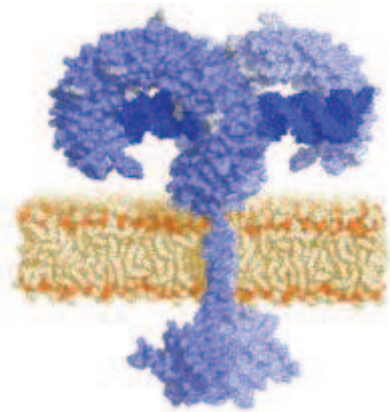


Mezi ty patří intracelulární proteiny jako Heat shock proteiny nebo proteinové fragmenty z extracelulární matrix.<sup>57</sup>

Stimulací TLRs receptorů příslušnými PAMPs nebo DAMPs motivy je podněcována signální kaskáda vedoucí k aktivaci transkripčních faktorů (AP-1, NF- $\kappa$ B a interferon-regulační faktory (IRFs)), což vede k rozmanité buněčné odpovědi od produkce interferonu (IFNs), prozánětlivých cytokinů až k produkci efektorových cytokinů, které řídí adaptivní imunitní odpověď.<sup>55</sup> Schéma těchto drah je naznačeno v příloze 1.<sup>57,58</sup>

### 3.2. TLR rodina.

TLRs receptory jsou transmembránové proteiny typu I typické svou extracelulární doménou obsahující na leucin bohaté repetice (LRRs) a cytoplasmatický ocas, který obsahuje konzervovaný region Toll/IL-1 receptor (TIR) doménu.<sup>57</sup> Podkovitá struktura extracelulární domény TLR3 byla odhalena roku 2005 krystalografií (Obr. 21).<sup>59</sup>



Obr. 21: Struktura TLR3.<sup>59</sup>

TLRs jsou převážně exprimovány ve tkáních imunitního systému (slezina, periferní leukocyty), stejně tak i na tkáních chránících organismus proti vnějšímu prostředí (plíce a gastrointestinální trakt). Jsou tedy exprimovány na různých typech tkání a buněk. TLRs jsou umístěny na plasmatické membráně s výjimkou TLR3, TLR7, TLR8, TLR9, ty se nachází na endosomálních kompartmentech.<sup>60</sup>

V současné době je již charakterizováno deset lidských a dvanáct myších TLRs (**TLR1** až **TLR10** u lidí a **TLR1** až **TLR9**, **TLR11**, **TLR12** a **TLR13** u myší). Homolog TLR10 je považován za pseudogen.<sup>57</sup>

**TLR2** je esenciální pro rozpoznání různých PAMPs z gram-positivních bakterií, zahrnujících bakteriální lipoproteiny, lipomanany a lipoteichoovou kyselinu. **TLR3** je spojen s virovou dvouřetězcovou RNA. **TLR4** je převážně aktivován lipopolysacharidem. **TLR5** detekuje bakteriální flagelin a **TLR9** potřebuje k tomu, aby se navázal, nemetyovanou CpG DNA. Dále **TLR7** a **TLR8** rozpoznávají malé syntetické antivirální molekuly<sup>61</sup> a jednořetězcovou RNA (přírozený ligand TLR7/8)<sup>62</sup>. **TLR11**, **TLR12** rozpoznávají uropathogenní *E.coli*<sup>63</sup> a profilin-like protein z *Toxoplasma gondii*<sup>64</sup>.

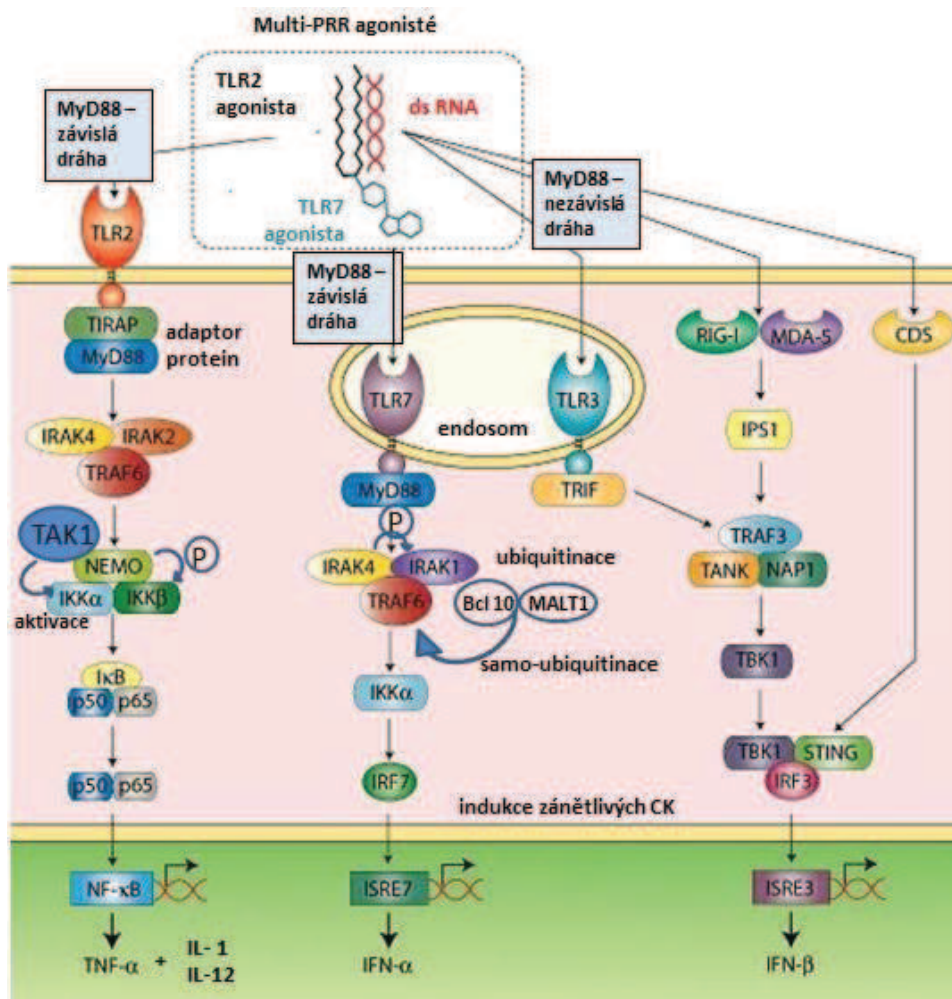
Repertoár specifity TLRs je zřejmě rozšířen o schopnost TLRs heterodimerizovat jeden s druhým. Například dimery TLR2 a TLR6 jsou nutné pro odpověď proti diacylovaným lipoproteinům, zatímco TLR2 a TLR1 interagují při rozpoznání triacylovaných lipoproteinů.<sup>65</sup> Specifitou TLRs je také jejich ovlivnění rozličnými adaptéry a přidavnými molekulami, jako je MD-2 a CD14 (tvoří komplex s TLR4 při odpovědi na LPS).<sup>66</sup>

### **3.3. Vedení signálu po aktivaci TLR- TLR signalizace.**

Vedení signálu po aktivaci TLR se skládá z nejméně dvou odlišných drah: **na MyD88-závislá dráha**, která vede k produkci zánětlivých cytokinů, a **na MyD88-nezávislá dráha** spojená se stimulací IFN- $\beta$  a zráním dendritických buněk.<sup>57</sup>

Na MyD88-závislá dráha je častější u všech TLRs (kromě TLR3).<sup>67</sup> Před aktivací PAMPs nebo DAMPs, TLRs hetero- nebo homodimerizují, což indukuje příjem adaptorových proteinů přes cytoplasmatickou TIR doménu. Adapterové proteiny zahrnují TIR-doménu obsahující proteiny, MyD88, TIRAP (TIR-associovaný protein), Mal (MyD88 adaptor-like protein), TRIF (TIR doménu obsahující adapterový protein-indukující IFN- $\beta$ ) a TRAM (TRIFu-příbuzná adapterová molekula).<sup>57</sup>

Následuje kaskáda proteinů/ molekul zatím s ne zcela objasněným průběhem, která vede až k tvorbě zánětlivých cytokinů a následné indukci zánětlivé odpovědi. K tomuto dochází po postupném aktivování jednotlivých jednotlivých kroků této kaskády několika způsoby, nejčastěji však fosforylací (IRAK1, IRAK4, I $\kappa$ B)<sup>68</sup>, ubiquitinací (TRAF 6)<sup>69</sup> nebo tvorbou komplexů / oligomerů a jimi tvořených podpůrných proteinů (Bcl10, MALT1)<sup>68</sup>. Průběh těchto drah je naznačen níže v Obr. 22.



Obr. 22: Schematické znázornění vrozených imunitních signálních drah po aktivaci PamadiFectin™ (CL553)- multi-PRR agonistou, který aktivuje TLR2, TLR7 a tím spouští na MyD88 závislou dráhu signalizace. Pokud je v komplexu s nukleovou kyselinou aktivuje také senzory nukleových kyselin a spouští tak v tomto případě na MyD88 nezávislou dráhu.<sup>70</sup>

Jednotlivé TLRs indukují odlišné signální odpovědi užitím rozdílných adaptorových molekul. **TLR4 a TLR2** signalizování vyžaduje adaptor TIRAP/Mal, který je zahrnut při MyD88-závislé dráze.<sup>71</sup> **TLR3** spouští produkci IFN-β při odpovědi na dvouřetězcovou RNA, při na MyD88-nazávislé dráze, prostřednictvím adaptoru TRIF/TICAM-1.<sup>72</sup> TRAM/TICAM-2 je další adapterová molekula zahrnutá při MyD88-nezávislé dráze<sup>73</sup>, jejíž funkce je omezená na **TLR4** dráhu.<sup>74</sup>

**TLR3, TLR7, TLR8 a TLR9** rozpoznávají virální nukleovou kyselinu a indukují typ I IFNs. Signální mechanismus vede k indukci typu I IFNs lišící se v závislosti na aktivovaném TLR. Zahrnují interferon-regulační faktory, IRFs, rodinu transkripčních faktorů známou díky své klíčové roli při antivirální obraně, buněčném růstu a imunitní regulaci. Tři IRFs (IRF3, IRF5

and IRF7) pracují (fungují) jako přímé snímače (převodníci) virem-zprostředkovaného TLR signaling. **TLR3 and TLR4** aktivují IRF3 a IRF7<sup>75</sup>, zatímco **TLR7 a TLR8** aktivují IRF5 a IRF7<sup>76</sup>. Navíc produkce typu I IFN stimulovaného **TLR9** ligandem CpG-A se zdá být zprostředkovaná PI(3)K a mTOR.<sup>77</sup>

### **3.4. TLR-cílená terapeutika.**

Během posledních let byl udělán velký pokrok v porozumění funkcím Toll like receptorů. TLRs jsou základní receptory účastníci se při hostitelské obraně proti patogenům a to tak, že aktivují vrozenou imunitu, což následně indukuje adaptivní imunitní odpověď.

TLR-zprostředkovaná signalizace je prvořadá při eradikaci (vyhlazení) mikrobiální infekce a podpoře reparace tkáně, přesto ale tyto děje musí být pevně regulovány. TLRs jsou totiž zapleteny i v množství zánětlivých a imunitních poruch a hrají také klíčovou roli u rakoviny.<sup>78</sup>

U TLR genů bylo identifikováno velké množství jednotlivých nukleotidových polymorfismů, které jsou spojeny s určitými chorobami. V současné době je již testováno v pre-klinických a klinických zkouškách několik terapeutických agens (složek) targetujících TLRs.<sup>79</sup>

Nicméně složitost těchto dějů spočívá v tom, že TLRs působí dvousečně - buď podporují nebo inhibují progresi nemoci. Navíc targetování terapeutického agens na TLRs musí být provedeno tak, aby znemožnilo škodlivý vliv této regulace, aniž by byla narušena obranná funkce hostitele. Přesto se ale potenciál využití a ovlivnění vrozené imunity léky targetujícími TLRs (zabranující nebo přímo léčící zánětlivé a autoimunitní choroby i rakovinu) zdá být velmi slibný.<sup>57</sup>

### **3.5. Ligandy Toll-like receptorů.**

Přehled základních vlastností Toll-like receptorů (TLR1-TLR10), jejich ligandů a způsobů aktivace najdete v přehledu v příloze 2.

#### **3.5.1. Ligandy TLR1/ TLR2/ TLR6.**

Toll-like receptor 2 (TLR2) se účastní rozpoznávání širokého spektra mikrobiálních molekul zastupujících druhy grampozitivních (*Listeria monocytogenes*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*) a gramnegativních bakterií (*Legionella pneumophila*, *Porphyromonas gingivalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Helicobacter pylori*),

stejně jako mykoplasmat a kvasinek. TLR2 rozeznává komponenty buněčných stěn (peptidoglykan, lipoteichoová kyselina) a lipoproteiny z grampozitivních bakterií, lipoarabinomannan z mykobakterií a zymosan z buněčné stěny kvasinek. Rozmanitost TLR2 ligandů je nejrozsáhlejší mezi všemi TLRs a to díky heterodimerizaci, která je nutná pro TLR2 zprostředkovanou imunitní reakci.<sup>80</sup>

TLR2 velice úzce spolupracuje s TLR6 při odpovědi na diacylované lipopeptidy z mykoplasmat.<sup>81</sup> Spolupracuje také s TLR1 při rozpoznávání lipidické konfigurace přirozených mykobakteriálních produktů stejně jako triacylovaných lipopeptidů.<sup>82</sup> TLR1 i TLR6 rozpoznávají TLR2 ligandy odlišně v závislosti na stupni acylace lipopeptidů. Prozatím není zcela jasné, jestli TLR2 tvoří heterodimery s TLR1 a TLR6 a nebo jestli existuje nějaký velký receptorový komplex skládající se z těchto a případně i dalších receptorů.<sup>83</sup>

### **3.5.2. Ligandy TLR3.**

Toll-like receptor 3 (TLR3) rozpoznává dvouvláknovou RNA (dsRNA), molekulární vzor spojený s virovou infekcí. Polyinosine-polycytidylic kyselina (poly (I:C)), syntetický analog dsRNA, je ligandem volby pro TLR3. Poly (I:C), se skládá z řetězce poly (I), navázaného na vláknu poly (C). Délka vláken bývá často rozdílná.<sup>80</sup>

### **3.5.3. Ligandy TLR4.**

Toll-like receptor 4 (TLR4) rozpoznává konstrukční složku buněčné stěny gramnegativních bakterií–lipopolysacharid (LPS). Tomuto velice významnému aktivátorovi imunitního systému je věnována kapitola 4.1., kde je tento ligand TLR4 a jeho působení podrobněji popsáno. Dalšími ligandy Toll-like receptoru 4 jsou virální proteiny.<sup>84, 85</sup>

Za aktivátory TLR4 jsou považovány také Heat Shock protein B4 (HSPB4)<sup>86</sup>, fibrinogen<sup>87</sup>, surfaktant protein A<sup>88</sup> a hyaluronová kyselina<sup>89</sup>. Malý Heat Shock Protein B8 (HSP22) jako další ligand TLR4 byl objeven v souvislosti se zkoumáním patogeneze revmatoidní artritidy.<sup>90</sup> Aktivace tohoto receptoru je velmi intenzivně zkoumána ve snaze nabudit vrozenou imunitu proti rakovině a to nejčastěji ve spojitosti s lipopolysacharidem.

### 3.5.4. Ligandy TLR5.

Toll-like receptor 5 (TLR5) rozpoznává flagelin z obou typů gram pozitivních i gram negativních bakterií. Aktivace receptoru stimuluje produkci prozánětlivých cytokinů (TNF- $\alpha$ ) díky signalizaci prostřednictvím adaptor proteinu MyD88. TLR5 může generovat prozánětlivý signál jako homodimer. To naznačuje, že pouze TLR5 je nutný pro rozpoznání flagelinu. Přesto může TLR5 pro efektivní rozpoznání ligandu nebo signalizaci vyžadovat přítomnost molekuly koreceptoru nebo adaptor molekuly.<sup>80</sup>

### 3.5.5. Ligandy TLR7/ TLR8.

Toll-like receptor 7 (TLR7) a TLR8 hrají důležitou roli v imunitní odpovědi na virovou infekci. Rozpoznávají jako svůj přirozený ligand jednořetězcovou RNA a také malé syntetické molekuly, jako jsou imidazoquinolin a analogy nukleosidů.<sup>91, 92</sup>

Jednořetězcová RNA odvozená od HIV-1 nebo viru chřipky indukuje produkci prozánětlivých cytokinů v plasmatických dendritických buňkách.<sup>93, 94</sup>

Po stimulaci jednořetězcovou RNA dochází k indukci aktivace NF-kB u myši přes TLR7 a u lidí přes TLR8, což naznačuje na druhovou specifickou rozpoznání ssRNA.<sup>80</sup>

### 3.5.6. Ligandy TLR9.

Toll-like receptor 9 (TLR9) rozpoznává specifické nemethylované CpG motivy převládající v mikrobiální genomové DNA (nevyskytují se u obratlovců). Imunostimulační účinky mikrobiální DNA mohou být napodobovány syntetickými oligodeoxynukleotidy obsahující tyto CpG motivy (CpG ODNs). Byly identifikovány tři hlavní třídy CpG ODNs: třídy A, B a C, které se liší v jejich struktuře a vlivu na periferní mononukleární buňky (PBMC), zejména B-buňky a plasmatické dendritické buňky (pDCs) a tím se liší v jejich imunostimulační aktivitě.<sup>80</sup>

CpG ODNs jsou krátké syntetické molekuly jednořetězcové DNA obsahující nemethylované CpG dinukleotidy v určitém pořadí (CpG motivy). CpG ODNs mají částečně nebo zcela fosforothioalovanou (PS) kostru, na rozdíl od přirozené fosfodiesterové (PO) kostry nalezené v genomu bakteriální DNA.<sup>80</sup>

Třída A CpG ODNs (ODNs CpG-A) obsahuje centrální palindromickou fosfodiesterovou (PO) CpG sekvence a PS-modifikovaný 3' poly-G řetězec. Poly G konec tvoří mezimolekulární tetrády, které vedou k vysoké molekulární hmotnosti získaných struktur. Tyto struktury udělují tomuto typu zvýšenou stabilitu a zvýšený endosomální příjem přispívající k produkci velkého množství IFN- $\alpha$  a zraní periferních DC. ODN CpG-A jsou také silnými aktivátory NK buněk prostřednictvím nepřímé cytokinové signalizace.<sup>95,96,97</sup>

Třída B CpG ODN (ODNs CpG-B) jsou 18-28 merní lineární oligodeoxynucleotidy. Obsahují plně fosforothiolovaný hlavní řetězec s jednou nebo více hexamer CpG motivů. Optimální motivem je GTCGTT na člověka<sup>98</sup> a GACGTT u myši<sup>99</sup>.

ODN CpG-B stimulují silnou reakci B buněk a aktivaci NK buněk, ale jsou slabými aktivátory sekrece IFN- $\alpha$ . Vykazují protinádorovou aktivitu a jsou silnými Th1 adjuvans.<sup>100,101</sup>

Třída C CpG ODN (CpG-C ODNs) kombinuje vlastnosti obou tříd A a B. Obsahuje kompletní PS kostru a CpG-obsahující palindromický motiv.

C-Třída CpG ODN velmi silně stimuluje B buňky, stejně jako stimuluje sekreci IFN typu I. CpG-C ODNs jsou silné Th1 indukující adjuvans.<sup>102</sup>

Vlastnosti jednotlivých tříd jsou shrnuty v Tab. II.

Tab. II: Shrnutí vlastností jednotlivých CpG ODNs tříd.

<b>Třída A CpG ODN</b>	<b>Třída B CpG ODN</b>	<b>Třída C CpG ODN</b>
-stimulace pDCs -indukce produkce IFN- $\alpha$	-stimulace a proliferace B buněk -NF- $\kappa$ B aktivace v TLR9 exprimujících rekombinantních buňkách -pomocná látka vakcín	-kombinované aplikace třídy A a B třídy CpG ODN

### 3.5.7. Ligandy TLR11/TLR12.

Toll-like receptor 11 (TLR11) rozpoznává profilin bakterie *T. gondii* (Tg PRF) a je nutný pro produkci IL-12 a indukci imunitní odpovědi snižující tvorbu cyst v toxoplasmosou infikovaných myších.<sup>103</sup>

K této infekci je vysoce suscesibilní nejenom TLR11 ale také TLR12. 96% strukturní podobnost mezi TLR11 a TLR12 demonstruje, že tyto receptory sdílí významnou homologii. Rozdíl mezi těmito receptory však spočívá v transmembranózním regionu a mezi box2-oblastí jejich TIR domén, kde TLR12 má isoleucin místo vysoce konzervovaného prolinového residua (zbytku). Oba dva, TLR11 i TLR12, se nacházejí na podobných endosomálních kompartmentech, což naznačuje, že mohou interagovat a působit synergicky jako heterodimery v rozpoznání a odpovědi na Tg PRF u makrofágů a dendritických buněk. Aktivace obou receptorů je také optimální pro uvolnění NF-κB v odpovědi na Tg PRF. Exprese TLR12 se objevuje ovšem spíše u hematopoetických buněk, zatímco TLR11 je široce exprimována jak na povrchu epiteliálních tak i hematopoetických buněk.<sup>103</sup>

Myši tedy mají oba dva receptory, TLR11 i TLR12, které jsou specializované na rozpoznání profilinu z parazitů rodu Apikomlexa. Je pravděpodobné, že u lidí a dalších vyšších savců je exprese TLR11 a TLR12 negativně selektována z důvodu potenciálního letálního prozánětlivého efektu při rozpoznání profilinu těmito toll-like receptory.<sup>103</sup>

### **3.5.8. Ligandy TLR13.**

Toll-like receptor 13 (TLR13) je endosomální TLR exprimovaný u myší, jehož role zůstává zatím neobjasněna. V poslední době byly identifikovány tři samostatné skupiny 23S ribozomální RNA (rRNA) jako ligand pro TLR13. Tato jednořetězcová rRNA je přítomna v grampozitivních i gramnegativních bakteriích, ale nenachází se v eukaryotických buňkách. Konzervované sekvence 10 zbytků leží v rámci katalytického centra 23S rRNA, "CGGAAAGACC". Tato sekvence je nezbytná pro spuštění TLR13 dráhy. Jiné formy rRNA nejsou schopny aktivovat TLR13 dráhu. Z toho se usuzuje, že TLR13 je schopný (na rozdíl od jiných receptorů) rozpoznat specifické RNA sekvence. Lidé ovšem nemají TLR13 a pravděpodobně se tedy při detekci patogenů musí spolehnout na jiné receptory.<sup>80</sup>

### **3.5.9. Multi-PRRs ligandy.**

Bylo vyvinuta řada nových molekul, jejichž cílem je vyvolat silnou imunitní odpověď prostřednictvím kombinované aktivace několika pattern recognition receptorů (PRRs), které spouštějí různé vrozené imunitní signální dráhy.

