

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

**Nádorová imunoterapie založená na mechanismech vrozené
imunity a studium možnosti zvýšení její účinnosti úpravou
nádorového prostředí**

Diplomová práce

Bc. Kamila Masáková

Školitel: RNDr. Jan Ženka, CSc.

České Budějovice 2018

Masáková, K., 2018: Nádorová imunoterapie založená na mechanismech vrozené imunity a studium možnosti zvýšení její účinnosti úpravou nádorového prostředí. [Cancer immunotherapy based on mechanisms of innate immunity and the study of possibilities how to increase its effectiveness by adaptation of tumor's environment. Mgr. Thesis, in Czech.] – 59 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

The aim of this thesis was to study how to increase effectiveness of cancer immunotherapy based on synergy of compounds stimulating phagocytosis and TLR agonist. Tumor microenvironment was modified by enzymes, which catalyzed conversion of lactate to pyruvate or acetate. It was monitored effect enzymes on tumor size, survival of experimental mice and cytotoxicity on tumor cells.

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

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich 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 plagiátorů.

V Českých Budějovicích, 18. 4. 2018

.....
Kamila Masáková

Poděkování:

V první řadě děkuji svému školiteli RNDr. Janu Ženkovi CSc. za příležitost podílet se na projektu nádorové imunoterapie a jeho vstřícnost a ochotu kdykoli a s čímkoli pomoci. Děkuji kolektivu Oddělení medicínské biologie za poskytnutí pracovního zázemí. Také bych chtěla poděkovat svým kolegyním za příjemnou spolupráci. V neposlední řadě děkuji své rodině za trpělivost a podporu, které se mi dostávalo po celou dobu studia.

OBSAH:

1 ÚVOD	1
2 PŘEHLED LITERATURY	2
2.1 Vznik a vlastnosti nádorové tkáně.....	2
2.1.1 Nádorové mikroprostředí.....	2
2.1.1.1 Modifikace nádorového mikroprostředí pomocí laktát oxidázy a laktát 2-monooxygenázy	3
2.1.1.2 Modifikace nádorového mikroprostředí pomocí NAD ⁺	4
2.1.1.3 Modifikace nádorového mikroprostředí pomocí hydrogenuhličitanu sodného	4
2.2 Klasifikace nádorů	4
2.3 Adenokarcinom pankreatu	5
2.4 Možnosti léčby nádorových onemocnění	6
2.4.1 Chirurgická léčba.....	6
2.4.2 Radiologická léčba	6
2.4.3 Chemoterapeutická léčba.....	7
2.4.4 Cílená léčba	7
2.4.5 Imunoterapie	8
2.5 Imunitní systém	8
2.5.1 Mechanismy imunitního systému	8
2.5.1.1 Anatomické a fyziologické bariéry	9
2.5.1.2 Vrozená imunita	9
2.5.1.3 Adaptivní imunita.....	10
2.6 Nádor vs. imunitní systém	10
2.6.1 Nádorové antigeny.....	11
2.6.2 Nádorová imunoeditace.....	11
2.6.3 Protinádorové mechanismy imunitního systému.....	12
2.6.4 Strategie úniku nádorů imunitnímu systému	14
2.7 Imunoterapie stimulací vrozené imunity	15
2.7.1 Pattern recognition receptors – PRRs.....	16
2.7.1.1 Lektinové receptory typu C (CLRs).....	17
2.7.1.2 Toll-like receptory (TLRs).....	18
2.7.2 Imunostimulační látky	19
2.7.3 Biokompatibilní kotva BAM.....	20

3	CÍLE PRÁCE	21
4	MATERIÁL	22
4.1	Chemikálie	22
4.2	Laboratorní myši	22
4.3	Linie pankreatického adenokarcinomu Panc02	22
5	METODY	24
5.1	Příprava nádorových buněk	24
5.2	Transplantace Panc02	24
5.3	Měření velikosti a výpočet objemů nádorů.....	24
5.4	Syntéza manan-BAM ₄₀₀₀	24
5.5	Syntéza R-848.HCl	25
5.6	Syntéza LO-BAM ₄₀₀₀	25
5.7	Syntéza L2M-BAM ₄₀₀₀	25
5.8	Stanovení koncentrace laktátu pomocí <i>Lactate Assay Kit</i>	25
5.9	Analýza dat	26
5.10	Experimenty	27
5.10.1	Vliv vazby kotvy BAM na aktivitu laktát oxidázy.....	27
5.10.2	Pulzní terapie pankreatického adenokarcinomu Panc02 směsí manan-BAM + R-848 + POLY (I:C) + LTA v kombinaci s LO-BAM.....	27
5.10.3	Stanovení změny koncentrace laktátu v nádoru v průběhu terapie směsí manan-BAM + R-848 + POLY (I:C) + LTA v kombinaci s LO-BAM	28
5.10.4	Porovnání cytotoxického efektu LO a LO-BAM na buňky pankreatického adenokarcinomu Panc02.....	29
5.10.5	Vliv vazby kotvy BAM na aktivitu laktát 2-monooxygenázy.....	30
5.10.6	Pulzní terapie pankreatického adenokarcinomu Panc02 směsí manan-BAM + R-848 + POLY (I:C) + LTA v kombinaci s L2M-BAM.....	31
5.10.7	Stanovení změny koncentrace laktátu v nádoru v průběhu terapie směsí manan-BAM + R-848 + POLY (I:C) + LTA v kombinaci s L2M-BAM	31
5.10