Tyto molekuly jsou často agonisty TLR2, TLR7 nebo obou toll like receptorů. Kromě toho některé z těchto ligandů mají schopnost tvořit komplexy s nukleovými kyselinami (ds DNA,



krátké oligonukleotidy, plasmidová DNA nebo ss RNA) a usnadnit jejich pronikání do buňky, což vede k jejich rozpoznávání dalšími PRRs, které detekují nukleové kyseliny (např. cytosolické DNA senzory DDX41 a IFI16 a dsRNA receptory TLR3 a RIG-I/MDA-5).<sup>80</sup>

### **3.5.10. Multi-TLR agonisté-potenciál pro terapeutické účely.**

Toll-like receptory (TLR) jsou nejlépe studované pattern recognition receptory (PRRs) a mají velký význam při podpoře vrozené a adaptivní imunity. TLRs jsou senzory mikrobiálních složek stejně jako hostitelských endogenních molekul uvolňovaných při poranění tkání. TLR hrají klíčovou roli v obraně proti invazi patogenů, ale podílí se i na jiných závažných patologických procesech, jako je například tumorigeneze.<sup>104</sup> Agonisté TLR mají tedy velký potenciál jako imunoterapeutika nebo pomocné látky, vakcíny při léčení infekčních onemocnění, rakoviny a autoimunitních chorob.<sup>70</sup>

Jedna z nejuspěšnějších empirických vakcín, která kdy byla vůbec vyvinuta- živá atenuovaná (oslabená) vakcína proti žluté zimnici YF-17D- aktivuje imunitní buňky přes vícero TLR.<sup>105</sup> Podobně působí i mikrobiální produkty, jako je například Coleyho toxin (směs usmrcených bakterií *Streptococcus pyogenes* a *Serratia marcescens*) a Bacille Calmette-Guérin (BCG, atenuovaný kmen *Mycobacterium bovis*), které byly s určitým úspěchem použity jako protinádorové látky, indukují imunitní systém hostitele prostřednictvím aktivace několika TLR. Studie prokázaly, že k účinnosti YF-17D a BCG je vyžadována reakce Th1 cytokinů, která podporuje antigen-specifické cytotoxické T-lymfocyty.<sup>105, 106</sup>

V současné době je schváleno velmi málo TLR agonistů pro klinické použití.<sup>107</sup> Jedním z hlavních problémů imunoterapie rakoviny je nádorem řízené potlačení imunity. Nádorové buňky uvolňují rozpustné faktory, které vedou k nádorové infiltraci buňkami imunitního systému a jejich přeměně v účinné imunosupresivní buňky. Mezi nejrozsáhleji zkoumanými supresorovými buňkami jsou MDSCs (z myeloidní řady odvozené supresorové buňky). MDSCs uvolňují další rozpustné faktory, které stimulují růst nádoru, indukují regulační T-buňky a potlačují CD8+ T-buňky, čímž se zhoršuje dohled nad tumorem a protinádorová reakce.<sup>108</sup> Bylo prokázáno, že TLR3 nebo TLR9 agonisté, kteří vyvolávají silnou produkci IFN- $\alpha$ , indukují zránění MDSC a ztrátu supresivních funkcí (na rozdíl od TLR4 agonistů, kteří podporují supresivní funkce MDSC buněk).<sup>109</sup>

Vzhledem k tomu, že TLR jsou exprimovány v různých buněčných kompartmentech, různými typy buněk, a že spouští různé signální dráhy, kombinace TLR agonistů může působit v synergii vedoucí k podpoře Th1-typu imunitní reakce. Povzbudivé klinické výsledky byly hlášeny u kombinace BCG a TLR 7 agonisty imiquimodu u pacientů s melanomem.<sup>110</sup> Kromě toho při studiu očkování bylo prokázáno, že kombinace imiquimodu a MPL (TLR4 ligandu) vyvolává synergické zvýšení antigen-specifických neutralizačních protilátek v porovnání s pouze jedním TLR ligandem.<sup>111</sup>

Kombinace agonistů TLR s agonisty jiných PRRs, jako jsou senzory nukleových kyselin RIG-I/MDA-5, IFI16 a cGAS, může dále zvýšit imunitní odpověď proti rakovině a infekčním chorobám.<sup>70</sup>

Napodobování mocných přirozených imunitních podnětů, jako jsou viry a bakterie, multi-PRR ligandy, představuje zajímavou novou řadu činidel v imunoterapii nádorových onemocnění anebo očkování. Je ovšem třeba provést další studie pro vyvinutí co nejlepší kombinace PRR agonistů pro danou aplikaci.<sup>70</sup>

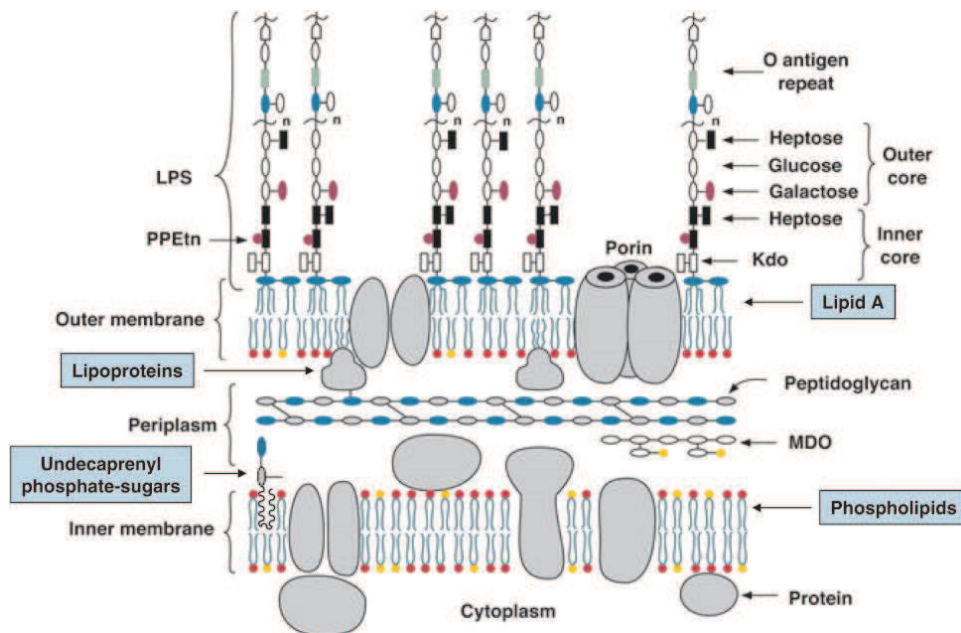
## 4. Testované chemikálie.

### 4.1. Lipopolysacharid.

Bakteriální lipopolysacharid (LPS) je hlavní konstrukční prvek vnější stěny všech gramnegativních bakterií a účinný aktivátor imunitního systému. Stimuluje zejména vrozenou imunitní odpověď<sup>112</sup> a následně po spuštění sekrece cytokinů z makrofágů (IL1, IL6, TNF- $\alpha$ )<sup>113</sup> také aktivuje produkci kostimulačních molekul potřebných pro adaptivní imunitní odpověď<sup>112</sup>.

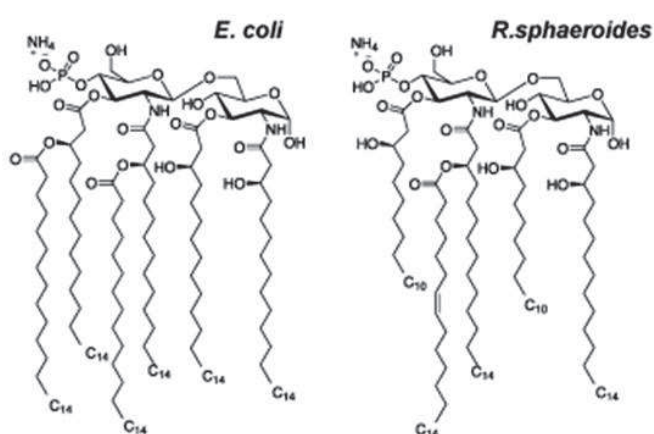
LPS je rozpoznáván Toll-like receptorem 4 (TLR4), který interaguje se třemi různými extracelulárními proteiny: LPS vázající protein (LBP), CD14 a myeloidní diferenační protein 2 (MD-2), k vyvolání signální kaskády vedoucí k aktivaci NF- $\kappa$ B a produkci prozánětlivých cytokinů.<sup>114</sup>

Bakteriální lipopolysacharidy (LPS) se typicky skládají z hydrofobní domény známé jako lipid A (neboli endotoxin) a z distálního polysacharidu (neboli O-antigenu).<sup>115</sup> Charakteristické strukturní rysy buněčné stěny *E. coli* můžete vidět na Obr. 22. Pro vyvolání endotoxinové odezvy u lidských buněk jsou nutné zejména jeho dvě fosfátové skupiny a jeho dva acyloxyacylové zbytky.<sup>116,117</sup>



Obr. 22: Model vnitřní a vnější membrány *E. coli* K-12.<sup>117</sup>

LPS se skládá z regionu polysacharidů, který je ukotven ve vnější bakteriální membráně pomocí lipidu A (zodpovědný za imunostimulační aktivitu LPS). **Lipid A** je glukosamin disacharid spojený k hydroxyly mastných kyselin. Počet mastných kyselin připojených k lipidu A je hlavním determinantem imunogenicity endotoxinu. Nejméně aktivní forma lipidu A obsahuje šest mastných acylových skupin a nachází se u patogenních bakterií (*Escherichia coli* a *Salmonella*) (Obr. 23). Underacylated lipid A struktury, které obsahují čtyři nebo pět mastných kyselin (Obr. 23), indukují výrazně méně obranných imunitních odpovědí hostitele a mohou inhibovat silnou endotoxickou reakci vyvolanou hexa-acylovaným LPS (v závislosti na dávce). Tito antagonisté LPS byly izolováni z *Rhodobacter sphaeroides*, *Porphyromonas gingivalis* a *E. coli* u kmenu nesoucího mutaci v genu *msbB*.<sup>118</sup>



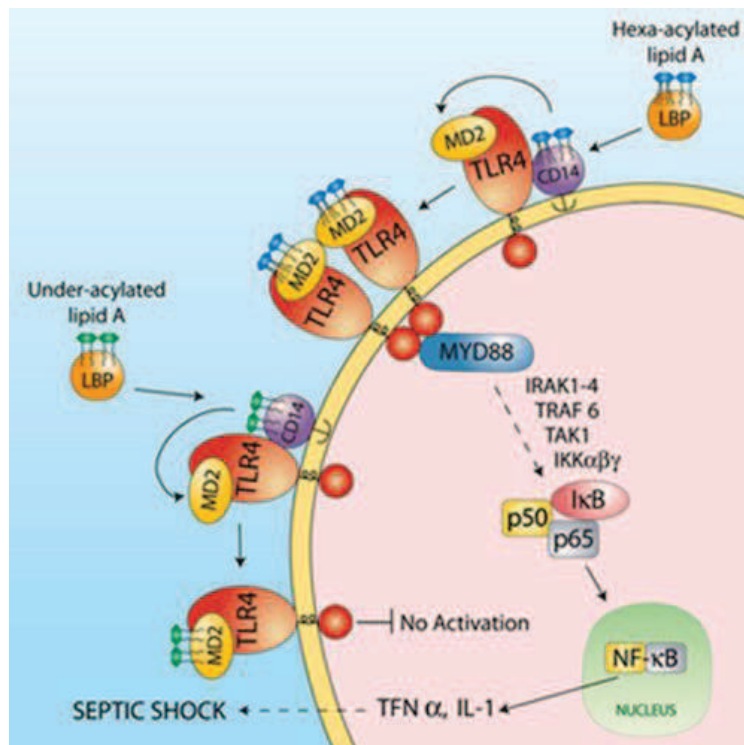
Obr. 23: Struktura agonisty hexa-acylovaný lipidu A z *E. coli* a antagonisty penta-acylovaný lipidu A z *R. sphaeroides*.<sup>114</sup>

Hlavní funkcí **O-antigenu** je generování jeho strukturální diversity díky laterálnímu přenosu genů.<sup>117</sup>

Schéma aktivace TLR4 receptorů lipidem A a následné produkce cytokinů je znázorněno na Obr. 24. Podle současného modelu je LPS dopraven k CD14 lektin-vázajícímu proteinu (LBP) a převeden k MD-2 za vzniku monomerního endotoxinu: MD-2 komplex, který váže a aktivuje TLR4.<sup>119,120</sup> K aktivaci TLR4 může ovšem při řádově vyšších množstvích endotoxinu dojít i bez LBP a CD14. Canonical lipid váže MD-2 a indukuje konformační změny, které vyvolávají TLR4 oligomerizaci a signalizaci.<sup>114</sup>

Underacylated lipid A využívá několika odlišných mechanismů, které blokují na LPS závislou aktivaci TLR4. Hlavní mechanismus je založen na přímé konkurenci mezi under-acylovaným LPS a hexa-acylovaným LPS o stejné vazebné místo na MD-2. Sekundární mechanismus

zahrnuje schopnost underacylated LPS: MD-2 komplexů inhibovat účinek hexa-acylovaného endotoxinu, MD-2 komplexů na TLR4.<sup>114</sup> Pochopení molekulárních mechanismů lipopolysacharidem indukované aktivace TLR4 je klíčové pro vývoj antagonistů terapeutických lipid A.



Obr. 24: Schéma aktivace TLR4 receptorů a následné produkce cytokinů.<sup>114</sup>

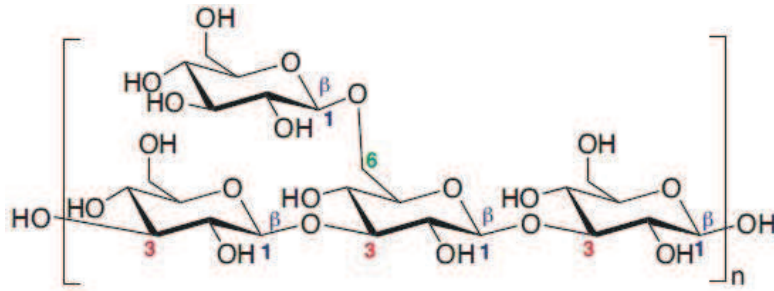
Tyto děje jsou žádoucí pro odstranění lokální infekce. Ovšem systémově způsobují těžké sepse a navíc různé mediátory a koagulační faktory mohou poškodit malé krevní cévy a vedou ke gramnegativnímu septickému šoku doprovázeném diseminovanou intravaskulární koagulací a multiorgánovým selháním.<sup>121, 122, 123</sup> Synteticky vytvořený LPS respektive lipid A sám o sobě způsobuje podobné spektrum účinků při injekční aplikaci do zvířat.<sup>117</sup>

Antagonisté LPS se staly potenciálními terapeutickými látkami k léčbě septického šoku.

V této diplomové práci jsme zvolili lipopolysacharid jako aktivátor TLR4 receptorů a následné produkci cytokinů a tím nabuzení vrozených obranných imunitních reakcí proti tkáni melanomu.

## 4.2. Laminarin.

Laminarin (strukturní vzorec na Obr. 25) je zásobní glukan (polysacharid glukózy) vyskytující se u hnědých řas. Ty ji využívají jako zásobní rezervu sacharidů podobně jako chrysolaminarin fytoplanktonu. Laminarin je vytvořen fotosyntézou a skládá se z lineárního beta(1-3)-glukanu s glukózou navázanou  $\beta(1-6)$ - vazbami.<sup>124</sup> Nejčastěji využívanou řasou pro výrobu laminarinu je *Laminaria digitata*.



Obr. 25: Strukturní vzorec laminarinu z *Laminaria digitata*.<sup>125</sup>

Jde o agonistu TLR-2, oligomer beta-glukanu. Váže se také na Dectin-1<sup>126</sup> a proteinu MyD88<sup>127</sup>. Kombinací aktivace TLR2 a Dec-1 je klíčová při produkci prozánětlivého faktoru TNF $\alpha$  a pro rozpoznání a odpověď na patogena.<sup>127</sup> Navázáním na Dectin-1 vlastně blokuje vazbu částic beta(1-3)-glukanu (jako je zymosan) na Dectin-1. Není tedy vhodné kombinovat při léčbě vícero typů oligomerů beta glukanu, jako je například kombinace zymosanu a laminarinu.<sup>127, 128</sup>

Aktivita laminarinu se liší v závislosti na isoformě jeho receptoru. Buňky exprimující isoformu lidského Dectinu-1b nereagují na laminarin, zatímco buňky exprimující isoformu lidského Dectinu-1a jsou velmi citlivé na laminarin.<sup>125</sup>

Rostliné polysacharidy vykazují mnoho prospěšných terapeutických vlastností. Tyto účinky vznikají v důsledku modulace vrozené imunity, přesněji řečeno regulací funkce makrofágů a hematopoézy makrofágů.<sup>129</sup> Výrazně zvyšují hladinu mRNA interleukinu IL-1 $\beta$  a tumor nekrotizujícího faktoru alfa (TNF- $\alpha$ ) a zvyšují DNA vazebnou aktivitu jaderného faktoru kappa-B u lidských monocytů.<sup>130</sup> Bylo také zaznamenáno, že od řas odvozené polysacharidy (jako je fukoidan Immunon, Paramylo a Immulina) zvyšují fagocytární a sekreční aktivitu makrofágů a indukují produkci reaktivních forem kyslíku (ROS), oxidu dusnatého (NO) a některých cytokinů (TNF- $\alpha$ , IL - 1, IL-6 a).<sup>129</sup>

Laminarin také významně zvyšuje uvolňování vápníku,  $H_2O_2$ , NO, MCP-1, VEGF, LIF a G-CSF se zvýšenou expresí STAT1, STAT3, c-Jun, c-Fos, a COX-2 u RAW-264 myši. Tyto výsledky naznačují, že laminarin má imunostimulační vlastnosti a posiluje imunitní reakce pomocí TF dráhy v makrofázích.<sup>131</sup>

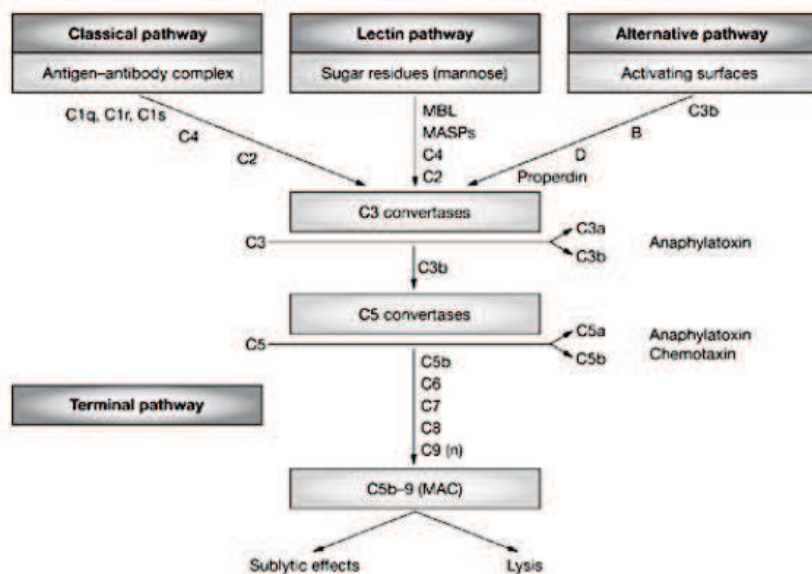
### 4.3. Mannan.

Mannan je agonistou Mannan binding lektinu (MBL), který patří mezi sekretované PRRs. Spouští kaskádu komplementu vedoucí až k lyzi buňky. Nachází se na buněčné stěně kvasnic *Saccharomyces cerevisiae*. Je složen z dlouhé kostry  $\alpha$ -1,6-manóz, ke kterým je na vedlejším řetězci navázána  $\alpha$ -1,6-manóza a  $\alpha$ -1,3-manóza.<sup>132</sup>

Imunitní systém považuje mannan za cizorodou látku. Normální zdravé buňky totiž nevystavují své manosové zbytky na svém povrchu. Zbytky kyseliny sialové chrání většinu savčích buněk před vazbou MBL.<sup>133</sup> Apoptotické buňky mají tendenci ztrácet své sialové zbytky kyseliny, což vede ke zvýšené expozici mannosy, N-acetylglukosaminu a fukosy.<sup>134</sup> Tyto cukerné zbytky zprostředkovávají odstranění takovýchto buněk v játrech.<sup>135</sup>

Bylo prokázáno, že se MBL váže přímo na buněčné linie v pozdější fázi apoptózy a také na váčky apoptotických a nekrotických buněk. To vyvolává MBL vazbu na calreticulin-receptor na povrchu fagocytů, který se zase spojuje s receptorem  $\alpha$ 2-makroglobulinu (CD-91). Tento komplex (calreticulin - CD91) zprostředkovává nezánnětlivé odstranění umírajících hostitelských buněk.<sup>133</sup>

Pouze po ztrátě ochranných povrchových zbytků kyseliny sialové v důsledku transformace buněk dojde k vystavení těchto manosových zbytků glykoproteinů.<sup>136</sup> Takto vystavené manosy pak stimulují MBL-receptor (manozu vázající lektinový receptor) a tím se spouští lektinová cesta aktivace komplementu vedoucí k vytvoření komplementového MAC komplexu a následně lýze transformované buňky (viz.schéma na obrázku č. 26).



Obr. 26: Schéma aktivace komplementu.<sup>137</sup>

Mannan slouží také jako fagocytární motiv pro fagocytující buňky (makrofágy, dendritické buňky, neutrofil). Interakce s odpovídajícím PRRs vede k fagocytoze mikroorganismu. Navázání mannanu na nádorové buňky vedlo k iniciaci imunitního ataku a likvidaci takto označených buněk.<sup>138</sup>

V posledních letech došlo také k oživení zájmu o rozvoj účinných nevirových nosičů pro vývoj DNA vakcín a genové terapie. Oxidovaný a redukováný mannan se v nich využívá jako nosič, díky kterému se léčivý protein dopraví do antigen prezentujících buněk, což vede k účinné indukci buněčných odpovědí.<sup>139</sup>

#### 4.4. N-formyl methioninové motivy.

N-formylmethionin je první aminokyselinou, která zahajuje syntézu proteinů u prokaryont.<sup>140</sup> U živočišných buněk začíná proteosyntéza methioninem. N-formylmethioninové motivy se při tvorbě tělu vlastních proteinů nevytvářejí a jsou proto považovány systémem jako cizorodé.

V organismu působí jako chemotaktická substance řídící migraci buněk. Fagocyty využívají N-formylmethionin (fMet) jako chemický signál k vystopování bakterií. Di a tripeptidy obsahující formylmethionin jsou chemoatraktanty, které velmi silně přitahují neutrofil, makrofágy, leukocyty, monocyty.<sup>141, 142, 143</sup>



Formyl peptidové receptory (FPRs) jsou malou skupinou transmembránových domén 7 krát prostupujících membránou. Řadí se do skupiny GPCRs (s receptory spřažené G-proteiny). U savců jsou exprimovány převážně na leukocytech a fagocytech a mají velký význam při hostitelké obraně a zánětu.<sup>144</sup>

Jsou známy 3 lidské FPRs (FPR1, FPR2/ALX, and FPR3). Společně sdílí významnou sekvenční homologii a jsou kódovány sdruženými geny (clustered genes). Společně se vážou na neobyčejně početnou a strukturálně rozmanitou skupinu agonistických ligandů, zahrnujících *N*-formylové a nonformylové peptidy rozmanitých kompozic, které lákají (chemoatrakce) a aktivují fagocyty. Dovedou rozeznat jakékoli formylové peptidy, tj. od jakékoli bakterie a mitochondrie. Aktivace formylpeptidových receptorů vede k zesílení buněčné migrace, fagocytózy a uvolnění prozánětlivých mediátorů. Slouží tedy k aktivaci jak signálních, tak fagocytárních receptorů.<sup>144</sup>

Při studiu strukturálních požadavků pro aktivaci signálních a fagocytárních receptorů bylo zjištěno, že formylové skupiny jsou pro aktivitu formylových atraktantů esenciální a methionin je rovněž pro aktivitu klíčový.<sup>141</sup> Přítomnost síry a delší řetězec zvyšují aktivaci těchto receptorů. Důležitým prvkem pro funkčnost těchto motivů je fenylalanin v pozici 3. Eliminování terminální karboxylové skupiny vede k tisícinásobnému snížení aktivity.

Studium *N*-formylmethioninových peptidů potvrdilo 3 nejnadějnější atraktanty: *N*-formyl-MET-LEU-PHE, *N*-formyl-NLE-LEU-PHE a *N*-formyl-MET-MET-MET-MET.<sup>145</sup>

V rámci této diplomové práce jsme při výzkumu používali *N*-formyl-MET-LEU-PHE (s K kvůli vazbě).

## 5. Cíle práce.

Na základě histologických analýz popsat vzniklé rozdílné nálezy mezi neléčeným a léčeným melanomem pomocí roztoku lipopolysacharidu.

Prokázat nebo vyloučit účinnost lipopolysacharidu při léčbě melanomu.

Prokázat nebo vyloučit účinnost laminarinu-BAM, mannanu-BAM, f-MLKK-BAM a jejich kombinací s roztokem lipopolysacharidu při léčbě melanomu B16-F10 a popsat histologické nálezy v jednotlivých skupinách.

## 6. Materiál and metodika.

### 6.1. Chemikálie

**RPMI 1640** (Sigma –Aldrich)

**Fetální bovinní sérum** – dále zkráceně FCS (Sigma-Aldrich)

**Antibiotická/ antimykotická směs** (PLL)

**Trypsin**

**EDTA**

**Trypanová modř**

**Laminarin** - zkráceně LAM (Sigma Aldrich)

**Mannan** - zkráceně M, z *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma-Aldrich)

**Lipopolysacharid** – dále zkráceně LPS, z *E.Coli* 0111:B4 (Sigma-Aldrich)

**BAM<sub>4000</sub>** - Biocompatible Anchor for Biomolecules, dale zkráceně BAM, Mw 4000 (NOF EUROPE-Grobbendonk, Belgium).

**f-MLFKK**- zkráceně F (Schafer-N, Copenhagen, Denmark)

## **6.2. Příprava roztoků používaných při terapii.**

### **6.2.1. Příprava 0,2mM roztoku laminarinu-BAM v PBS.**

Laminarin byl nejprve redukčně aminován: Laminarin rozpuštěný v prostředí octanu amonného byl redukován kyanoborohydridem sodným ( $\text{NaBH}_3\text{CN}$ ) při pH 7,5 a při teplotě 50°C po 5 dní. Poté byla tato směs přes noc při 4°C dialyzována s použitím MWCO 3500 dialyzačního střívka (Serva- Heidelberg, Germamy) proti PBS.

Navázání biokompatibilní kotvy pro buněčné membrány (*BAM*,  $M_w$  4000), která obsahuje jeden alifatický řetězec kyseliny olejové, bylo zprostředkováno navázáním na dříve vytvořenou aminoskupinu. Toto navazování se odehrávalo při pH 7,3 dle Kato et al.<sup>146</sup>

Během jedné hodiny při pokojové teplotě přitom zreagovala N-hydroxysukcinimid skupina (NHS) BAM kotvy s aminoskupinou laminarinu. Po dialýze provedené stejně, jak je výše uvedeno, byl získaný 0,2 mM roztok laminarinu-BAM v PBS před konečným užitím zmražen na -20°C.

### **6.2.2. Příprava 0,2mM roztoku laminarinu-BAM obsahujícího LPS.**

V 0,2 mM roztoku laminarinu-BAM v PBS, získaném v předchozím bodě, byl rozpuštěn LPS na výslednou koncentraci 0,5 mg/ml roztoku.

### **6.2.3. Příprava 0,2mM roztoku mannanu-BAM v PBS.**

Příprava této sloučeniny probíhala za stejných podmínek jako příprava laminarinu: tj. nejprve byl mannan redukčně aminován v prostředí octanu amonného a  $\text{NaBH}_3\text{CN}$ . Dále se tato směs dialyzovala užitím dialyzačního střeva o MWCO 3500 oproti PBS.

Kotva BAM se také navazovala stejným způsobem jako v případě laminarinu. Po dialýze provedené jak výše uvedeno, byl získaný 0,2 mM roztok mannanu-BAM v PBS před konečným užitím zmražen na -20°C.

#### **6.2.4. Příprava 0,2mM roztoku mannanu-BAM obsahujícího LPS.**

V 0,2 mM roztoku mannanu-BAM v PBS, získaném v předchozím bodě, byl rozpuštěn LPS na výslednou koncentraci 0,5 mg/ml roztoku.

#### **6.2.5. Příprava 0,5mM roztoku f-MLFKK-BAM v PBS.**

Navázání kotvy BAM na  $\alpha$ -aminoskupinu lysinu f-MLFKK proběhlo stejným postupem jako u laminarinu a mannanu. Vznikl 0,5mM roztok f-MLFKK-BAM v PBS.

#### **6.2.6. Příprava 0,5mM roztoku f-MLFKK-BAM obsahujícího LPS.**

V 0,5 mM roztoku f-MLFKK-BAM v PBS, získaném v předchozím bodě, byl rozpuštěn LPS na výslednou koncentraci 0,5 mg/ml roztoku.

#### **6.2.7. Příprava roztoku lipopolysacharidu (LPS).**

Byl připraven roztok LPS1 o koncentraci 10mg/ml PBS (pro první experiment) a roztok LPS2 o koncentraci 0,5 mg/ml PBS (na závěrečný experiment).

### **6.3. Laboratorní myši.**

Samice myši SPF C57BL/6 (Charles River Laboratories-Sulzfeld, Germany) byly chovány v plastických klecích s podestýlkou z dřevěných hoblin v místnosti s konstantní teplotou 22°C a vzdušnou vlhkostí 65%. Světelné podmínky místnosti byly nastaveny na 12hodin světla a 12hodin tmy. Během celého dne měly volný přístup ke sterilizované stravě i vodě.

#### **6.4. Kultivace buněčné linie buněk melanomu B16-F10.**

Buňky melanomu B16-F10 (American Type Culture Collection-ATCC, Manassas, VA) byly kultivovány v RPMI 1640 s 10% fetálním bovinním sérem (FCS) a antibiotiky (PLL) při teplotě 37°C ve vzdušné atmosféře obohacené 5% oxidem uhličitým.

Při dosažení předpokládané koncentrace buněk bylo slito kultivační medium a buňky byly třikrát promyty sterilním PBS, následně pak trypsinizační směsí (0,02% trypsin, 0,02% EDTA v PBS). Poté bylo 0,5ml této trypsinizační směsi přidáno k buňkám melanomu a inkubováno několik minut při 37°C. Před centrifugací byla tato suspenze buněk doplněna RPMI 1640 s 10% FCS na objem 20ml a dále centrifugována 10 minut při 150G a 4°C. Supernatant byl slit a buňky v peletu byly následně promyty v RPMI 1640 bez FCS séra, rozsuspendedovány v 5 ml RPMI 1640 a smíchány s trypanovou modří v poměru 1:1. Koncentrace živých buněk byla spočítána v Bürkerově komůrce a naředěna na  $4 \times 10^6$  buněk v ml RPMI 1640.

#### **6.5. Transplantace buněk melanomu B16-F10.**

Ve stáří 8 týdnů a přibližné váze 18-20g bylo jednotlivým myším transplántováno  $4 \times 10^5$  buněk melanomu B16-F10 rozsuspendedovaných v 0.1 ml RPMI bez FCS, injekcí subkutálně (s.c.) do oholené slabiny na pravém boku.

#### **6.6. Měření objemu nádorů.**

Rozměry nádorů byly měřeny u prvního pokusu kaliperem každý druhý den. Z těchto dat byl vypočten objem nádorové masy pomocí vzorce:  $V = \frac{\pi}{6} \times A \times B^2$ , kde A je největší rozměr nádoru (jeho délka) a B nejmenší (výška).<sup>147</sup>

#### **6.7. Měření teploty nádorů.**

Teplota nádorů byla měřena u prvního experimentu každý druhý den. U každé myši byla zaznamenána teplota nádoru těla na pravé části zad a teplota na levém boku myši. Hodnota naměřené teploty nádoru byla následně porovnávána s povrchovou teplotou těla myši (na levém boku). K měření byl použit bezdotykový teploměr určený pro hlodavce (IR Rodent Thermometer 153 IRB, Bioseb). Přikládal se na vzdálenost 2 mm od měřeného místa.

## 6.8. Vyhodnocení dat.

Takto získaná data byla vyhodnocena a graficky zpracována v programu Microsoft Excel. V případě histologické analýzy jednorázové a vícenásobné aplikace LPS byla procentuelní redukce objemu oproti kontrolní skupině vypočtena trojčlenkou.

## 6.9. Histologická studie.

### 6.9.1. Pitva, fixace vzorku, odvodnění a prosycení parafínem.

Melanomy byly extirpovány v časech specifikovaných u schémat histologických analýz po aplikované testované terapeutické látce. Tumory byly při pokojové teplotě fixovány v 4% neutrálním roztoku formaldehydu. Po 14 dnech fixace byly vzorky převedeny do parafínu nejprve vzestupnou alkoholovou řadou (při 20°C) a poté stoupající koncentrací parafínu (v termostatu při 55°C) viz. Tab. III.

Tab. III: Odvodnění a zalévání objektů do parafínu.

	Chemická látka	Doba působení	Poznámky
Odvodnění objektů	Promytí vodou	15min	při 20°C
	70% Ethanol	60min	při 20°C
	80% Ethanol	60min	při 20°C
	96% Ethanol	60min	Při 20°C
	96% Ethanol	60min	Při 20°C, nenechávat ve stejném ethanolu jako v předešlém kroku.
-----			
Postup zalévání objektů do parafínu	Aceton	60min	V digestoři při 20°C
	Xylen	60min	V digestoři při 20°C
	Xylen	90min	V digestoři při 20°C, nepoužívat stejný xylen jako v předchozím kroku.
	Xylen-parafin (1:3)	2-4h (přes noc)	V termostatu při 55°C.
	Xylen-parafin (1:1)	4-6h(do oběda)	V termostatu při 55°C
	Xylen-parafin (3:1)	8-12h(přes noc)	V termostatu při 54°C.
	Parafin 100%	24h	V termostatu při 54°C, pokaždé vyměnit za nový parafin.

### 6.9.2. Příprava bločků a krájení, odparafinování, barvení, odvodnění, montování histologických řezů.

Vzorek tkáně byl pinzetou přenesen do zalévací kazety a zalit rozehrátým 100% parafínem (Fluka, Chemika 76241, purum, pellets sp. 50-52°C). Vychlazené parafínové bločky obsahující studovanou tkáň byly nakrájeny na mikrotomu MEDISC 25SR- Leica SM2000R na 5µm silné řezy. Ty byly nataženy na vodní hladině o teplotě okolo 50°C, přeneseny na podložní sklíčka BAMED s.r.o. (MS7625011, České Budějovice) a odparafinovány xylenem a obarveny hematoxylin-eosinovou řadou, odvodněny vzestupnou alkoholovou řadou, karboxylenem, xylenem a zamontovány kanadským balzámem viz. Tab. IV.

Tab. IV: Průběh barvicího procesu.

	Chemická látka	Doba působení
Odfarinování	3x Xylen	à 5 min
	2x 96% Ethanol	à 5 min
	80% Ethanol	à 5 min
	70% Ethanol	à 5 min
	2x Destilovaná voda	5 min
Barvení	Hematoxylin	10min
	Tekoucí voda	10 min
	Eosin	5 min
	Voda	opláchnout
Montování	Dest. Voda	opláchnout
	70% Ethanol	opláchnout
	80% Ethanol	opláchnout
	2x 96% alkohol	opláchnout
	2x Karboxylen	1 min
	3x xylen	opláchnout
	Kanadský balzám	do zaschnutí

### 6.9.3. Pozorování řezů pod mikroskopem, fotodokumentace, histologická analýza.

K pozorování preparátů byl použit mikroskop Olympus BX51, tubus Olympus UCMAD3. Fotodokumentace byla pořízena pomocí této aparatury společně s digitálním fotoaparátem Olympus C5060-ADU a programem na zpracování fotografií QuickPHOTO Micro 3.0.

V tomto programu byla také provedena obrazová analýza fotografií. Na fotografiích histologických řezů byly označeny nekrózy a zbytky tumorózní tkáně. V programu Excel bylo vypočteno, jakou procentuelní část tvoří nekrózy.

## 6.10. In vivo experimenty a jejich histologická analýza.

### 6.10.1. Histologická analýza jednorázové a vícenásobné intratumorální aplikace LPS.

V tomto pokusu bylo použito 26 myší, které byly 12 dní po transplantaci melanomových buněk randomizovány do 3 skupin (do 2 skupin po 9, třetí kontrolní skupina byla pouze po 8). Prvním dvěma skupinám (skupiny A, B) byl intratumorálně aplikován roztok LPS dle schematu viz. Tab IV, třetí skupina byla vedena jako kontrolní (skupina C) a byl jí aplikován pufrovaný fyziologický roztok (PBS).

Rozměry nádorů byly měřeny při zahájení terapie (v čase 0), dále pak 1 den, 2 dny, 4 dny, 6 dní, 8 dní po zahájení léčby vždy před aplikací terapeutických látek.

Teploty nádorů byly měřeny v čase 0, poté v čase 6h, 12h, 24h po zahájení léčby vždy před aplikací testovaných chemikálií.

Po změření velikostí tumorů byla provedena ve dnech 1, 2, 4, 6 dní po zahájení terapie u jednotlivých skupin extirpace tumorů. Ve dnech 1, 2, 4 dny po zahájení terapie byla tato extirpace provedena po 2 myších z jednotlivých skupin, v 6. dni po zahájení léčby po jedné myši z jednotlivých skupin. Tyto tumory byly dále zpracovány histologickou analýzou. Zbývající přeživší myši byly ponechány na pozorování.

Tab. V: Schema experimentu s jednorázovou a vícenásobnou intratumorální aplikací LPS.

Skupina	Testovaná látka	Frekvence aplikace	Frekvence extirpace	Počet myší ve sk.
A	LPS o koncentraci 10mg/ml PBS	v čase 0, poté 2 dny, 4 dny, 6 dní po zahájení terapie	1, 2, 4, 6 dní po zahájení terapie	9
B	LPS o koncentraci 10mg/ml PBS	v čase 0	1, 2, 4, 6 dní po zahájení terapie	9
C	PBS	v čase 0	1, 2, 4, 6 dní po zahájení terapie	8



### 6.10.2. Histologická analýza vlivu roztoku laminarinu-BAM, f-MLFKK-BAM, mannanu-BAM, lipopolysacharidu a kombinace těchto látek na melanomové nádory.

V tomto pokusu bylo použito 44 myší, které byly dvanáctý den po transplantaci melanomových buněk randomizovány do 8 skupin (do 7 skupin po 6, v sedmé kontrolní skupině byly pouze dvě myši).

Při zahájení pokusu (v čase 0) bylo všem skupinám vpraveno i.t. 50 $\mu$ l testovaných látek dle schematu viz. Tab.VI. Skupina K byla považována jako kontrola.

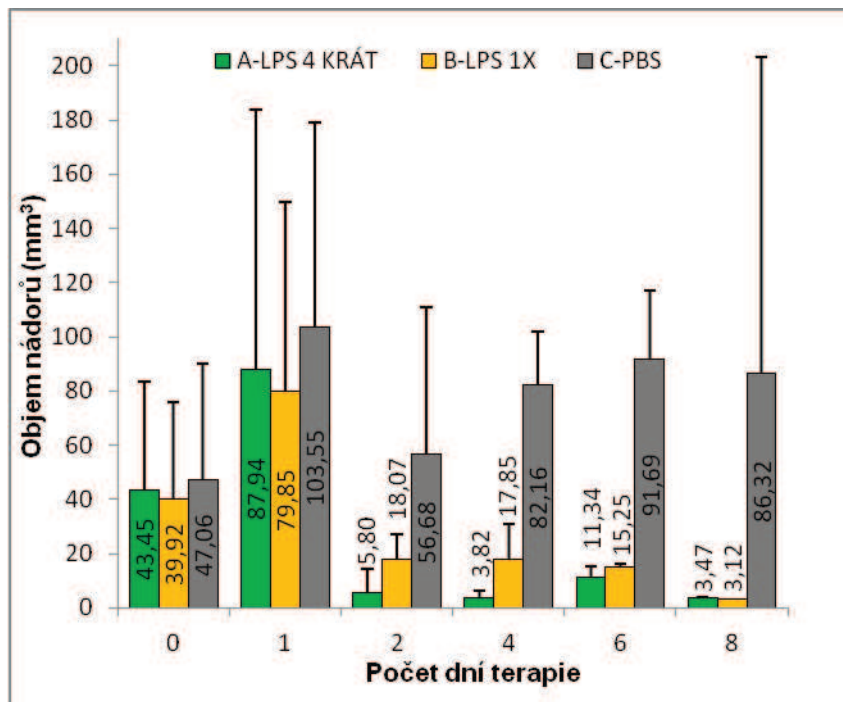
Rozměry nádorů byly měřeny při zahájení terapie (v čase 0), dále vždy před extirpací nádoru a to v hodinách 24h, 48h, 72h po aplikaci testovaných látek. Po změření velikostí tumorů byla vždy provedena extirpace tumorů 2 myši z jednotlivých skupin, pouze u skupiny K byla extirpace provedena pouze ve 24h a 48h po aplikaci PBS. Tyto tumory byly dále zpracovány histologickou analýzou.

Tab.VI: Schema experimentu studia laminarinu-BAM, f-MLFKK-BAM a mannanu-BAM, LPS a kombinace těchto látek na melanomové buňky.

Skupina	Testovaná látka	Frekvence extirpace	Počet myší ve sk.
LPS	LPS o koncentraci 0,5mg/ml PBS	24h, 48h, 72h	6
M	0,2 mM mannan-BAM <sub>4000</sub> v PBS	24h, 48h, 72h	6
M/LPS	0,2 mM mannan-BAM <sub>4000</sub> a 0,5mg LPS /ml PBS	24h, 48h, 72h	6
LAM	0,2 mM laminarin-BAM <sub>4000</sub> v PBS	24h, 48h, 72h	6
LAM/LPS	0,2 mM laminarin-BAM <sub>4000</sub> a 0,5mg LPS /ml PBS	24h, 48h, 72h	6
F	0,2 mM f-MLFKK-BAM <sub>4000</sub> v PBS	24h, 48h, 72h	6
F/LPS	0,2 mM f-MLFKK-BAM <sub>4000</sub> a 0,5mg LPS /ml PBS	24h, 48h, 72h	6
K	PBS	24h, 48h	2

## 7. Výsledky.

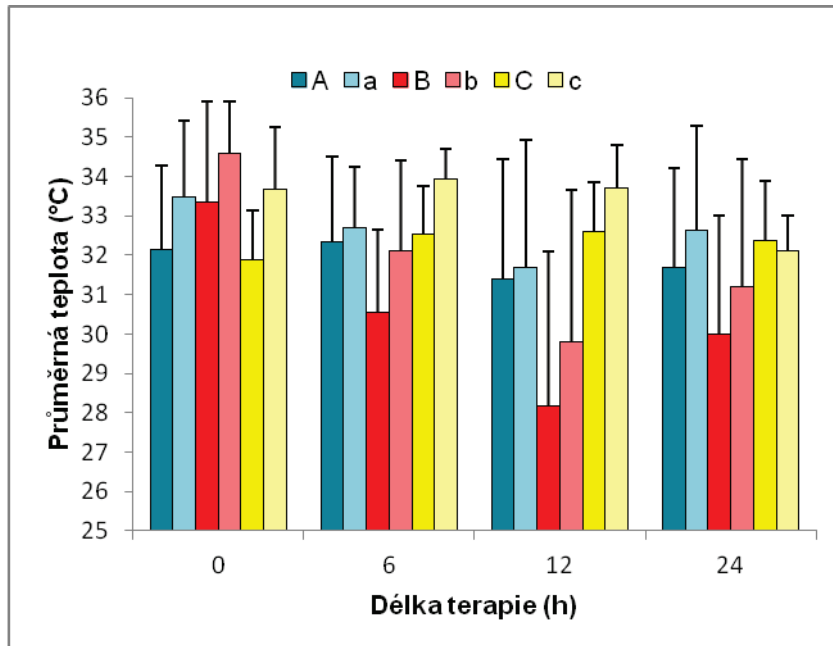
### 7.1. Histologická analýza jednorázové a vícenásobné intratumorální aplikace LPS.



Obr. 27 : Vyhodnocení vlivu jednorázové a vícenásobné aplikace LPS na objem tumoru (v mm<sup>3</sup>). Skupina A (10 mg lipopolysacharidu/ml PBS aplikováno ve dnech 0, 2, 4 a 6), B (10 mg lipopolysacharidu/ml PBS aplikováno 1x), C (PBS aplikováno 1x).

Jak uvádí Obr. 27 objem nádorů ve všech případech testovaných látek se nejprve zvětšil. Už 2 dny po zahájení léčby se ale jeho objem u obou způsobů aplikace LPS prudce redukoval. U LPS aplikovaného opakovaně došlo dokonce již za 2 dny po aplikaci k redukci na 10, 23% oproti objemu nádoru u kontrolní skupiny, u LPS aplikovaného pouze při zahájení terapie klesl na 31, 88% oproti objemu nádoru u kontrolní skupiny. Drobná reakce byla zaznamenána i u kontroly, její objem tumoru ale v dalších časových intervalech dále rostl. Rozdíl mezi vícenásobnou a jednorázovou aplikací LPS se nejprve zdál být značný viz. čtvrtý den terapie, v posledním testovaném dnu se ale jeho hodnoty téměř vyrovnaly. Nádorová masa vykazovala vysokou reaktivnost vůči LPS v obou případech, což je vidět zejména v posledním dni, kdy je nádor téměř zlikvidován (u LPS aplikovaného opakovaně redukce na 4,01% a u LPS aplikovaného pouze při zahájení terapie redukce na 3,61% oproti objemu tumoru v kontrole). Dokonce došlo k vyléčení jedné myši po čtyřnásobné aplikaci LPS, kdy

tato myš uhynula ve stáří 105 dnů bez nálezu tumoru nicméně s rozsáhlými mokvajícími ložisky v místech původního tumoru.



Obr. 28: Vyhodnocení vlivu jednorázové a vícenásobné aplikace LPS na teplotu tumoru a myši (v °C). Skupina A (10 mg LPS/ml PBS aplikováno ve dnech 0,2,4,a 6, teplota měřena na tumoru), a (10 mg LPS/ml PBS aplikováno ve dnech 0,2,4,a 6, teplota měřena na boku), B (10 mg LPS/ml PBS aplikováno 1x, teplota měřena na tumoru), b (10 mg LPS/ml PBS aplikováno 1x, teplota měřena na boku), C (PBS aplikováno 1x, teplota měřena na tumoru), c (PBS aplikováno 1x, teplota měřena na boku).

Na Obr. 28 můžete vidět vyhodnocení proměnlivosti teplot u jednotlivých skupin. Žádná tendence při pozorování změn teplot v reakci na aplikaci LPS nebyla prokazatelně pozorována. V několika případech došlo k prudkému poklesu teploty myši pod 29°C a následnému úhynu těchto myši.

#### Histologická analýza:

Při histologickém porovnání kontroly, jednorázové a vícenásobné aplikace LPS (viz. [příloha 3](#)) vidíte na fotografiích zejména značný rozdíl mezi strukturami nacházejícími se u kontroly (K) a jednotlivými aplikacemi LPS (LPS1x, LPS 4krát). Zatímco u kontroly je nádorová masa tvořena zejména melanocyty (m) u obou aplikací LPS došlo v reakci na tento roztok k dilataci cév (d), přicestování infiltrátu imunitních buněk a následné přeměně tumorové masy na masu nekrotickou (n). Na fotografii K v příloze 3 bych také ráda upozornila na zrna barviva melaninu (z). Na obou fotografiích aplikace LPS v příloze 3 je patrný také přechod, kdy u

LPS1x dochází zejména v okolí dilatovaných cév (d) k vytvoření nekrotické tkáně (n) a úbytku nádorové masy (znázorněno šipkami) a na fotografii LPS 4x krát je tato nekrotická masa už rovnoměrně rozprostřena přes celé nekrotické ložisko. Oba tyto nálezy se vyskytovaly napříč oběma skupinami léčenými roztokem LPS. Žádné významné histologické rozdíly mezi oběma skupinami aplikace LPS nebyly pozorovány. Všechny 3 fotografie jsou pro snadnější porovnání pořízeny v době 24h po aplikaci testovaných látek objektivem se zvětšením 10x. V další části jsem se zaměřila na typické histologické nálezy nekrotické tkáně nalezené u kontrolní skupiny viz. přílohy 4.1 a 4.2. Mezi základní rysy tumoru patří rychle a nekontrolovaně se dělicí buňky. Tento jev můžeme pozorovat velice snadno na fotografii A v příloze 4.1 (některé byly označeny pro názornost šipkami). Množství jader v jednotlivých buňkách i tvar buněk se díky narůstajícímu množství buněk a zmenšujícímu se prostoru rapidně liší (nálezy kulatých, spirálovitých i jinak nepravidelných buněk na fotografii B a při větším přiblížení na fotografii C v příloze 4.1). Nádor (m) pro získání většího prostoru k růstu prorůstá v případě fotografie B i do dalších vrstev kůže. Je vidět jak se postupně rozšiřuje mezi svalovými vlákny (s).

Při delší době růstu nádoru viz. příloha 4.2 je deformace buněk ještě více patrná viz. fotografie D. Na fotografii E můžete vidět jak zrovna dělicí se buňky v telofázi (znázorněno šipkami) tak také množství hnědě zbarvených zrn uvolněného barviva melaninu (z). Ty jsou patrná i v dalších fotografiích (příloha 4.1 fotografie A, C). Na fotografii F můžete pozorovat další znak rostoucího tumoru- neovaskularizaci. Vidíte množství nově vytvořených cév (c) rozličných rozměrů od jemných kapilár až po větší cévy.

V příloze 5 (5.1, 5.2, 5.3, 5.4) jsem se zaměřila na typické nálezy v histologických řezech po léčbě lipopolysacharidem (LPS). Na fotografiích A, B, C, D, E, F (příloha 5.1, 5.2) můžete pozorovat buněčný infiltrát při zvětšení objektivu 40x (fotografie A, B, C) a při zvětšení objektivu 100x (fotografie D, E, F). Nacházejí se v něm jak polymorfonukleáry (neutrofilů (n)), tak i kulatojaderné buňky ((fagocyty (f), lymfocyty (l)).

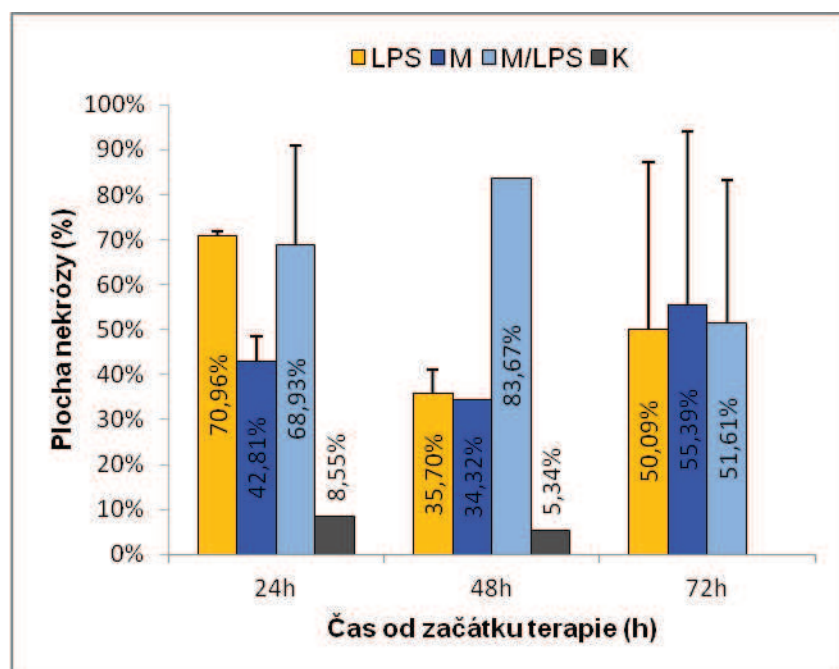
Na fotografii G (příloha 5.3) je patrná rozsáhlá nekróza vzniklá následkem aplikace LPS. Uvolněná zrna melaninu (z) z destruovaných melanocytů jsou patrná zejména ve středu nekrózy. Nalevo nahoře vidíte také dilatované cévy (d). Ty jsou také dobře patrné při větším zvětšení na fotografii H. Na této fotografii je nahoře vlevo vidět nově vznikající nekróza (n), kdy jsou patrné i poprašky zbytků jader granulocytů po vzniklém boji infiltrátu imunitního systému hostitele a nádorových struktur (označeno šipkou). Na fotografii I je vidět druhý způsob vzniku nekrotické tkáně (první způsob- nekróza vzniklá nejprve v okolí cév a poté se

rozšiřující masou tumoru viz. fotografie F příloha 4.2.), kdy dochází k vytvoření granulomatózního lemu obklopujícího celou nádorovou masu, v nejbližším okolí začíná infiltrát destruovat tuto masu a vzniká zde nekróza kruhovitého typu postupně se rozšiřující ke středu tumoru. To je vidět i na fotografii L ve větším zvětšení (příloha 5.4).

Na fotografiích J, K v příloze 5.4 je vidět jak masivní tato infiltrace je. Nejde o stovky buněk ale o řádově větší počty. Infiltrát se volně prolíná s nově vzniklou nekrózou (narůžovělá barva).

Celkově je možno konstatovat, že zatímco u nádorů v kontrolní (PBS) skupině je možno pozorovat dělicí se buňky a prorůstající tumor skrz další vrstvy kůže, LPS se projevuje vznikem nekrotické tkáně, vznikem granulomatózního lemu a nahromaděním buněčného infiltrátu. Tyto změny nejsou ovlivněny vícenásobnou aplikací LPS.

## 6. 2. Histologická analýza vlivu roztoku laminarinu-BAM, f-MLFKK-BAM, mannanu-BAM, lipopolysacharidu a kombinace těchto látek na melanomové nádory.

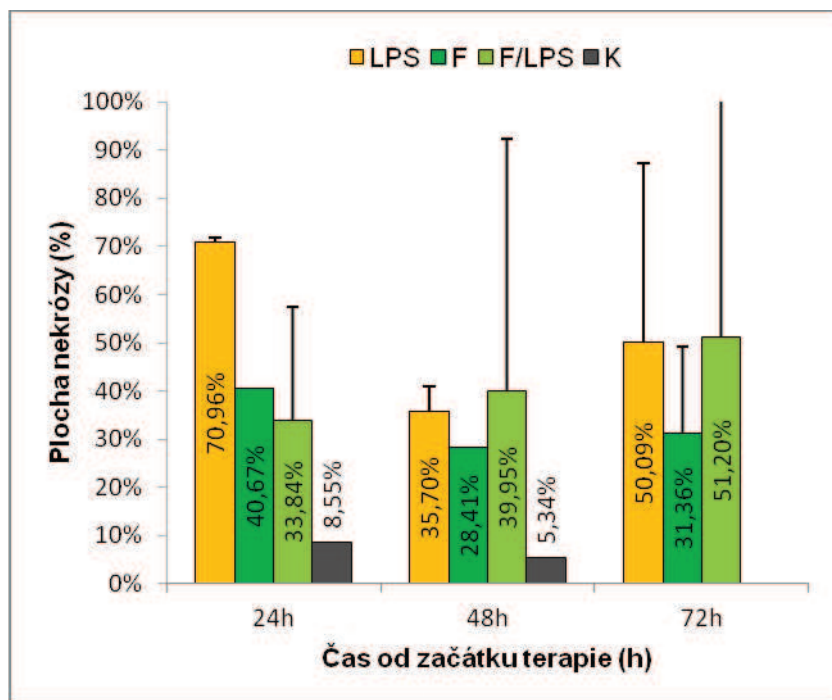


Obr. 29: Vyhodnocení vlivu aplikovaných látek na rozsah nekrózy (v %) 24h, 48h a 72h po terapii. Skupina LPS (0,5 mg lipopolysacharidu/ml PBS), M (0,2 mM manan-BAM v PBS), M/LPS (0,2 mM f-MLF a 0,5 mg lipopolysacharidu/ml PBS), K (PBS).

Na Obr. 29 je znázorněno grafické vyhodnocení procentuelního množství nekrózy vytvořené jako následek aplikace lipopolysacharidu (LPS), manannu-BAM (M) a jejich vzájemné kombinace v rozmezí od 24h do 72h po aplikaci. Z prvního sloupečku lze vidět, že aplikace **LPS** vyvolala poměrně rychlou destrukci tumoru. Už ve 24h po aplikaci bylo 71% melanomu přeměněno na nekrotickou tkáň. Toto dokládá i fotografie v příloze č. 6 LPS2, kde můžete pozorovat rozsáhlou nekrózu (n) a také dilatované cévy (d) u tumoru dole. Tato jednorázová aplikace LPS se ve vzrůstajícím časovém horizontu projevovala nekrozami v mírně větším rozsahu (v 48h nekróza dosahovala 35,7%; v 72h 50%).

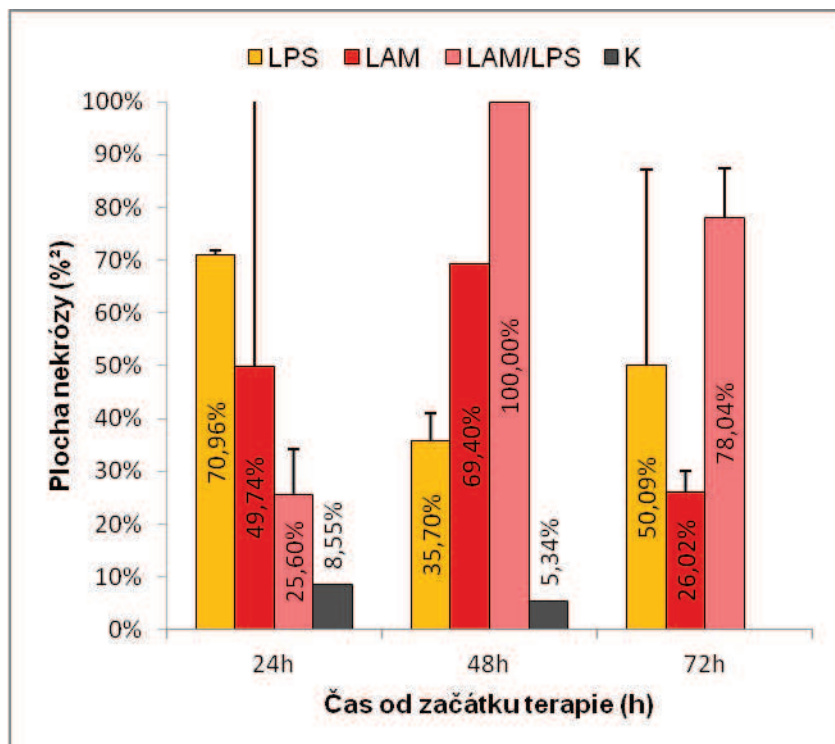
Účinek mannanu-BAM (**M**) by se dal oproti tomu popsat zprvu jako pozvolný, kdy zpočátku způsobila 43% destrukci tumoru, s přibývajícím dobou po aplikaci M pozvolna narůstala jeho účinnost na 55%.

Kombinace mannanu s lipopolysacharidem (**M/LPS**) ve 24h po aplikaci způsobila přibližně 69% redukci melanomu. V 48h po aplikaci už dokonce vykazovala značnou synergii, kdy z 35,7% nekrotizace tkáně při působení LPS a 34,3% nekrotizace při aplikaci mannanu vzrostla až na 83,7%. V 72h po aplikaci se pohybovaly všechny 3 testované vzorky na přibližně stejné hladině účinnosti (mírně nad 50%). V kontrolní skupině (**K**) byl rozsah nekroz minimální.



Obr. 30 : Vyhodnocení vlivu aplikovaných látek na rozsah nekróz (v %) 24h, 48h a 72h po terapii. Skupina LPS (0,5 mg lipopolysacharidu/ml PBS), F (0,5mM roztoku f-MLFKK-BAM v PBS), F/LPS (0,5mM roztoku f-MLFKK-BAM v LPS), K (PBS).

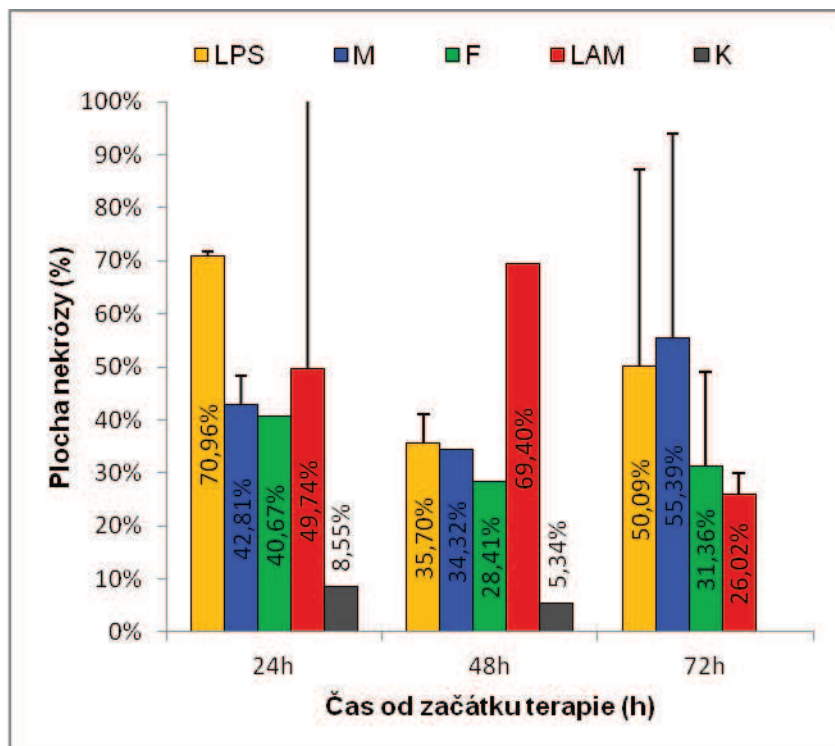
Obr. 30 udává vliv LPS, f-MLFKK-BAM a směsi těchto látek. Nebyl pozorován výrazný aditivní efekt u kombinace fMLFF-BAM (F) s LPS (**F/LPS**). Došlo jen k mírnému navýšení účinnosti LPS ve spojení s F v 48h, 72h po aplikaci. U kombinace F/LPS je patrná tendence navyšovat se vzrůstajícím časem plynule svoji účinnost (z 33,8% při 24h přes 39,9% při 48h až na 51,3% při 72h po aplikaci).



Obr. 31: Vyhodnocení vlivu aplikovaných látek na rozsah nekrózy (v %) 24h, 48h a 72h po terapii. Skupina LPS (0,5 mg lipopolysacharidu/ml PBS), M (0,2 mM manan-BAM v PBS), M/LPS (0,2 mM f-MLF a 0,5 mg lipopolysacharidu/ml PBS ), K (PBS).

Na Obr. 31 je vidět výrazný aditivní efekt při kombinaci LPS s laminarinem-BAM (**LPS/LAM**) a to jak v 48h (35,7% u LPS; 69,4% u LAM; 100% u LAM/LPS) tak i po 72h po aplikaci (50% u LPS; 26% u LAM; 78% u LAM/LPA). Ve 48h po aplikaci došlo dokonce ke kompletnímu vymizení tumoru, což dokládá i fotografie LAM/LPS 4 v příloze 10.





Obr. 32: Vyhodnocení vlivu aplikovaných látek na rozsah nekróz (v %) 24h, 48h a 72h po terapii monokomponentovými látkami. Skupina LPS (0,5 mg lipopolysacharidu/ml PBS), M (0,2 mM manan-BAM v PBS), F (0,5 mM f-MLF v PBS), K (PBS).

Pro porovnání účinku monosložkových látek byl sestaven Obr. 32 a detailní histologická analýza je uvedena v příloze 6, 7, 8. Analýza byla provedena v postupných časových intervalech:

#### 24h po aplikaci monosložkových testovaných látek

V prvním časovém úseku Obr. 32 je zřejmé, že **LPS** způsobil největší plošnou redukci nádorových struktur (71%). Dále pak testované látky vyvolávaly nekrózu sestupně u terapeutických látek u **LAM** (49,7%), následován přibližně ve stejné účinnosti **M** (42,8%) a **F** (40,7%). Kontrola (**K**) vykazovala mizivou redukci nádorových struktur (8,5%).

Jak je uvedeno v příloze 6, v zánětlivém infiltrátu u všech testovaných látek převažovaly ve 24h po léčbě polymorfonukleáry nad kulatobuněčnou zánětlivou celulizací.

Náhlednout na nekrotická ložiska je možno v příloze 6, kde je vidět jak vzniklé nekrózy (n) tak také zbylé melanocyty (m) u všech testovaných látek a dilatované cévy (d) na fotografiích K1, M2, F1. Granulační lem (gr) lze dobře pozorovat na fotografiích LPS2, LAM1.

#### **48h po aplikaci monosložkových testovaných látek**

Ve 48hod po aplikaci testovaných látek se pořadí účinnosti vyvolání infiltrace a následné nekrózy tumoru změnilo (Obr 32, druhý časový úsek) Největší účinnost vykazoval tentokrát **LAM** (69,4%), až poté **LPS** (35,7%). Obdobnou účinnost měly další agonisté TLRs **M** (34,3%) a **F** (28,4%). V kontrolní skupině opět nedošlo k výrazné redukci tumoru (nekroza pouhých 5,3%).

Histologická analýza (příloha 7) ukázala, že u **M** převládaly neutrofilny nad kulatobuněčným infiltrátem. Ve všech ostatních látkách **F**, **LAM**, **LPS** začala převažovat kulatobuněčná infiltrace. V této příloze lze vidět opět nekrozy (n) i zbytky tumoru (m) na všech fotografiích a také velké dilatované cévy (d) na fotografiích F4. Pozornost zasluhuje, že u **LAM** na fotografiích **LAM4** je celé nekrotické ložisko prokrvácené.

#### **72h po aplikaci monosložkových testovaných látek**

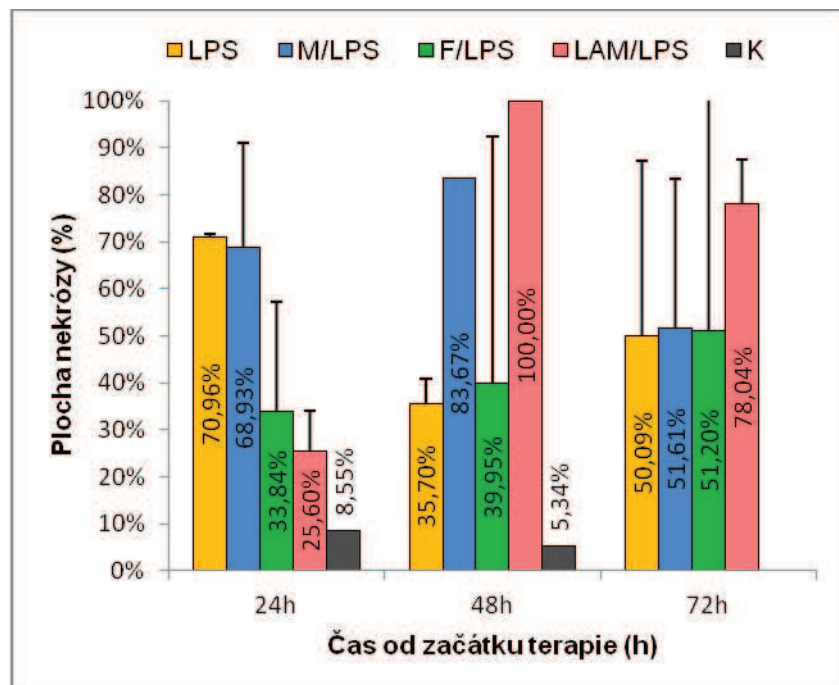
Ve 72hod po aplikaci se jevil **LPS** (50,1%) podobně účinný jako **M** (55,4%). **F** (31,4%) účinkoval v podobné síle jako **LAM** (26%) (Obr. 32, třetí časový úsek). Kontrola nebyla bohužel z důvodu nedostatku materiálu ve 72h testována.

Z histologické analýzy (příloha 8) vyplývá, že u všech testovaných monokomponentních látkách se při 72h stále držela převaha kulatobuněčné infiltrace nad neutrofilny, vyjma **LAM**, kde se překvapivě změnil poměr infiltrátu ve prospěch neutrofilů.

Na histologických fotografiích v této příloze je kromě jiného (popisky nekrozy, melanocytů a dilatovaných cév) třeba upozornit na pravděpodobné místo vpichu u fotografie **LPS6** a následnou okolní nekrozu. Dále na fotografii **M6** a **LAM6** je vidět široký granulační lem. Fotografie **LAM6** byla přidána zejména z důvodu velice hezky rozpoznatelného rozvolněného edemátózního vaziva (e). Tento jev se vyskytoval poměrně hojně zejména u testovaných látek 72 h po jejich aplikaci a v příložené příloze monosložkových testovaných látek je můžete pozorovat také na histologických fotografiích v příloze 6 (fotografie **LPS2** a **LAM1**), příloze 7 (fotografie **LPS3**).

Pokud tedy vzájemně porovnáme jednotlivé monosložkové testované látky, projevuje se **LPS**, **LAM** i **M** jako velice účinné terapeutické látky s vysokou schopností likvidovat tumor (v rozmezí 43%-71% přeměny tumoru na nekrotickou masu). **F** se ve svých tumor-likvidačních

účincích tolik neprojevil (přibližně 30% destrukce nádorové tkáně). Při zkoumání infiltrátu napříč skupinami nebyly pozorovány u jednotlivých testovaných látek žádné výraznější rozdíly v kvalitativním buněčném složení tohoto infiltrátu.



Obr. 33 Vyhodnocení vlivu aplikovaných látek na rozsah nekros (v %) 24h, 48h a 72h po terapii kombinovanými látkami. Skupina LPS (0,5 mg lipopolysacharidu/ml PBS), M/LPS (0,2 mM manan-BAM a 0,5 mg lipopolysacharidu/ml PBS), F/LPS (0,5 mM f-MLF a 0,5 mg lipopolysacharidu/ml PBS), LAM/LPS (0,2 mM laminarin-BAM a 0,5 mg lipopolysacharidu/ml PBS, K (PBS).

Pro porovnání účinku látek kombinovaných s LPS byl sestaven Obr. 33 a detailní histologická analýza je uvedena v příloze 9, 10 a 11. Analýza byla provedena v postupných časových intervalech:

#### **24h po aplikaci kombinovaných testovaných látek s LPS**

Po aplikaci kombinované léčby s LPS jeví největší účinnost 24h po léčbě kombinace **M/LPS** (68,9%). Terapie v kombinaci **LAM/LPS** (25,6%) i **F/LPS** (34,8%) se projeví jako účinné (34,8%), přestože ve srovnání s M/LPS nezpůsobovaly tak velkou přeměnu tumoru na nekrotickou tkáň viz. Obr. 33.

Jak vyplývá z histologické analýzy (příloha 9), v zánětlivém infiltrátu u M/LPS i u F/LPS bylo nalezeno více neutrofilů, naopak u LAM/LPS převažoval kulatobuněčný infiltrát. Ve

všech případech byly v infiltrátech přítomny bazofily. V této příloze vidíte na fotografii M/LPS2 široký granulační lem. Také na fotografii F/LPS1 pokrývá granulační infiltrát velkou část fotografie.

#### **48h po aplikaci kombinovaných testovaných látek s LPS**

Při kombinaci **LAM/LPS** ve 48h po terapii nebyly nalezeny žádné nádorové struktury, považujeme tedy nekrózu za úplnou (Obr. 33). Dále pak dle tohoto grafu nejúčinněji redukoval nádor **M/LPS** (83,7%). Kombinace **F/LPS** nebyla tak účinná (23,1%).

U **LAM/LPS** je přítomné pouze ložisko tvořené edematózním vazivem a drobnými hemoragiemi viz. příloha 10. V infiltrátu **LAM/LPS** se nachází převážně kulatobuněčné buňky, ojediněle s bazofily. Nekróza na fotografii M/LPS3 v téže příloze pokrývá většinu plochy a zbytek v podstatě tvoří rozvolněné edematózní vazivo. Na obrázku F/LPS4 si povšimněte velkého pásu edematózního vaziva, dále také toho, že u velká plocha ložiska je nahrazena hemoragiemi a dilatovanými cévami.

#### **72h po aplikaci kombinovaných testovaných látek s LPS**

V 72h po terapii byl opět nejúčinnější **LAM/LPS** (78%) a jak je vidět na Obr. 33 byly ostatní terapeutické látky na podobné hladině účinnosti (kolem 50%). V příloze 11 můžete vidět výskyt jak nekroz (n) tak také melanocytů (m). Na fotografii **LAM/LPS5** vidíte granulační lem (gr) a také že ložisko je velmi hemoragické. Při zkoumání infiltrátu se prokázal nález jak kulatobuněčných buněk tak bazofilů u všech testovaných látek.

U kombinovaných testovaných látek se účinnost redukce pohybovala ve většině případů v rozmezí mezi přibližně 30% až 80%. Nejlepší výsledky vykazovala kombinace **LAM/LPS**. Jako nejslabší se opět projevila kombinace s **F**. V infiltrátu opět nebyly pozorovány napříč skupinami u jednotlivých testovaných látek žádné výraznější rozdíly v kvalitativním buněčném složení tohoto infiltrátu.

## 8. Diskuze.

Již od konce 19. století je studováno použití usmrcených bakterií, případně z nich izolovaných PAMPs pro terapii nádorových onemocnění. Dr. Coley používal inaktivované bakterie *Streptococcus pyogenes* a *Serratia marcescens* (tzv. Coleyův toxin). Vzhledem k nestandardnosti přípravy tohoto terapeutika, vysokým vedlejším účinkům (horečky) a nedostatečné dokumentaci výsledků byla tato terapie v šedesátých letech minulého století opuštěna.<sup>148, 149</sup>

Následně se touto problematikou začala zabývat velká spousta vědců. Na principu využití bakterií a jejich extraktů se jim podařilo vyvinout BCG vakcíny. Po objevení BCG vakcíny došlo k jejímu úspěšnému použití i v protinádorové léčbě. V případě karcinomu močového měchýře je tato terapie používána dodnes.<sup>150</sup>

Koncem, dvacátého století byly popsány molekuly rozpoznatelné vrozenou imunitou (PAMPs, DAMPs) a jejich receptory. Další intenzivní studium bylo zaměřeno především na studium použití agonistů Toll-like receptorů při léčbě rakoviny. Tato cesta sice byla správná, ale pouhá aplikace těchto motivů do těla pacienta nemohla dosáhnout tak velkého účinku, neboť imunitní systém byl sice nabuzen, ale jeho reakce nebyla směřována ke konkrétní rakovinné buňce.

Tohoto zacílení imunitního ataku na úrovni vrozené imunity jsme docílili ukotvením ligandů fagocytárních receptorů (laminarin, mannan, f-MLFCK) na membrány nádorových buněk. Došlo k redukci nádorového růstu. Tento efekt byl však dramaticky zesílen současnou aplikací TLR4 ligandu – LPS. Jak jsme prokázali pomocí histologie a průtokové cytometrie, LPS způsobil mohutnou zánětlivou infiltraci, která ve spojení s instalací ligandů fagocytárních receptorů na povrch nádorových buněk vedla k redukci nádorového růstu až k úplné eliminaci nádorů.

Úkolem této studie byla detailní histologická analýza působení LPS, ligandů fagocytárních receptorů a jejich kombinace. V prvním experimentu byl použit LPS o vysoké koncentraci. Jeho účinky byly sice mohutné, ale paralelní in vitro studie (výsledky neukázány) nám

přinesla zjištění, že vyšší koncentrace LPS vykazují přímé toxické účinky. Navíc docházelo často k úhynům myší. Proto v druhém experimentu byly použity koncentrace, které jsou netoxické a působí tedy jen na úrovni imunitní stimulace.

Aditivní efekt, pozorovaný v této diplomové práci byl na histologické úrovni nejlépe pozorovatelný v kombinaci laminarin-BAM a LPS (silná destrukce tumoru a přeměna v nekrotickou tkáň), což odpovídá zjištěným poznatkům o vhodnosti kombinace LPS a kotvených ligandů fagocytárních receptorů<sup>138</sup>. Mírný aditivní efekt byl pozorován i u kombinace f-MLF-KK-BAM s LPS. Jen přechodnou aditivitu jsme pozorovali u manan-BAM ve spojení s LPS, což přikládáme zejména malému množství vzorků v jednotlivých podskupinách. S největší pravděpodobností tedy došlo ke zkreslení dat, kdy se častokrát vzniklá nekrotizace jednoho vzorku ve svých hodnotách velice lišila od druhé, což je patrné i ze směrodatných odchylek. Výrazný aditivní efekt ligandů fagocytárních receptorů (na nádorové buňky kovalentně vázaný Zymosan A) a LPS popsala na histologické úrovni rovněž Kovářová<sup>151</sup>.

Pro následující studium bych velice doporučovala při histologických studiích aplikovat imunologické značení infiltrovaných imunitních buněk příslušnými antigeny. Pak by již potřeba odborné konzultace s patologickým oddělením nemocnice nebyla nutná. Pro studium z histologických preparátů bych poté doporučila histologickou analýzu barevných fází v programu QuickPhoto Micro. Tím by se toto zpracování velice urychlilo. Navíc by se dal vcestovalý infiltrát (nabuzené buňky imunitního systému) přesně kvantifikovat a případně lokalizovat v rámci melanomu (jestli se vyskytují pouze v blízkosti cév nebo přímo atakují ligandy fagocytárních receptorů značené nádorové buňky). Takto zpracované histologické vzorky by se staly hlavním jasně prokazatelným důkazem účinku léčby.

Přestože jsme použili v závěrečném experimentu nižší koncentraci LPS, doporučovala bych jeho náhradu jiným stimulem TLR, neboť LPS je pro člověka velmi toxický a tudíž klinicky nepoužitelný.<sup>120,121,122,123</sup> V úvahu připadá analog LPS (MPLA), dále pak Imiquimod (agonist TLR7), Resiquimod (TLR 7, 8). Tyto látky by pak bylo vhodné kombinovat s kotvenými ligandy fagocytárních receptorů (laminarin, manan, f-MLF) jak odpovídá nejen naší studii<sup>138</sup>, ale jak je i ve shodě s představou spolupráce ligandů signálních a fagocytárních receptorů.<sup>152</sup>

## 9. Závěr.

Histologickými fotografiemi byly zdokumentovány typické rysy melanomu i typické nálezy po terapii lipopolysaccharidem.

Pomocí kaliperu i histologickými fotografiemi byla prokázána účinnost lipopolysacharidu jako imunitního stimulans při léčbě melanomu.

Při testování ligandů fagocytárních receptorů (kotvený laminarin, mannan a f-MLFKK) samotných i v kombinaci s LPS byla prokázána vysoká redukce nádorových struktur a také vzájemný aditivní efekt. Při kombinaci LPS s kotveným laminarinem (laminarin-BAM) v 48h po aplikaci došlo k úplné redukci tumoru a přeměně na nekrotickou tkáň.

Na základě histologických studií byl popsán „mechanismus“ uvedených procesů. Testované látky nabudí imunitní systém, dojde k masivní infiltraci zejména granulocytů a následné destrukci nádorových struktur a jejich přeměně na nekrotickou tkáň. Po určitém čase (první nálezy již v 48h po aplikaci, nejčastěji ovšem v 72h po aplikaci) dochází k odtranění těchto nekrotických a jejich nahrazení edematózním vazivem.

Byla optimalizována metoda zpracování histologických fotografií porovnáním procentuelního zastoupení imunitní reakcí vytvořené nekrózy oproti zbývající nádorové mase.

Bylo navrženo několik zdokonalení pro obdobné následující studie.

## 10. Seznam použité literatury.

- 1) **Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR.** *Novotvary 2010* [online]. 2010, 264 p. [cit. 2014-03-24]. ISBN 978-80-7472-034-5. Dostupné z: <http://www.uzis.cz/publikace/novotvary-2010>
- 2) **Bandarchi B. et al.** From Melanocyte to Metastatic Malignant Melanoma. *Derm. Res. Practice.* 2010, vol. 2010, Article ID 583748, p. 1-8. DOI: 10.1155/2010/583748.
- 3) **Sulaimon S.S. and Kitchell B.E.** The biology of melanocytes. *Vet. Dermatol.* 2003, vol. 14, issue 2, p. 57-65. DOI: 10.1046/j.1365-3164.2003.00327.x.
- 4) **Santiago-Walker A. et al.** Melanocytes: From Morphology to Application. *Skin. Pharm. Phys.* 2009, vol. 22, issue 2, p. 114-121. DOI: 10.1159/000178870.
- 5) **Jimbow K. et al.** Some aspects of melanin biology: 1950-1975. *J. Invest. Dermatol.* 1976, vol. 67, no.1, p. 72-89. Dostupné z: <http://www.nature.com/jid/journal/v67/n1/pdf/5616997a.pdf>
- 6) **Kollias N. et al.** Photoprotection by melanin. *J. Photochem. Photobiol. Bio.* 1991, vol.9, p. 135–160.
- 7) **Brenner M. and Hearing V.J.** The Protective Role of Melanin Against UV Damage in Human Skin. *Photochem. Photobiol.* 2008, vol. 84, p. 539–549.
- 8) **Gilchrest B. A. et al.** The pathogenesis of melanoma induced by ultraviolet radiation. *N. Engl. J. Med.* 1999, vol.340, p. 1341–1348.
- 9) **Halder R. M. and Bridgeman-Shah S.** Skin cancer in African Americans. *Cancer* 1995, vol.75, p. 667–673.
- 10) **Kaidbey K.H. et al.** Photoprotection by melanin:A comparison of black and Caucasian skin. *J. Am. Acad. Dermatol.* 1979, vol. 1, p. 249–260.
- 11) **Gloster H. M. and Neal K.** Skin cancer in skin of color. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2006, vol. 55, p.741–760; quiz 761–764.
- 12) **Kobayashi, N. et al.** Supranuclear melanin caps reduce ultraviolet induced DNA photoproducts in human epidermis. *J. Invest. Dermatol.* 1998, vol.110, p. 806–810.
- 13) **Szabo G. et al.** Racial differences in the fate of melanosomes in human epidermis. *Nature* 1969, vol. 222, p. 1081–1082.
- 14) **Bustamante J. et al.** Role of melanin as a scavenger of active oxygen species. *Pigment. Cell. Res.* 1993, vol.6, p. 348–353.
- 15) **de Winter S. et al.** Solar-simulated skin adaptation and its effect on subsequent UV-induced epidermal DNA damage. *J. Invest. Dermatol.* 2001, vol.117, p. 678–682.
- 16) **Zmudzka B.Z. et al.** Photobiologic role of melanin distribution in the epidermis. *J. Photochem. Photobiol. B.* 2006, vol. 84, p. 231.



- 17) **Yamaguchi Y. et al.** Human skin responses to UV radiation: pigment in the upper epidermis protects against DNA damage in the lower epidermis and facilitates apoptosis. *Faseb. J.* 2006, vol. 20, p. 1486–1488.
- 18) **Kvam E. and Tyrrell R.M.** The role of melanin in the induction of oxidative DNA base damage by ultraviolet A irradiation of DNA or melanoma cells. *J. Invest. Dermatol.* 1999, vol. 113, p. 209–213.
- 19) **Korytowski W. et al.** Photoinduced generation of hydrogen peroxide and hydroxyl radicals in melanins. *Photochem. Photobiol.* 1987, vol. 45, p. 185–190.
- 20) **Marrot L. et al.** The human melanocyte as a particular target for UVA radiation and an endpoint for photoprotection assessment. *Photochem. Photobiol.* 1999, vol. 69, p. 686–693.
- 21) **Chedekel M.R.** Photochemistry and photobiology of epidermal melanins. *Photochem. Photobiol.* 1982, vol. 35, p. 881–885.
- 22) **Chedekel M.R. et al.** Photodestruction of pheomelanin. *Photochem. Photobiol.* 1977, vol.26, p. 651–653.
- 23) **Chedekel M.R. et al.** Photodestruction of pheomelanin: role of oxygen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1978, vol. 75, p.5395–5399.
- 24) **Hill H.Z. and Hill G.J.** UVA, pheomelanin and the carcinogenesis of melanoma. *Pigment. Cell. Res.* 2000, vol. 13, no. 8, p. 140–144.
- 25) **Cesarini J.P.** Photo-induced events in the human melanocytic system: Photoaggression and photoprotection. *Pigment. Cell. Res.* 1988, vol.1, p. 223–233.
- 26) **Takeuchi S. et al.** Melanin acts as a potent UVB photosensitizer to cause an atypical mode of cell death in murine skin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004, vol. 101, p. 15076–15081.
- 27) **Streutker C.J. et al.** From L. Malignant melanoma in a patient with oculocutaneous albinism. *J. Cutan. Med. Surg.* 2000, vol. 4, p. 149–152.
- 28) **Elder D.E. et al.** Acquired melanocytic nevi and melanoma: the dysplastic nevus syndrome. *Pathol. Malign. Melanoma* 1981,p. 185- 216.
- 29) **Elder D.E. et al.** The early and intermediate precursor lesions of tumor progresrennension in the melanocytic system: common acquired nevi and atypical (dysplastic) nevi. *Semin. Diagn. Pathol.* 1993, p.1018- 1035.
- 30) **McKinnell R.G. et al.** *The biological basis of cancer.* New York: Cambridge University Press, 1998, xix, 378 p. ISBN 05-215-9695-5.
- 31) **Tsao H. et al.** The transformation rate of moles (melanocytic nevi) into cutaneous melanoma: a population-based estimate. *Arch. Dermatol.* 2003, p. 139282- 139288.

- 32) **Greene M.H.** Genetics of cutaneous melanoma and nevi. *Mayo. Clin. Proc.* 1997, pp. 72467-72474.
- 33) **Mooi W.J.** The dysplastic naevus. *J. Clin. Pathol.* 1997, p. 50711- 50715.
- 34) **Tucker M.A. et al.** Clinically recognized dysplastic nevi: a central risk factor for cutaneous melanoma. *JAMA.* 1997, p. 2771439- 2771444.
- 35) **Katsambas A. and Nicolaidou E.** Cutaneous malignant melanoma and sun exposure: recent developments in epidemiology. *Arch. Dermatol.* 1996, vol. 132, no.4, p. 444–450.
- 36) **Whiteman D.C. and Green A.C.** Melanoma and sun exposure: where are we now? *Intern. J. Dermatol.* 1999, vol. 38, no. 7, p. 481–489.
- 37) **Borovansky J. and Riley P.A.** *Melanins and Melanosomes: biogenesis, physiological and pathological functions*, Wiley-Blackwell, 2011, 429p., p. 383-393, ISBN 978-3-527-32892-5
- 38) **Ferlay J. et al.** Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *Europ. J. Cancer.* 2013, vol. 49, no.6, p. 1374-1403. DOI: 10.1016/j.ejca.2012.12.027.
- 39) **Ayadurai K.** Histology of skin. *Malay. J. Dermatol.* [online]. 2010, vol 24, p. 6-8 [cit. 2014-03-25]. Dostupné z: [http://www.dermatology.org.my/pdf/19RCD\\_Abstract%20Book%20A.pdf](http://www.dermatology.org.my/pdf/19RCD_Abstract%20Book%20A.pdf)
- 40) **Young B., Lowe J., Steevens A., Heath J.** *Wheater's functional histology: a text and colour atlas*. 5th ed. Churchill Livingstone: Elsevier, 2006, 450 p. ISBN 04-430-6850-X.
- 41) **Smoller B. R.** Histologic criteria for diagnosing primary cutaneous malignant melanoma. *Modern Pathology.* 2006, vol. 19, p. 34-40.
- 42) **Clark W.H. et al.** The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Research.* 1969, vol. 29, no. 3, p. 705–727.
- 43) **Reed R.J.** *New Concepts in Surgical Pathology of the Skin*. New York, NY, USA: Wiley; 1976. Acral lentiginous melanoma; p. 89–90.
- 44) **Guerry D.P. et al.** Lessons from tumor progression: the invasive radial growth phase of melanoma is common, incapable of metastasis, and indolent. *J. Invest. Dermatol.* 1993, vol. 100, no. 3, p. 342–345.
- 45) **Breslow A.** Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann. Surgery.* 1970, vol. 172, no. 5, p. 902–908.
- 46) **Clemente C.G. et al.** Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer.* 1996, vol. 77, no. 7, p. 1303–1310.
- 47) **Byers H.R. and Bhawan J.** Pathologic parameters in the diagnosis and prognosis of primary cutaneous melanoma. *Hematol./Oncology Clin. North America.* 1998, vol. 12, no. 4, p. 717–735.

- 48) **Mraz-Gernhard S. et al.** Prediction of sentinel lymph node micrometastasis by histological features in primary cutaneous malignant melanoma. *Arch. Dermatol.* 1998, vol. 134, no. 8, p. 983–987.
- 49) **Bataille V.** Genetics of familial and sporadic melanoma. *Clin. Exp. Dermatol.* 2000, vol. 25, no. 6, p. 464–470.
- 50) **Teicher B. A.** *Tumor models in cancer research.* Totowa, New Jersey: Humana Press Inc., 2002, xv, 690 p. ISBN 08-960-3887-4.
- 51) **Brunson K. et al.** Selection and altered properties of brain-colonising metastatic melanoma. *Nature* 1978, p. 543-546.
- 52) **Brunson K. and Nicolson G.L.** Selection of malignant melanoma variant cell lines for ovary colonization. *J. Supramo. Struct.* 1979, p. 517-528.
- 53) **Dithmar S. et al.** A new technique for implantation of tissue culture melanoma cells in a murine model of metastatic ocular melanoma. *Melanoma Res.* 2000, p. 2-8.
- 54) **Rusciano D. et al.** Murine models of liver metastasis. *Invas. Metastasis* 1994, vol.14, p. 349-361.
- 55) **Innate Immunity Review.** In: *InvivoGen* [online]. 2012 [cit. 2014-03-26]. Dostupné z: <http://www.invivogen.com/review-innate-immunity>
- 56) **Medzhitov R. et al.** A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, 1997, vol. 388, no. 6640, p. 394-397.
- 57) **Toll-Like Receptors Review.** In: *InvivoGen* [online]. 2012 [cit. 2014-03-26]. Dostupné z: <http://www.invivogen.com/review-tlr>
- 58) **TLR-NLR pathways poster.** In: *InvivoGen* [online]. 2012 [cit. 2014-03-26]. Dostupné z: <http://www.invivogen.com/docs/TLR-NLR-signaling.pdf>
- 59) **Choe J. et al.** Crystal structure of human Toll-like receptor 3 (TLR3) ectodomain. *Science* 2005, vol. 309, p. 581-585.
- 60) **Nishiya T. and DeFranco A.L.** Ligand-regulated chimeric receptor approach reveals distinctive subcellular localization and signaling proper ties of the Toll-like receptors. *J. Biol. Chem.* 2004, vol. 279, no. 18, p. 19008-19017.
- 61) **Jurk M. et al.** Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848. *Nat. Immunol.* 2002, vol. 3, no. 6, p. 499.
- 62) **Heil F. et al.** Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 2002, vol. 303, no. 5663, p. 1526-1529.

- 63) **Zhang D. et al.** A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science*. 2004, vol. 303, p. 1522-1526.
- 64) **Lauw FN. et al.** Of mice and man: TLR11 (finally) finds profilin. *Trends Immunol.* 2005, vol. 26, no. 10, p. 509-511.
- 65) **Ozinsky A. et al.** The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *PNAS USA* 2000, vol. 97, no. 25, p. 13766-13771.
- 66) **Miyake K.** Innate recognition of lipopolysaccharide by CD14 and toll-like receptor 4-MD-2: unique roles for MD-2. *Int. Immunopharmacol.* 2003, vol. 3, no. 1, p. 119-128.
- 67) **Adachi O. et al.** Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. *Immunity* 1998, vol.9, no. 1, p. 143-150.
- 68) **Sun L. et al.** The TRAF6 ubiquitin ligase and TAK1 kinase mediate IKK activation by BCL10 and MALT1 in T lymphocytes. *Mol. Cell.* 2004, vol. 14, no. 3, p. 289-301.
- 69) **Keating SE. et al.** IRAK-2 participates in multiple Toll-like receptor signaling pathways to NFκB via activation of TRAF6 ubiquitination. *J. Biol. Chem.* 2007, vol. 282, p. 33435-33443.
- 70) **Multi-TLR Agonists: Potential for Therapeutic Success Review.** In: *InvivoGen* [online]. 2013 [cit. 2014-03-26]. Dostupné z: <http://www.invivogen.com/review-multi-prr-ligands>
- 71) **Horng T. et al.** The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll-like receptors. *Nature* 2002, vol. 420, no. 6913, p. 329- 333.
- 72) **Yamamoto M. et al.** Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. *J. Immunol.* 2002, vol. 169, no. 12, p. 6668-6672.
- 73) **Heil F. et al.** Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science*, 2004, vol. 303, no. 5663, p. 1526-1529.
- 74) **Yamamoto M. et al.** TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat. Immunol.* 2003, vol. 4, no. 11, p.1144-1150.
- 75) **Doyle S. et al.** IRF3 mediates a TLR3/TLR4-specific antiviral gene program. *Immunity* 2002, vol. 17, no. 3, p. 251-263.
- 76) **Schoenemeyer A. et al.** The interferon regulatory factor, IRF5, is a central mediator of toll-like receptor 7 signaling. *J. Biol. Chem.* 2005, vol. 280, no. 17, p. 17005-17012.
- 77) **Costa-Mattioli M. and Sonenberg N.** RAPPING production of type I interferon in pDCs through mTOR. *Nature Immunol.* 2008, vol. 9, p. 1097-1099.

- 78) **Rakoff-Nahoum S. and Medzhitov R.** Toll-like receptors and cancer. *Nat. Revs. Cancer* 2009, vol. 9, p. 57- 63.
- 79) **Hennessy E. et al.** Targeting Toll-like receptors: emerging therapeutics? *Nat. Rev. Drug Discov.* 2010, vol. 9, no. 4, p. 293-307.
- 80) **TLR Ligands: Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs).** In: *InvivoGen* [online]. 2012 [cit. 2014-04-02]. Dostupné z: <http://www.invivogen.com/innate-immunity-pamps>
- 81) **Girard R. et al.** Lipopolysaccharides from *Legionella* and *Rhizobium* stimulate mouse bone marrow granulocytes via Toll-like receptor 2. *J. Cell. Sci.* 2003, vol.116, p. 293-302.
- 82) **Ozinsky A. et al.** The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000, vol. 97, p. 13766- 13771.
- 83) **Yu L. et al.** Endogenous toll-like receptor ligands and their biological significance. *J. Cell. Mol. Med.* 2010, vol. 14, no. 11, p. 2592-2603. doi:10.1111/j.1582-4934.2010.01127.x
- 84) **Kurt-Jones E.A. et al.** Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat. Immunol.* 2000, vol. 1, p. 398–401.
- 85) **Rassa J.C. et al.** Murine retroviruses activate B cells via interaction with Toll-like receptor 4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002, vol. 99, p. 2281–2286.
- 86) **Roelofs M.F. et al.** Identification of small heat shock protein B8 (HSP22) as a novel TLR4 ligand and potential involvement in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J. Immunol.* 2006, vol. 176, p. 7021–7027.
- 87) **Smiley S.T. et al.** Fibrinogen stimulates macrophage chemokine secretion through toll-like receptor 4. *J. Immunol.* 2001, vol. 167, p. 2887–2894.
- 88) **Guillot L. et al.** Cutting edge: the immunostimulatory activity of the lung surfactant protein-A involves Toll-like receptor 4. *J. Immunol.* 2002, vol. 168, p. 5989–5992.
- 89) **Johnson G.B. et al.** Receptor-mediated monitoring of tissue well-being via detection of soluble heparan sulfate by Toll-like receptor 4. *J. Immunol.* 2002, vol. 168, p. 5233–5239.
- 90) **Roelofs M.F. et al.** Identification of Small Heat Shock Protein B8 (HSP22) as a Novel TLR4 Ligand and Potential Involvement in the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *J. Immunol.* 2006, vol. 176, no. 11,p. 7021-7027.
- 91) **Diebold S.S. et al.** Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* 2004, vol. 5, no.303, issue.5663, p.1529-1531.
- 92) **Heil F. et al.** Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 2004, vol. 5, no. 303, issue 5663, p. 1526-1529.

- 93) **Alter G. et al.** Single-Stranded RNA Derived from HIV-1 Serves as a Potent Activator of NK Cells. *J. Immunol.* 2007, vol. 178, p. 7658-7666.
- 94) **Hornung V. et al.** Sequence-specific potent induction of IFN- $\alpha$  by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nat. Med.* 2005, vol. 11, no. 3, p. 263-270.
- 95) **Ballas Z.K. et al.** Induction of NK activity in murine and human cells by CpG motifs in oligodeoxynucleotides and bacterial DNA. *J. Immunol.* 1996, vol. 157, no. 5, p. 1840-1845.
- 96) **Krug A. et al.** Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN- $\alpha$ / $\beta$  in plasmacytoid dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 2001, vol. 31, no. 7, p.2154-2163.
- 97) **Verthelyi D. et al.** Human peripheral blood cells differentially recognize and respond to two distinct CPG motifs. *J. Immunol.* 2001, vol.166, no. 4, p. 2372-2377.
- 98) **Hartmann G. and Krieg A.M.** Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human primary B cells. *J. Immunol.* 2000, vol. 164, no. 2, p. 944-953.
- 99) **Krieg A.M. et al.** CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 1995, vol. 374, no. 6522, p. 546-549.
- 100) **Hartmann G. et al.** Delineation of a CpG phosphorothioate oligodeoxynucleotide for activating primate immune responses in vitro and in vivo. *J. Immunol.* 2000, vol. 164, no. 3, p. 1617-1624.
- 101) **Gürsel M. et al.** Differential and competitive activation of human immune cells by distinct classes of CpG oligodeoxynucleotide. *J. Leukoc. Biol.* 2002, vol.71, no. 5, p. 813-820.
- 102) **Vollmer J. et al.** Characterization of three CpG oligodeoxynucleotide classes with distinct immunostimulatory activities. *Eur. J. Immunol.* 2004, vol. 34, no. 1, p. 251-262.
- 103) **Koblansky A. A. et al.** Recognition of Profilin by Toll-like Receptor 12 Is Critical for Host Resistance to *Toxoplasma gondii*. *Immunity.* 2013, vol. 38, no. 1, p. 119–130.  
doi:10.1016/j.immuni.2012.09.016.
- 104) **Rakoff-Nahoum S. and Medzhitov R.** Regulation of spontaneous intestinal tumorigenesis through the adaptor protein MyD88. *Science* 2007, vol. 317, no. 5834, p. 124-127.
- 105) **Querec T. et al.** Yellow fever vaccine YF-17D activates multiple dendritic cell subsets via TLR2, 7, 8, and 9 to stimulate polyvalent immunity. *J. Exp. Med.* 2006, vol. 203, no. 2, p. 413-424.
- 106) **Saint F. et al.** T helper 1/2 lymphocyte urinary cytokine profiles in responding and nonresponding patients after 1 and 2 courses of bacillus Calmette-Guerin for superficial bladder cancer. *J. Urol.* 2001, vol. 166, no. 6, p. 2142-2147.
- 107) **Galluzzi L. et al.** Trial Watch: Experimental Toll-like receptor agonists for cancer therapy. *Oncoimmunology* 2012, vol. 1, no. 5, p. 699–716.

- 108) **Gabrilovich D.I. et al.** Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat. Rev. Immunol.* 2012, vol.12, no. 4, p. 253-268.
- 109) **Lindau D. et al.** The immunosuppressive tumour network: myeloid-derived suppressor cells, regulatory T cells and natural killer T cells. *Immunology* 2013, vol.138, no. 2, p. 105-115.
- 110) **Kidner T.B. et al.** Combined intralesional Bacille Calmette-Guérin (BCG) and topical imiquimod for in-transit melanoma. *J. Immunother.* 2012, vol. 35, no. 9, p. 716-720.
- 111) **Kasturi S.P. et al.** Programming the magnitude and persistence of antibody responses with innate immunity. *Nature* 2011, vol. 470, no. 7335, p. 543-547.
- 112) **Bryant C.E. et al.** The molecular basis of the host response to lipopolysaccharide. *Nature Rev. Microbiol.* 2010, vol. 8, p. 8-14. DOI: 10.1038/nrmicro2266.
- 113) **Meng F. and Lowell C.A.** Lipopolysaccharide (LPS)-induced Macrophage Activation and Signal Transduction in the Absence of Src-Family Kinases Hck, Fgr, and Lyn. *J. Exp.Med.*1997, vol. 185, no. 9, p. 1661-1670. DOI: 10.1084/jem.185.9.1661.
- 114) **Agonistic and Antagonistic Effects of LPS on TLR4 Review.** In: *InvivoGen* [online]. 2007 [cit. 2014-03-28]. Dostupné z: <http://www.invivogen.com/review-lps-trl4>
- 115) **Zähringer U. et al.** In: *Endotoxin in Health and Disease*. Marcel Dekker, Inc.; New York: 1999. pp. 93–114.
- 116) **Rietschel E.T. et al.** Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB Journal.* 1994, vol. 8, no. 2, p. 217-225.
- 117) **Reatz CH. R. H. and Whitfield CH.** Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* 2002, vol. 71, p. 635-700.
- 118) **Coats S.R. et al.** MD-2 mediates the ability of tetra-acylated and penta-acylated lipopolysaccharides to antagonize Escherichia coli lipopolysaccharide at the TLR4 signaling complex. *J. Immunol.* 2005, vol. 175, no. 7, p. 4490-4498.
- 119) **Teghanemt A. et al.** Molecular basis of reduced potency of underacylated endotoxins. *J. Immunol.* 2005, vol. 175, no. 7, p. 4669-4676.
- 120) **Visintin A. et al.** Pharmacological inhibition of endotoxin responses is achieved by targeting the TLR4 coreceptor, MD-2. *J. Immunol.* 2005, vol. 175, no. 10, p. 6465-6472.
- 121) **Esmon C.T.** Regulation of blood coagulation. *Biochim. Biophys. Acta.* 2000, vol.1477, no.1-2, p. 349-360.
- 122) **van Deuren M. et al.** Update on meningococcal disease with emphasis on pathogenesis and clinical management. *Clin. Microbiol. Rev.* 2000, vol. 13, no. 1, p. 144-166.

- 123) **Bernard G.R. et al.** Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N. Engl. J. Med.* 2001, vol. 344, p. 699–709.
- 124) **Rioux L.E. et al.** Structural characterization of laminaran and galactofucan extracted from the brown seaweed *Saccharina longicuris*. *Phytochemistry* 2010, vol. 71, p. 1586–1595.
- 125) **Laminarin: Soluble beta-glucan from Laminaria digitata -  $\beta(1\rightarrow3, 1\rightarrow6)$ -glucan.** In: *InvivoGen* [online]. 2013 [cit. 2014-04-04]. Dostupné z: <http://www.invivogen.com/laminarin>
- 126) **Gantner Bn. et al.** Dectin-1 mediates macrophage recognition of *Candida albicans* yeast but not filaments. *EMBO J.* 2005, vol. 24, no. 6, p. 1277-1286.
- 127) **Brown Gd. et al.** Dectin-1 is a major beta-glucan receptor on macrophages. *J.Exp. Med.* 2002, vol. 196, no.3, p. 407-412.
- 128) **Gersuk Gm. et al.** Dectin-1 and TLRs permit macrophages to distinguish between different *Aspergillus fumigatus* cellular states. *J. Immunol.* 2006, vol. 176, no.6, p. 3717-3724.
- 129) **Schepetkin I.A. and Quinn M.T.** Botanical polysaccharides: Macrophage immunomodulation and therapeutic potential. *Int. Immunopharmacol.* 2006, vol. 6, p. 317–333.
- 130) **Pugh N. and Pasco D.S.** Characterization of human monocyte activation by a water soluble preparation of *Aphanizomenon flos-aquae*. *Phytomedicine* 2001, vol.8, p. 445–453.
- 131) **Lee J.Y. et al.** Immunostimulatory Effect of Laminarin on RAW 264.7 Mouse Macrophages. *Molecules* 2012, vol. 17, no. 12, p. 5404-5411.  
DOI: 10.3390/molecules17055404.
- 132) **Rayner J. C. and Munro S.** Identification of the MNN2 and MNN5 Mannosyltransferases. *The Journal Of Biological Chemistry* [online]. 1998, vol. 273, no. 41, p. 26836–26843 [cit. 2014-03-28]. Dostupné z: <http://www.jbc.org/content/273/41/26836.full.pdf+html>
- 133) **Ogden C.A. et al.** C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells. *J. Exp. Med.* 2001, vol. 194, p. 781–795.
- 134) **Ruzittu M. et al.** Modulation of cell surface expression of liver carbohydrate receptors during in vivo induction of apoptosis with lead nitrate. *Cell Tissue Res.* 1999, vol. 298, p. 105–112.
- 135) **Dini L.** Recognizing death: liver phagocytosis of apoptotic cells. *Eur. J. Histochem.* 2000, vol. 44, p.217–227.
- 136) **Muramatsu T. et al.** High-mannose glycopeptides from embryonal carcinoma cells. *J. Biochem.* 1980, vol. 88, p. 685–688.



- 137) **Cook H. T. and Botto M.** Mechanisms of Disease: the complement system and the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Nature Clin. Pract. Rheumatol.* 2006, vol. 2, no. 6, p. 330-337. DOI: 10.1038/ncprheum0191.
- 138) **Janotová et al.** The Use of Anchored Agonists of Phagocytic Receptors for Cancer Immunotherapy: B16-F10 Murine Melanoma Model. *PLoS ONE* 2014, vol. 9, no. 1: e85222. doi:10.1371/journal.pone.0085222
- 139) **Ueno K.** The mannan of *Candida albicans* lacking  $\beta$ -1,2-linked oligomannosides increases the production of inflammatory cytokines by dendritic cells *Med. Mycol.* 2013, vol. 51, no. 4, p. 385-395, doi: 10.3109/13693786.2012.733892
- 140) **Adams J. M. and Capecchi M. R.** N-formylmethionyl-sRNA as the initiator of protein synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1966, vol.55, no. 1, p. 147–155. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC285768/>
- 141) **Schiffman E. et al.** N-formylmethionyl peptides as chemoattractants for leukocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1975, vol. 72, p. 1059-1062.
- 142) **Palmer R.M.J. et al.** Chemokinetic activity of arachidonic and lipoxygenase products on leukocytes of different species. *Prostaglandins*, 1980, vol. 20, p. 411-414.
- 143) **Rasmusson B.J. et al.** The N-formyl methionyl peptide, formyl-methionyl-leucyl phenylalanine (fMLF) increases the lateral diffusion of complement receptor 1 (CR1/CD35) in human neutrophils; a causative role for oxidative metabolites? *Biosci. Rep.* 1996, vol. 16, no. 5, p. 391-404.
- 144) **Ye R. D. et. al.** International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIII. Nomenclature for the Formyl Peptide Receptor (FPR) Family. *Pharmacological Reviews.* 2009, vol. 61, no. 2, p. 119-161. DOI: 10.1124/pr.109.001578.
- 145) **Showell H.J. et al.** The structure-activity relations of synthetic peptides as chemotactic factors and inducers of lysosomal secretion for neutrophils. *J. Exp.Medicine.* 1976, vol. 143, no. 5, p. 1154-1169. DOI: 10.1084/jem.143.5.1154.
- 146) **Kato et al.** Rapid protein anchoring into the membranes of mammalian cells using oleyl chain and poly(ethylene glycol) derivatives. *Biotechnol. Prog.* 2004, vol. 20, p. 897-904.
- 147) **Inaba M.et al.** Evaluation of response rates to various antitumor agents of human gastric tumours implanted in nude mouse. *Jpn. J. Cancer Res.* 1986, vol. 77, no. 2, p. 190-196.
- 148) **Coley W.B.** Contribution to the knowledge of sarcoma. *Ann. Surg.* 1891, vol. 14, p.199–220.
- 149) **Coley W.B.** The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas: with a report of ten original cases. *Am. J. Med. Sci.* 1893, vol. 105, p. 487–511.
- 150) **Babjuk M. et al.** EAU Guidelines on Non-Muscle-Invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder. *Eur. Urology.* 2008, vol. 54, no. 2, p. 303-314. DOI: 10.1016/j.eururo.2008.04.051.

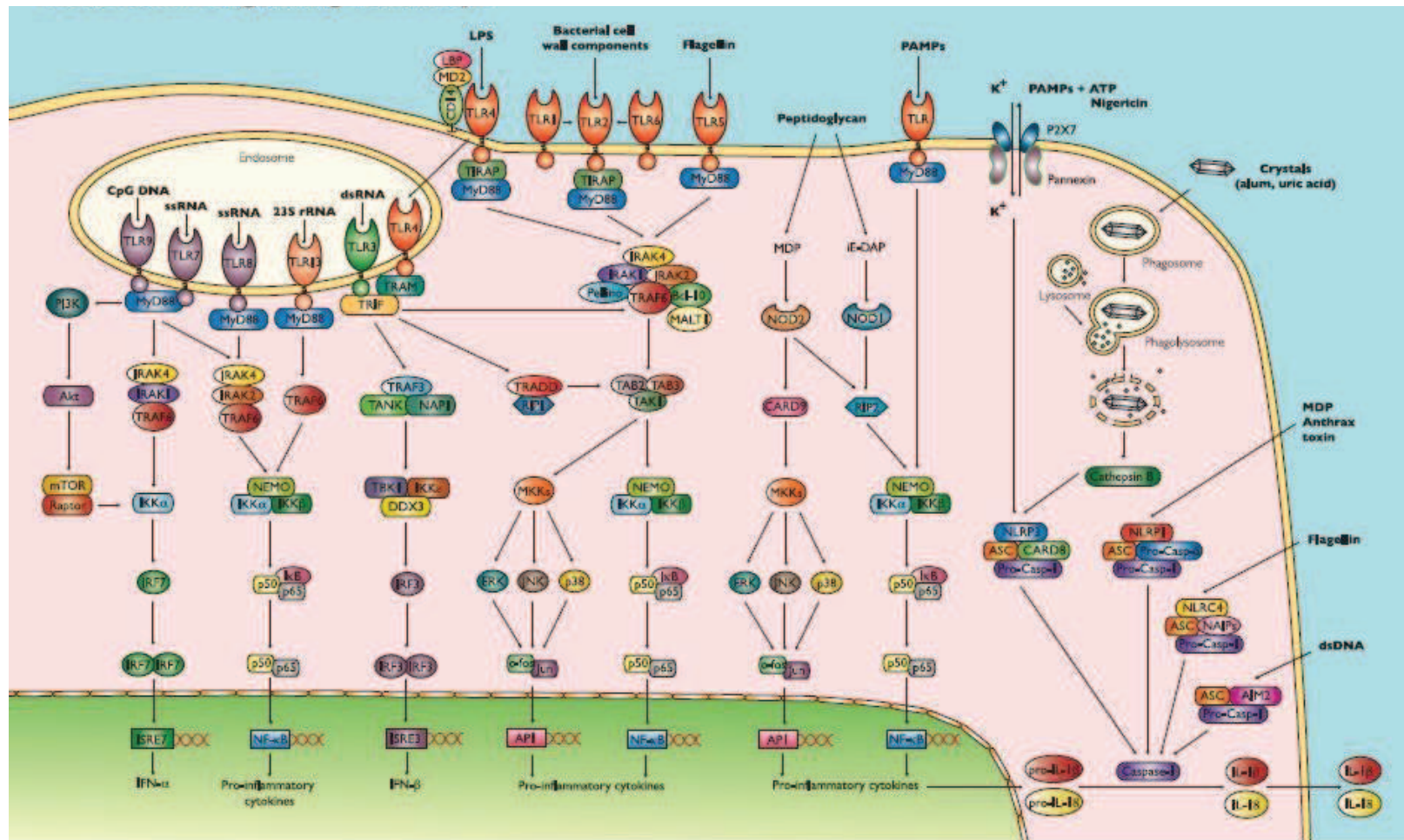
151) **Kovářová M.** *Studium možnosti použití kotveného Zymosanu A pro imunoterapii melanomu.* České Budějovice, 2013. Bakalářská práce. Jihočeská Univerzita v Českých Budějovicích. Vedoucí práce J. Ženka.

152) **Underhill D. M. and Gantner B.** Integration of Toll-like receptor and phagocytic signaling for tailored immunity. *Microbes and Infection*. 2004, vol. 6, no. 15, p. 1368-1373.

DOI: 10.1016/j.micinf.2004.08.016.

## **11. Příloha.**

Příloha 1: Schéma signalizace aktivací Toll like receptorů a Nod like receptorů.<sup>58</sup>

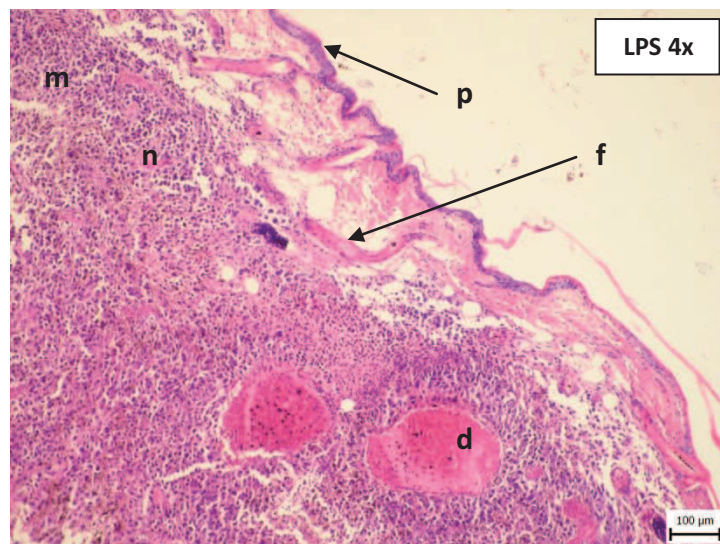
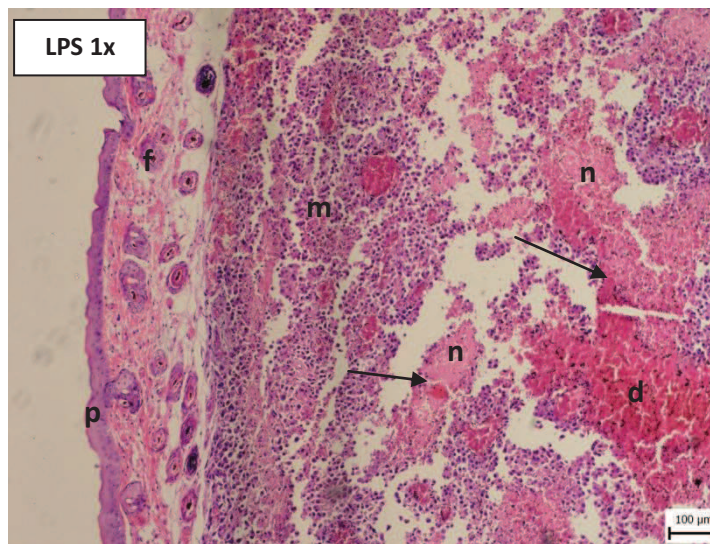
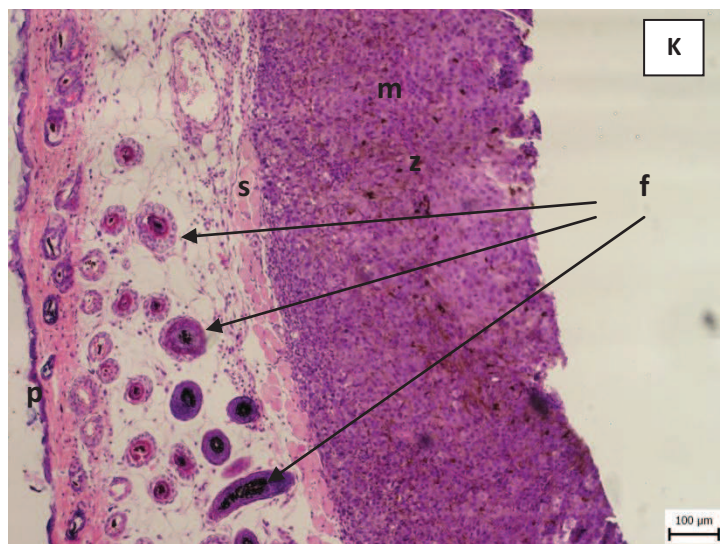


## Příloha 2: Přehled TLRs a jejich základních vlastností .<sup>57</sup>

TLR	Exprese na buňkách im. systému	PAMPs	DAMPs	Signal Adaptor	Production
<b>TLR1+</b> <b>TLR2</b>	Buněčný povrch Mo, MΦ, DC, B	Triacylované lipoproteiny (Pam3CSK4), <u>peptidoglykany</u> , <u>lipopolysacharidy</u>	(TLR2 DAMPs)	TIRAP, MyD88, Mal	IC
<b>TLR2+</b> <b>TLR6</b>	Buněčný povrch Mo, MΦ, MC, B	Diacylatované lipoproteiny ( <u>FSL-1</u> )	Heat Shock Proteiny (HSP 60, 70, Gp96), High mobility group proteiny (HMGB1), proteoglykany (Versican, fragmenty hyaluronové kyseliny)	TIRAP, MyD88, Mal	IC
<b>TLR3</b>	Endosomy B, T, NK, DC	<u>dsRNA (poly (I:C))</u> tRNA, siRNA	mRNA tRNA	TRIF	IC, type1 IFN
<b>TLR4</b>	Buněčný povrch/ endosomy Mo, MΦ, DC, MC, IE	<u>Lipopolysaccharidy (LPS)</u> Paclitaxel	Heat Shock Proteiny (HSP22, 60, 70,72, Gp96), High mobility group proteiny (HMGB1),proteoglycany (Versican, Heparin sulfate, fragmenty hyaluronové kyseliny),Fibronectin, Tenascin-C	TRAM, TRIF TIRAP, MyD88 Mal	IC, type1 IFN
<b>TLR5</b>	Buněčný povrch Mo, MΦ, DC, IE	<u>Flagellin</u>		MyD88	IC
<b>TLR7</b>	Endosomy Mo, MΦ, DC, B	ssRNA Imidazoquinoliny ( <u>R848</u> ) Guanosine analogy ( <u>Loxoribine</u> )	ssRNA	MyD88	IC, type1 IFN
<b>TLR8</b>	Endosomy Mo, MΦ, DC, MC	ssRNA, Imidazoquinoliny ( <u>R848</u> )	ssRNA	MyD88	IC, type1 IFN
<b>TLR9</b>	Endosomy Mo, MΦ, DC, B,T	CpG DNA <u>CpG ODNs</u>	Chromatin IgG complex	MyD88	IC, type1 IFN
<b>TLR10</b>	Endosomy Mo, MΦ, DC	profilin-like proteiny		MyD88	IC

Mo: monocyty, MΦ: makrofágy, DC: dendritické buňky, MC: žírné buňky, B: B-lymfocyty, T: T-lymfocyty, IE: intestinální epithelium, IC: zánětlivé cytokiny

### Příloha 3: Histologické porovnání kontroly, jednorázové a vícenásobné aplikace LPS.



**K-** melanom 24h po aplikaci PBS, roztok aplikován v čase 0.

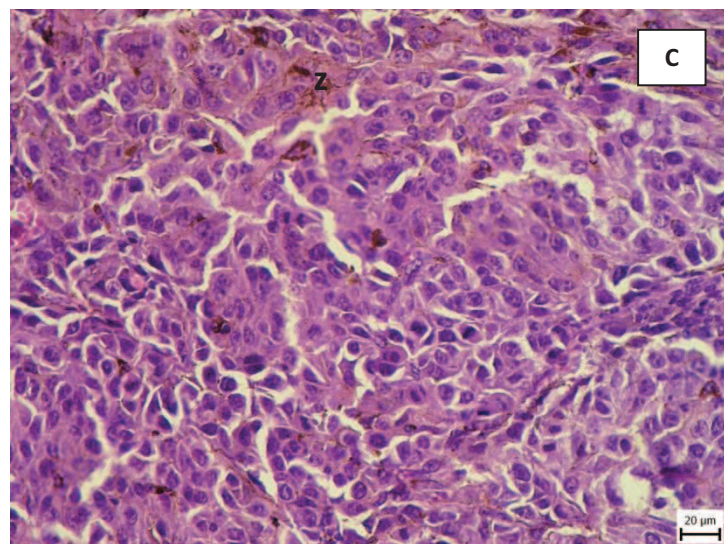
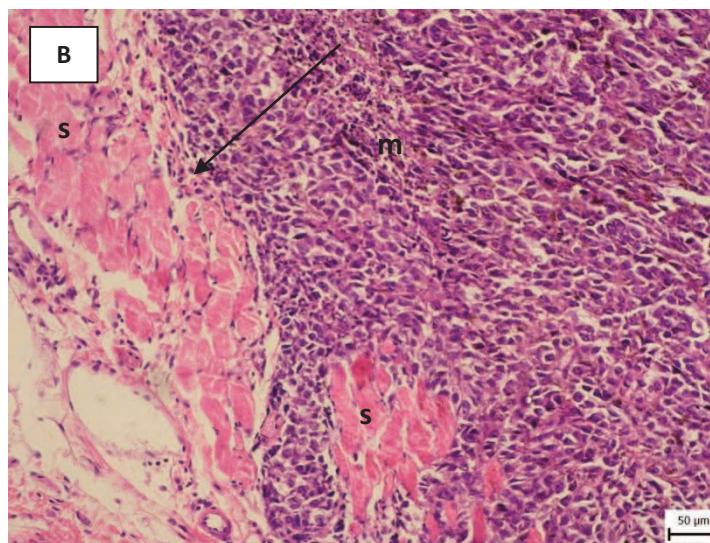
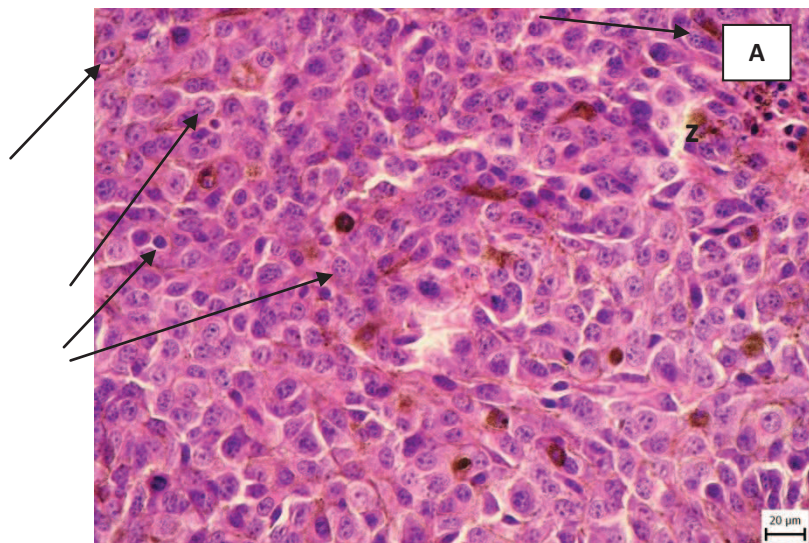
**LPS 1x-** melanom 24h po zahájení terapie roztokem 10mgLPS/ml PBS, roztok aplikován v čase 0.

**LPS 4x-** melanom 24h po zahájení terapie roztokem 10mgLPS/ml PBS, roztok aplikován zatím jen v čase 0.

(n)nekróza, (m)melanocyty, (d)dilatované cévy, (s)svalovina, (p)pokožka, (f) vlasový folikul, (z)zrna melaninu.

Všechny fotografie jsou pořízeny objektivem se zvětšením 10x. Úsečka je dlouhá 100μm.

#### Příloha 4.1: Typické histologické nálezy u tumorózní tkáně.



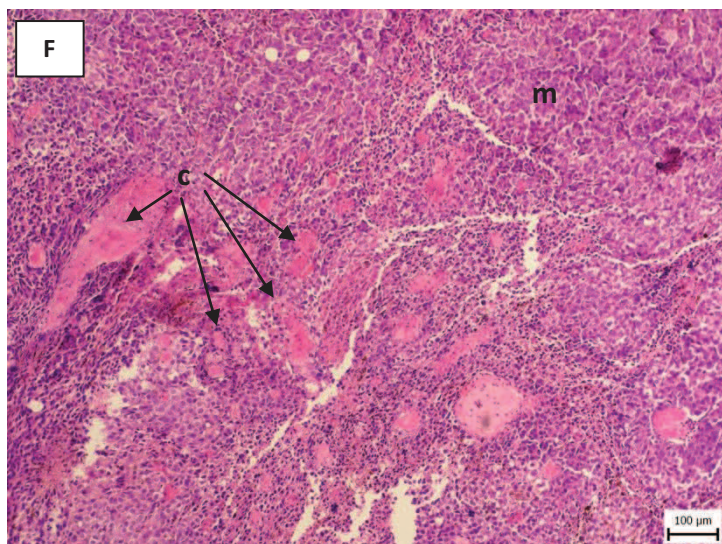
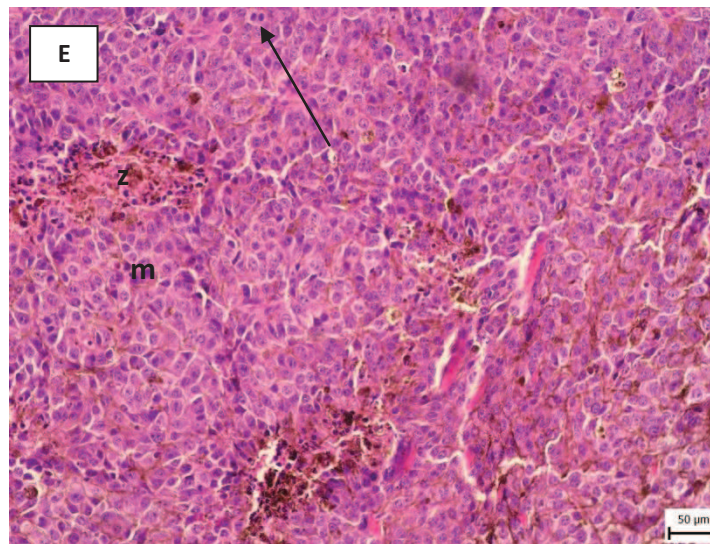
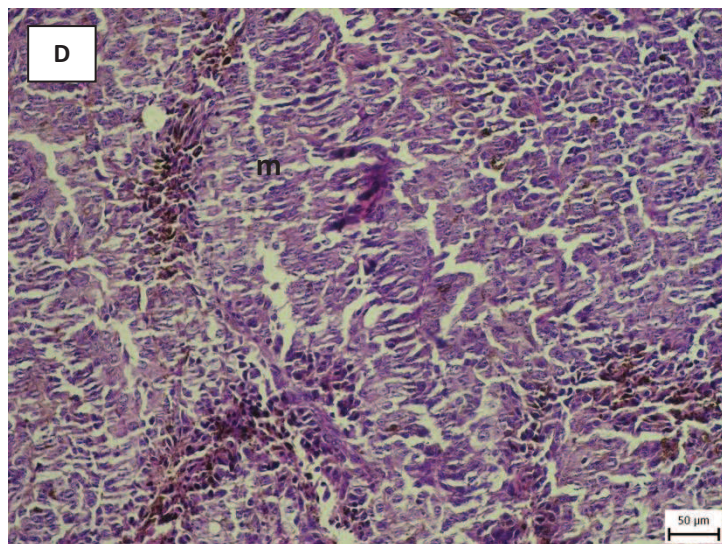
**A-** melanom 48h po aplikaci PBS, roztok aplikován v čase 0. Zvětšení objektivu 40x. Šipky směřují na dělící se buňky.

**B-** melanom 48h po aplikaci PBS, roztok aplikován v čase 0. Zvětšení objektivu 20x. Šipka směřuje na prostupující melanocyty prostupující do další vrstvy kůže (svaloviny).

**C-** melanom 24h po aplikaci PBS, roztok aplikován v čase 0. Zvětšení objektivu 40x. Deformované buňky melanomu.

(m)melanocyty, (s)svalovina, (z)zrna melaninu.

## Příloha 4.2: Typické histologické nálezy u tumorózní tkáně.



D- melanom 48h po aplikaci PBS, roztok aplikován v čase 0. Zvětšení objektivu 20x. Různě deformované buňky.

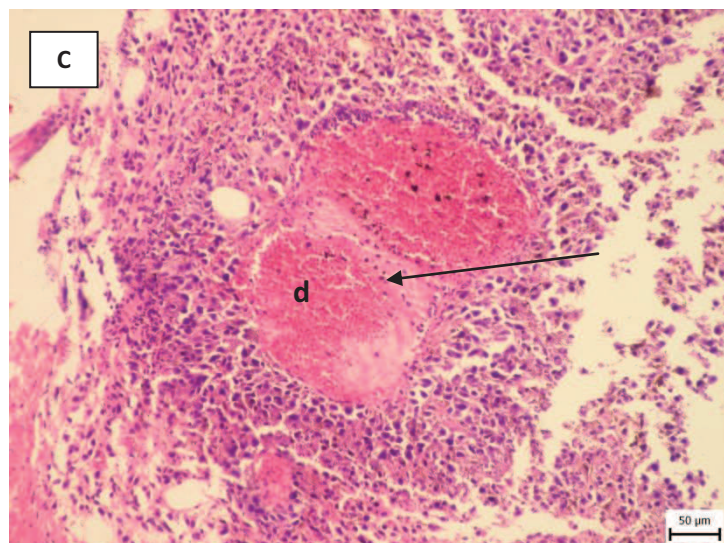
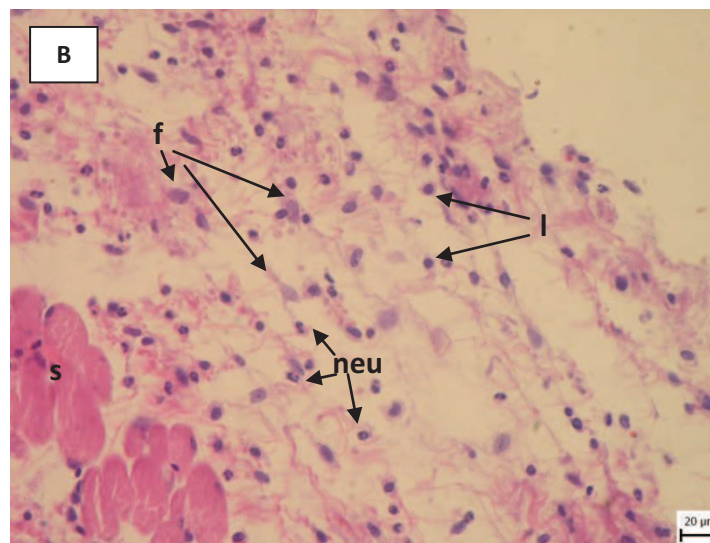
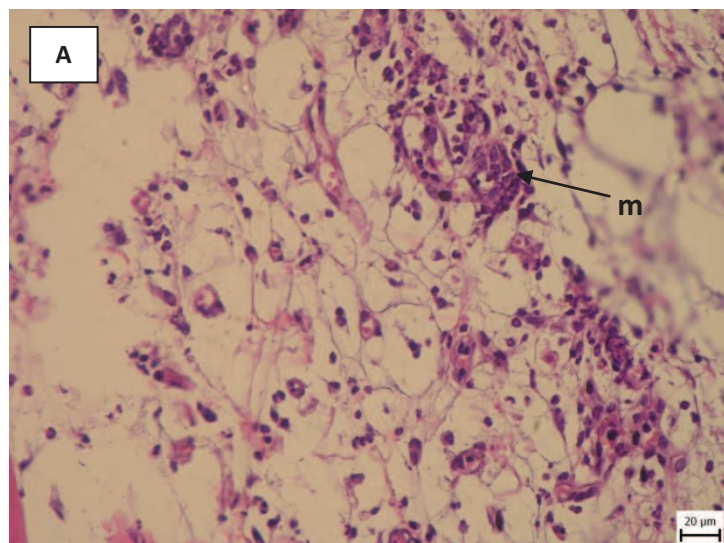
E- melanom 48h po aplikaci PBS, roztok aplikován v čase 0. Zvětšení objektivu 20x. Šipka směřuje na dělící se buňku v telofázi.

F- melanom 48h po aplikaci PBS, roztok aplikován v čase 0. Zvětšení objektivu 10x. Šipky směřují na cévy vzniklé při neovaskularizaci.

(c)cévy, (m)melanocyty, (d)dilatované cévy, (z)zrna melaninu.



## Příloha 5.1: Typické histologické nálezy při aplikaci LPS.



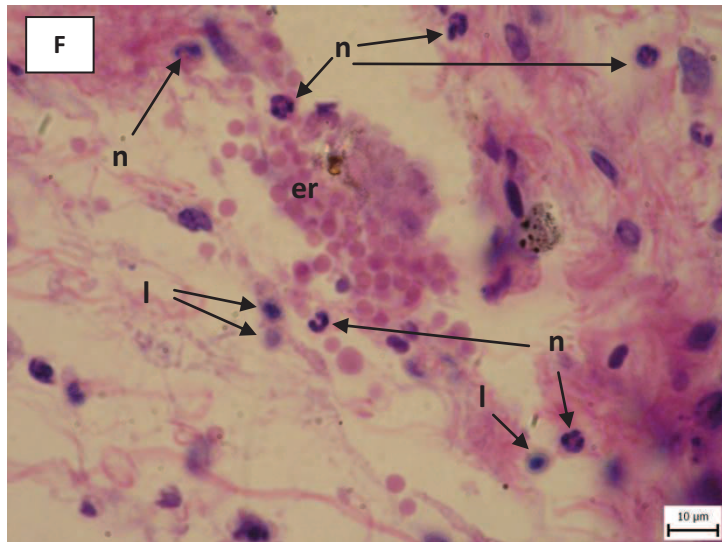
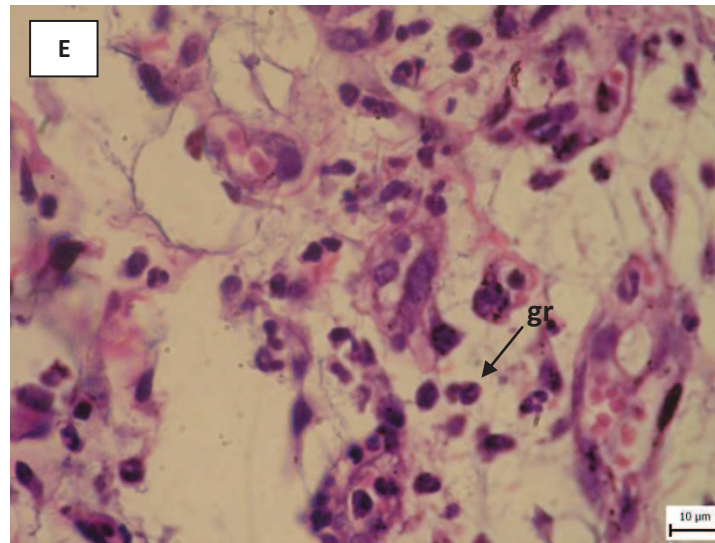
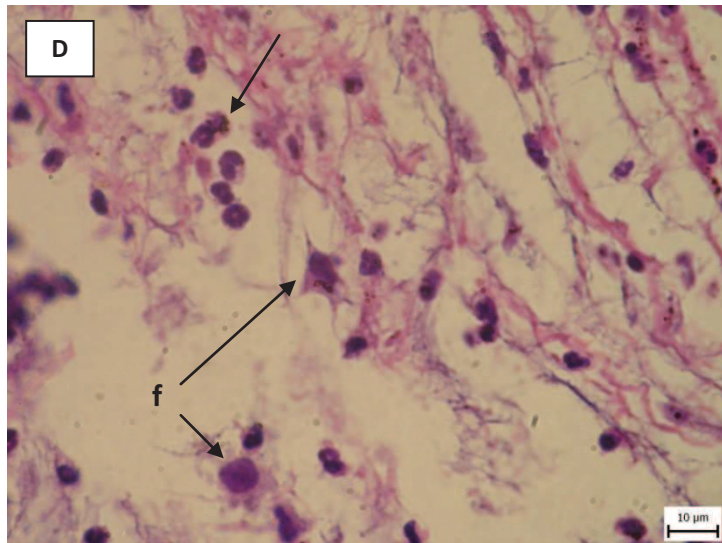
**A-** melanom 24h po zahájení terapie roztokem 10mgLPS/ml PBS, roztok aplikován v čase 0. Zvětšení objektivu 40x. Infiltrát.

**B-** melanom 24h po zahájení terapie roztokem 10mgLPS/ml PBS, roztok aplikován v čase 0. Zvětšení objektivu 40x. Infiltrát.

**C-** melanom 24h po zahájení terapie roztokem 10mgLPS/ml PBS, roztok aplikován v čase 0. Zvětšení objektivu 20x. Dilatované cévy a infiltrát (granulocyty).

(m) melanocyty, (d) dilatované cévy, (s) svalová vlákna, (neu) neutrofilny, (l) lymfocyty / monocyty.

**Příloha 5.2: Typické histologické nálezy při aplikaci LPS.**



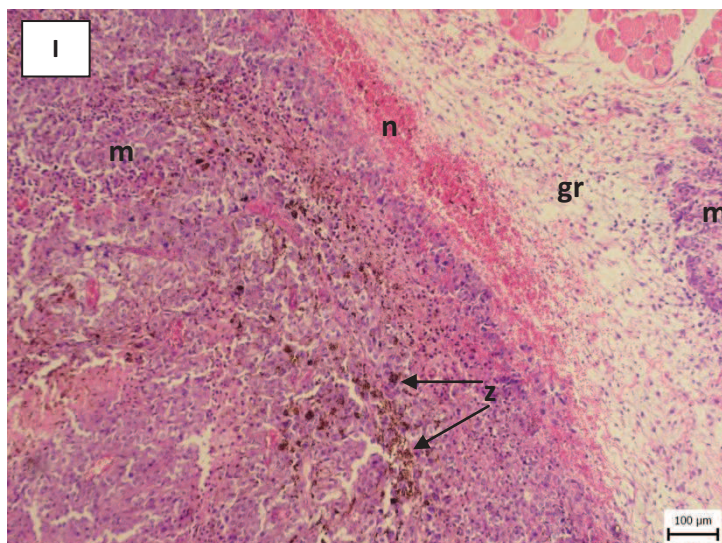
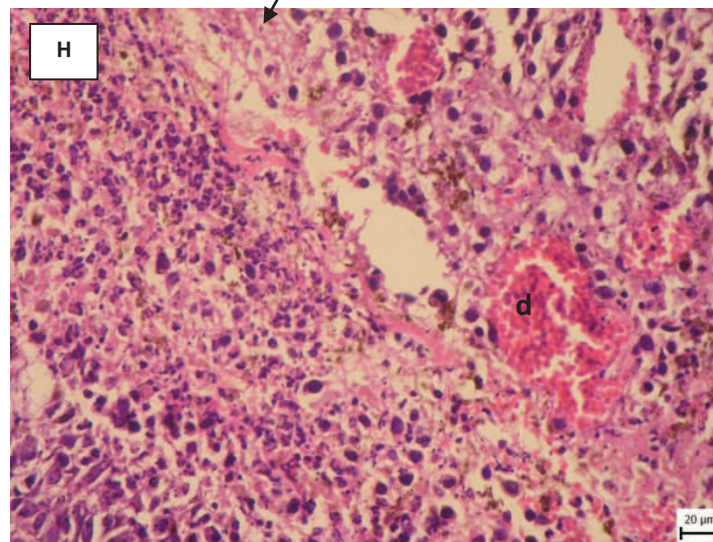
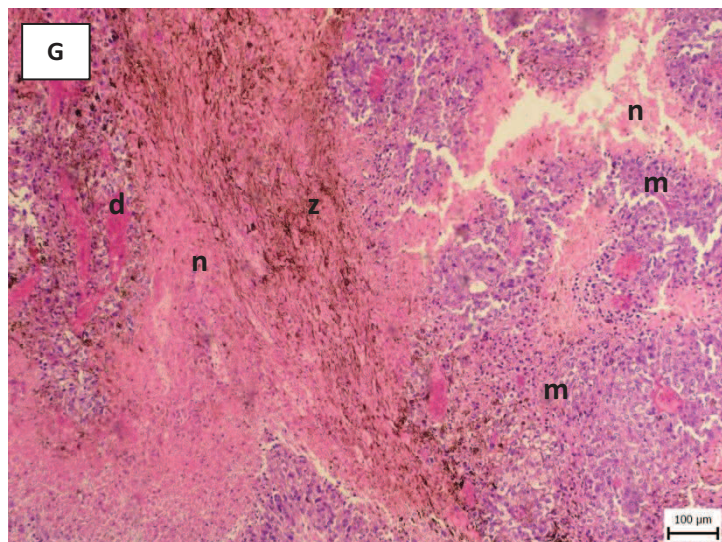
D- melanom 24h po zahájení terapie roztokem 10mgLPS/ml PBS, roztok aplikován v čase 0. Zvětšení objektivu 100x. Infiltrát.

E- melanom 24h po zahájení terapie roztokem 10mgLPS/ml PBS, roztok aplikován v čase 0. Zvětšení objektivu 100x. Infiltrát.

F- melanom 24h po zahájení terapie roztokem 10mgLPS/ml PBS, roztok aplikován v čase 0. Zvětšení objektivu 100x. Infiltrát.

(f) fagocyt, (gr)granulocyt, (er) erythrocyty, (l) lymfocyt, (n)neutrofil.

**Příloha 5.3: Typické histologické nálezy při aplikaci LPS.**



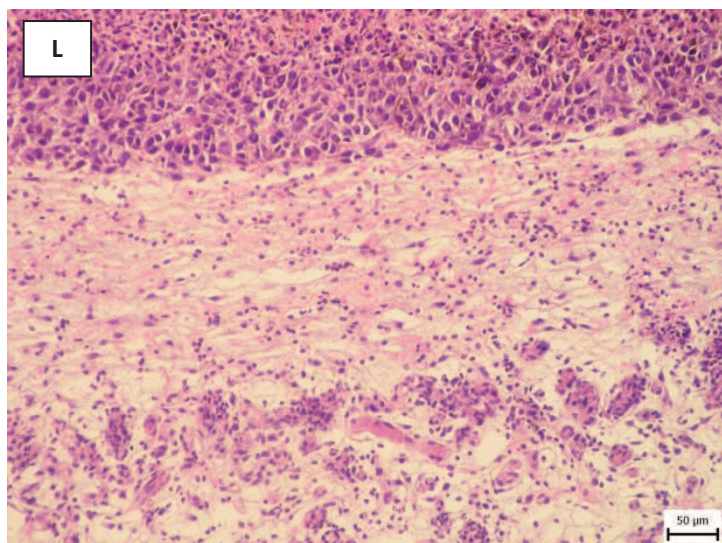
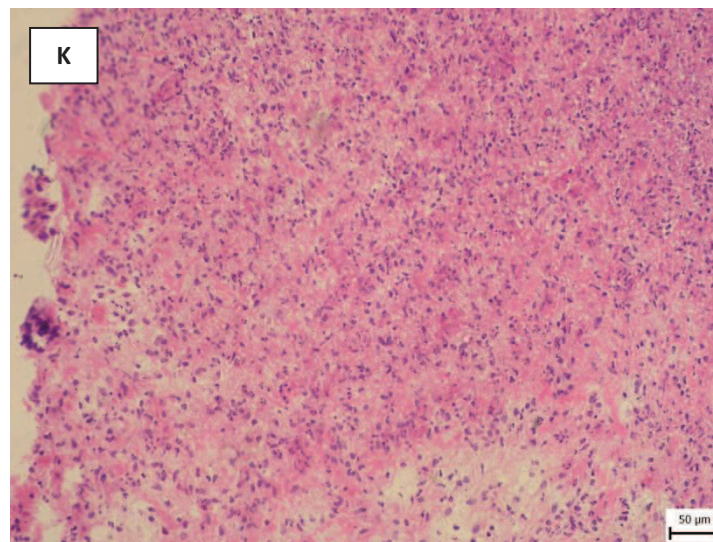
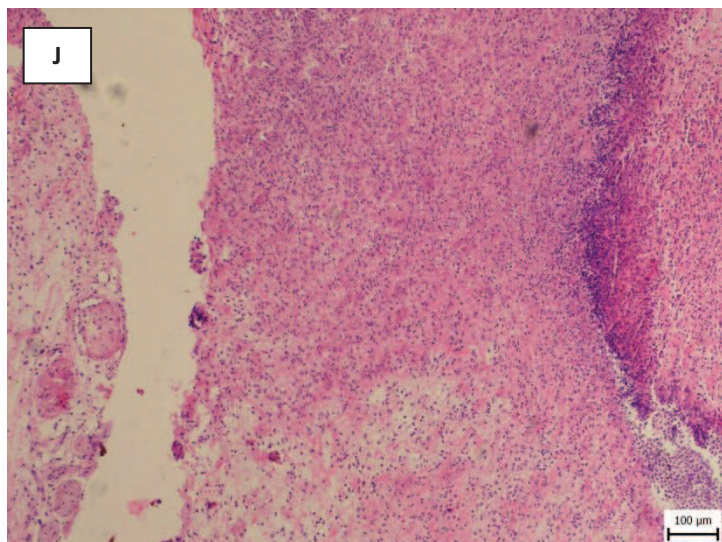
**G-** melanom 24h po aplikaci roztoku 10mgLPS/ml PBS, roztok aplikován v čase 0. Zvětšení objektivu 10x. Vznikající nekróza, hnědý melanin v nekrotázách.

**H-** melanom 24h po aplikaci roztoku 10mgLPS/ml PBS, roztok aplikován v čase 0. Zvětšení objektivu 40x. Šipka ukazuje na vznikající nekrózu. Poblíž šipky jsou také znatelné poprašky jader granulocytů.

**I-** melanom 24h po aplikaci roztoku 10mgLPS/ml PBS, roztok aplikován v čase 0. Zvětšení objektivu 10x. Granulózní lem.

(d) dilatované cévy, (n) nekróza, (z) zrna melaninu, (m) melanocyty, (gr) granulózní lem.

#### Příloha 5.4: Typické histologické nálezy při aplikaci LPS.

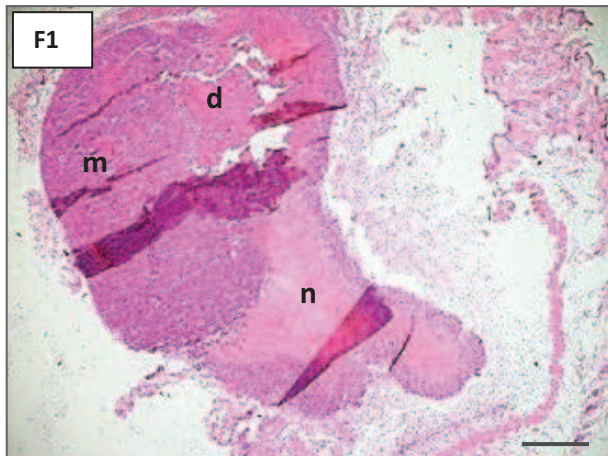
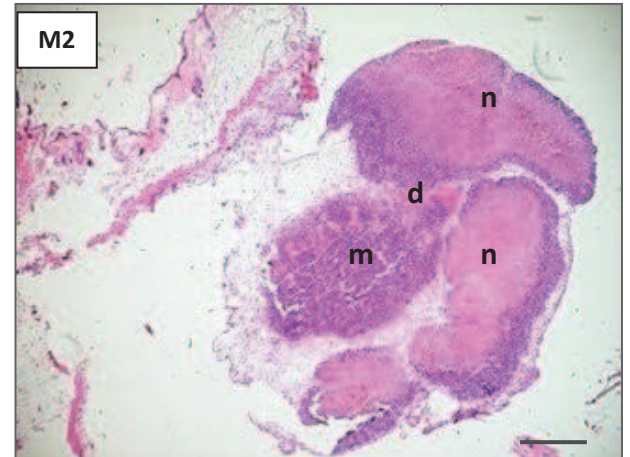
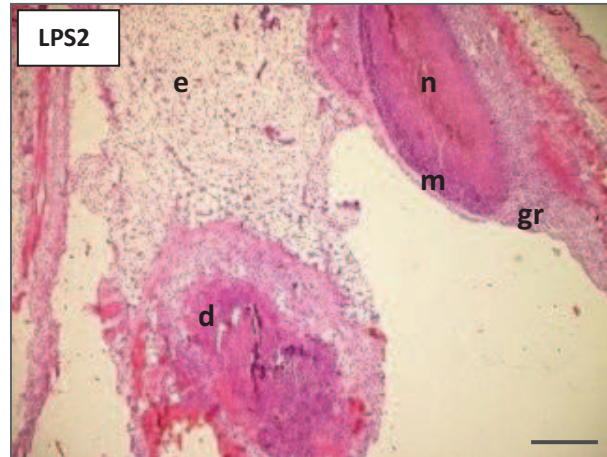
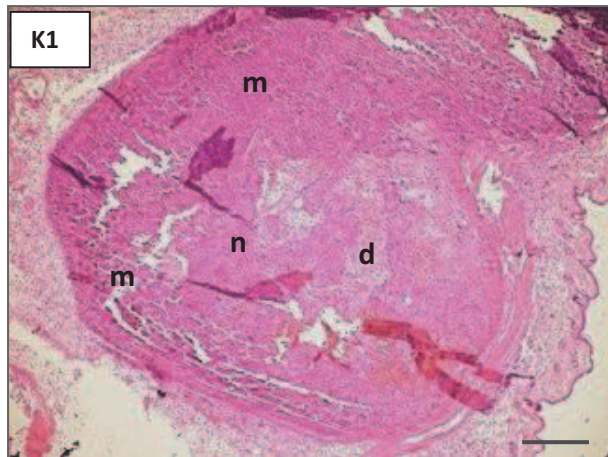


J- melanom 96h po aplikaci roztoku 10mg LPS/ml PBS, roztok aplikován pouze v čase 0. Zvětšení objektivu 10x. Masivní infiltrát.

K- melanom 96h po aplikaci roztoku. 10mgLPS/ml PBS, aplikován pouze v čase 0. Zvětšení objektivu 20x. Masivní infiltrát.

L- melanom 24h po aplikaci roztoku 10mgLPS/ml PBS, roztok aplikován v čase 0. Zvětšení objektivu 20x. Infiltrát.

**Příloha 6: Histologické porovnání monosložkových látek 24h po terapii.**

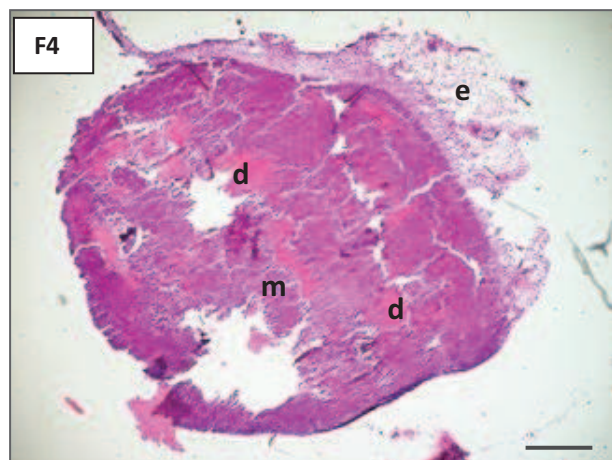
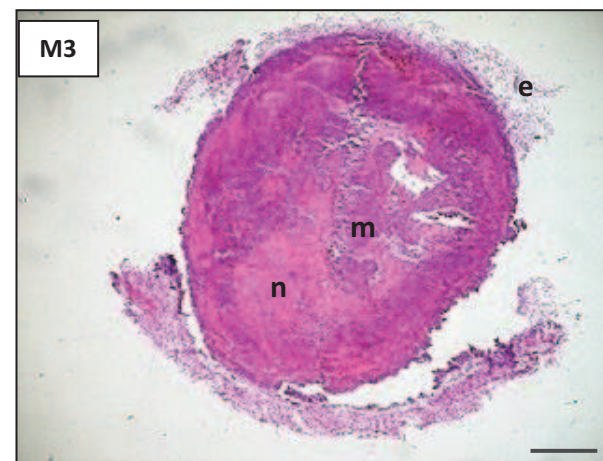
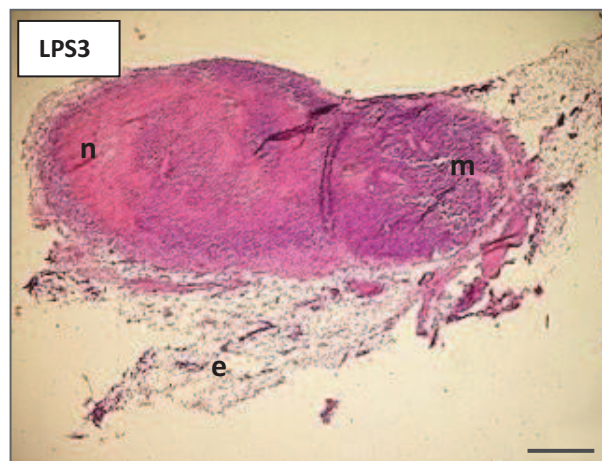
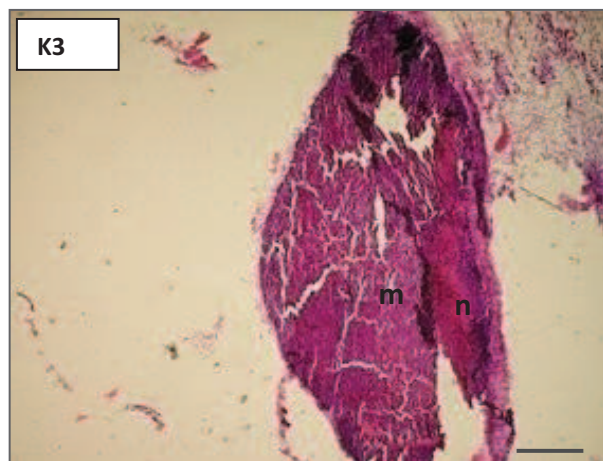


**K1**- melanom v době 24h od aplikace PBS.  
**LPS2**- melanom 24h po terapii lipopolysacharidem o koncentraci 0,5mg/ml PBS.  
**M2**- melanom po terapii 0,2mM mannanem-BAM v PBS.  
**F1**- melanom 24h po terapii 0,5mM fMLF-BAM v PBS.  
**LAM1**-melanom 24h po terapii 0,2mM laminarinem-BAM v PBS.

(n)nekróza, (m)melanocyty, (d)dilatované cévy, (gr)granulační lem, (e)rozvolněné edematózní vazivo.

Všechny fotografie jsou pořízeny objektivem se zvětšením 4x. Úsečka je dlouhá 400µm.

**Příloha 7: Histologické porovnání monosložkových látek 48h po terapii.**



**K 3**-melanom 48h po aplikaci PBS.

**LPS3**- melanom 48h lipopolysacharidem o koncentraci 0,5mg/ml PBS.

**M3**- melanom 48h po terapii 0,2mM mannanem-BAM v PBS.

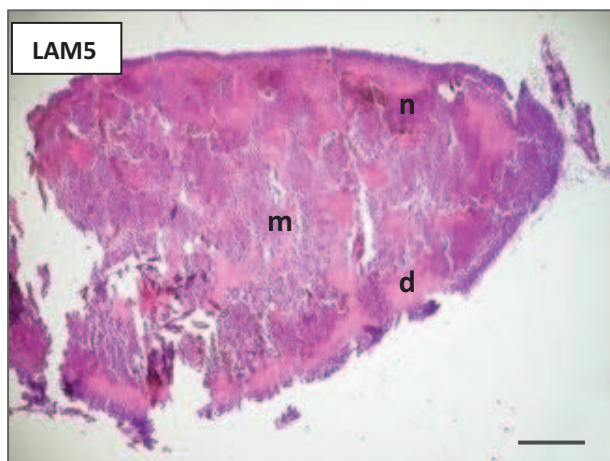
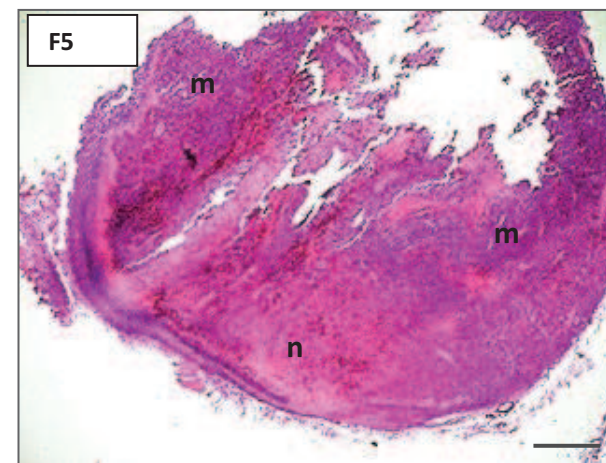
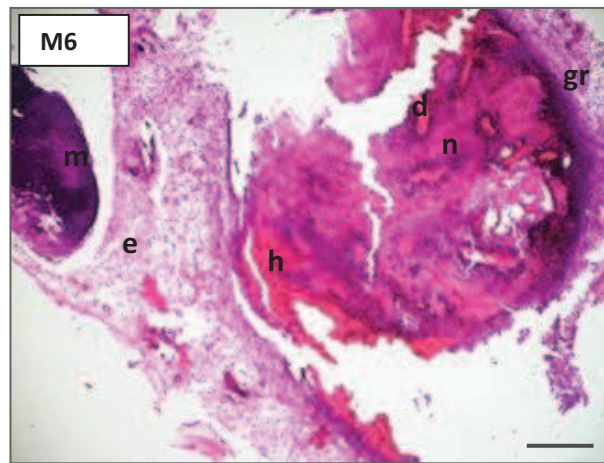
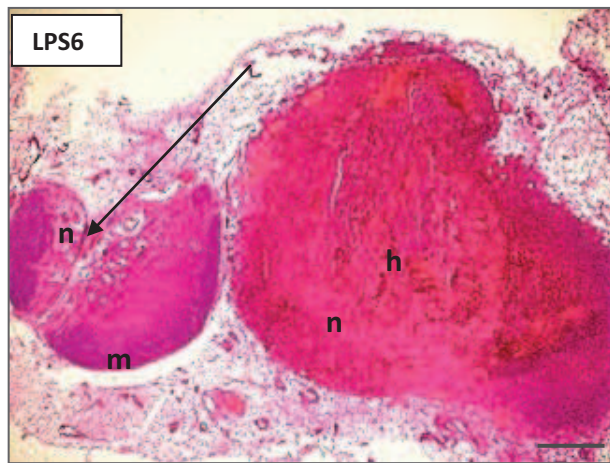
**F 4**- melanom 48h po terapii 0,5mM fMLF-BAM v PBS.

**LAM 4**-melanom 48h po terapii 0,2mM laminarinem-BAM v PBS.

(n)nekróza, (m) melanocyty, (d) velké dilatované cévy, (h) hemoragie (prokrvácené ložisko), (e) rozvolněné edematózní vazivo.

Všechny fotografie jsou pořízeny objektivem se zvětšením 4x. Úsečka je dlouhá 400µm.

## Příloha 8: Histologické porovnání monosložkových látek 72h po terapii.



**LPS6**- melanom 72h po terapii lipopolysacharidem o koncentraci 0,5mg/ml PBS.

**M6**- melanom 72h po terapii 0,2mM mannanem-BAM v PBS.

**F5**- melanom 72h po terapii 0,5mM fMLF-BAM v PBS.

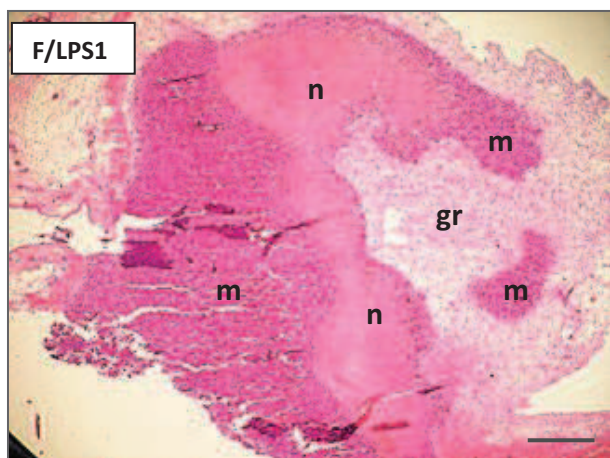
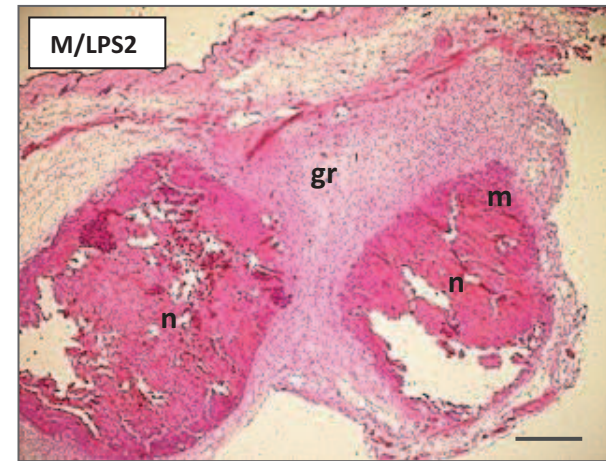
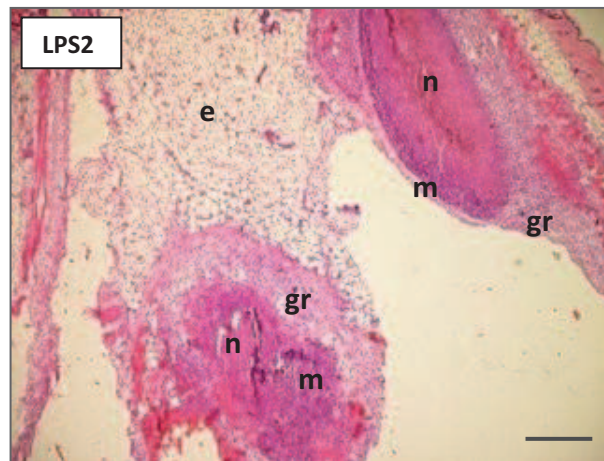
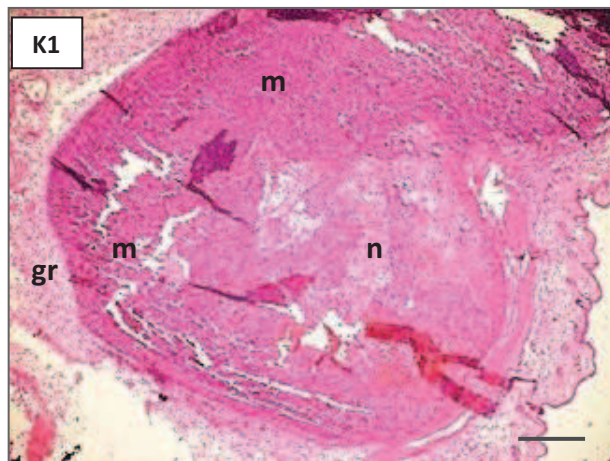
**LAM5**-melanom 72h 24h po terapii 0,2mM laminarinem-BAM v PBS.

**LAM6**-melanom 72h 0,2mM laminarinu-BAM v PBS.

(n) nekróza, (m)melanocyty, (d) velké dilatované cévy, (h) hemoragie, (e) rozvolněné edematózní vazivo, (gr) granulační lem.

Všechny fotografie jsou pořízeny objektivem se zvětšením 4x. Úsečka je dlouhá 400 $\mu$ m.

**Příloha 9: Histologické porovnání monosložkových látek v kombinaci s lipopolysacharidem 24h po terapii.**

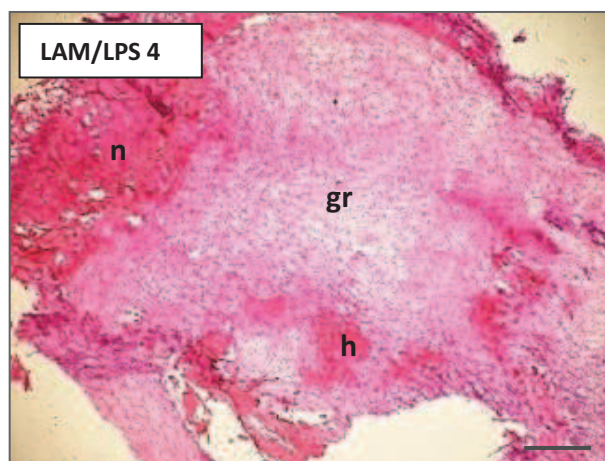
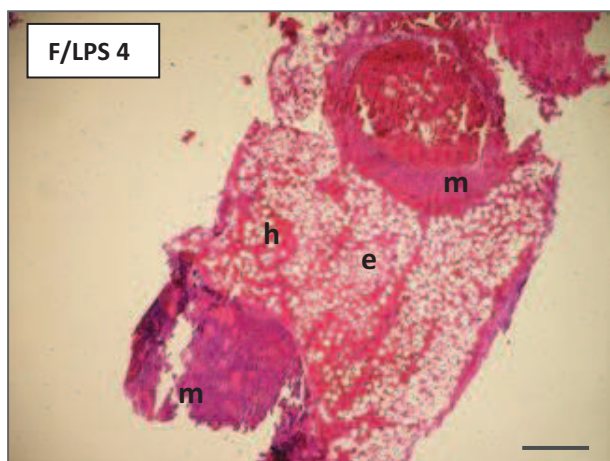
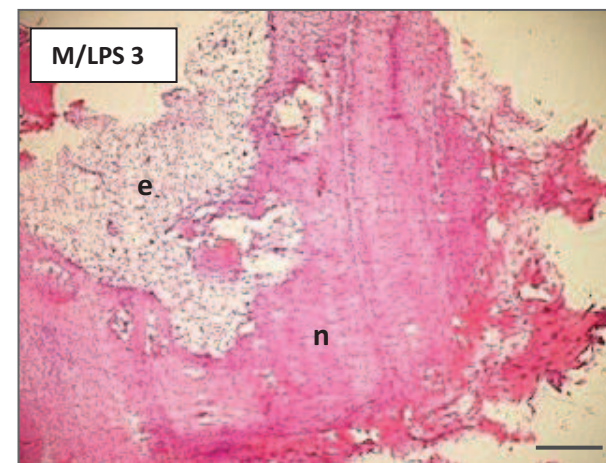


**K 1**-melanom 24h po aplikaci PBS.  
**LPS2**- melanom 24h po léčbě lipopolysacharidem o koncentraci 0,5mg/ml PBS.  
**M/LPS2**-melanom 24h po terapii 0,2mM mannanem-BAM a 0,5mg LPS /ml PBS.  
**F/LPS1**- melanom 24h po terapii 0,5mM fMLF-BAM a 0,5mg LPS /ml PBS.  
**LAM/LPS2**-melanom 24h po terapii 0,2mM laminarinem-BAM a 0,5mg LPS /ml PBS.

(n)nekróza, (m) melanocyty, (e) rozvolněné edematózní vazivo, (gr)granulační infiltrát/lem. Všechny fotografie jsou pořízeny objektivem se zvětšením 4x. Úsečka je dlouhá 400 $\mu$ m.



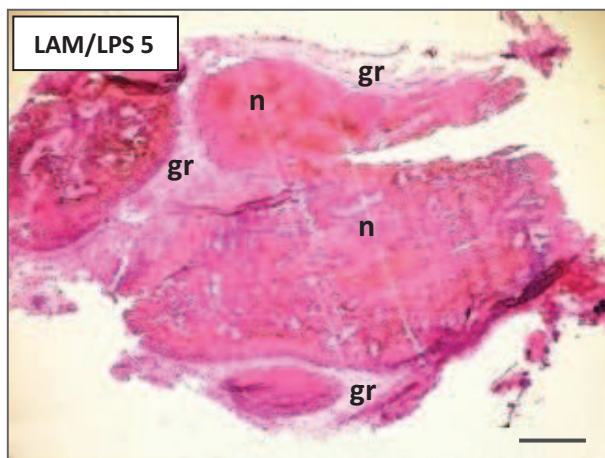
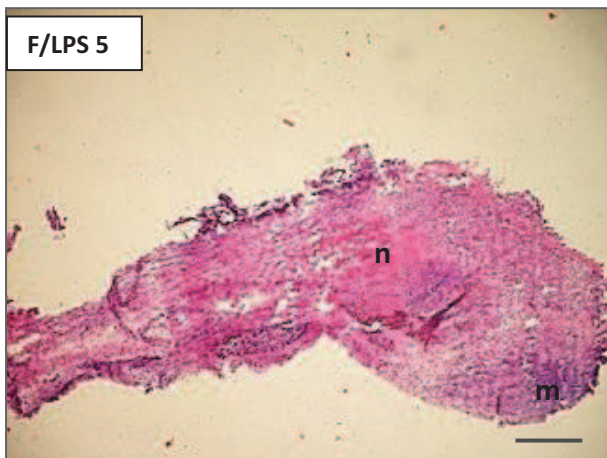
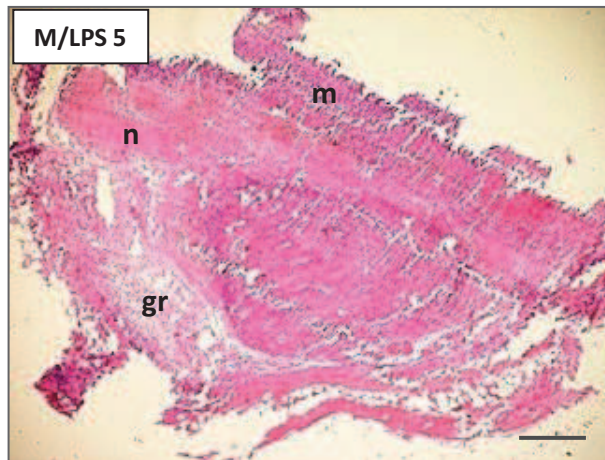
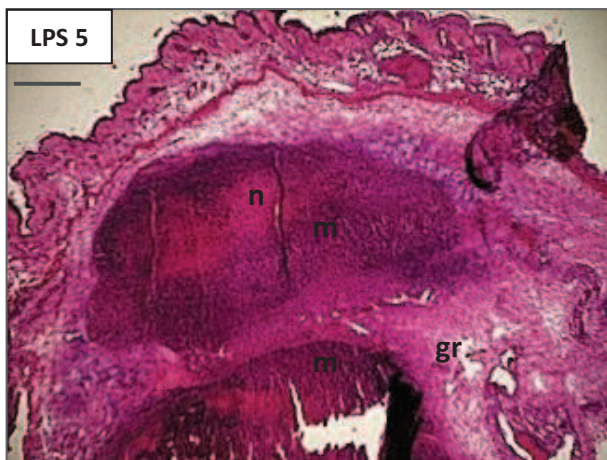
**Příloha 10: Histologické porovnání monosložkových látek v kombinaci s lipopolysacharidem 48h po terapii.**



**K 3**-melanom 48h po aplikaci PBS.  
**LPS 3**- melanom 48h po léčbě lipopolysacharidem o koncentraci 0,5mg/ml PBS.  
**M/LPS 3**- melanom 48h po terapii 0,2mM mannanem-BAM a 0,5mg LPS /ml PBS.  
**F/LPS 4**- melanom 48h po terapii 0,5mM fMLF-BAM a 0,5mg LPS /ml PBS.  
**LAM/LPS 4**-melanom 48h po terapii 0,2mM laminarinem-BAM a 0,5mg LPS /ml PBS.

(n)nekróza, (m) melanocyty, (e) rozvolněné edematózní vazivo, (gr)granulační infiltrát/lem, (h) hemoragie.  
 Všechny fotografie jsou pořízeny objektivem se zvětšením 4x. Úsečka je dlouhá 400 $\mu$ m.

**Příloha 11: Histologické porovnání monosložkových látek v kombinaci s lipopolysacharidem 72h po terapii.**



**LPS 5**- melanom 72h po léčbě lipopolysacharidem o koncentraci 0,5mg/ml PBS.

**M/LPS 5**- melanom 72h po terapii 0,2mM mannanem-BAM a 0,5mg LPS /ml PBS.

**F/LPS 5**- melanom 72h po terapii 0,5mM fMLF-BAM a 0,5mg LPS /ml PBS.

**LAM/LPS 5**-melanom 72h po terapii 0,2mM laminarinem-BAM a 0,5mg LPS /ml PBS.

(n)nekróza, (m)melanocyty, (gr) granulační infiltrát/lem.

Všechny fotografie jsou pořízeny objektivem se zvětšením 4x. Úsečka je dlouhá 400µm.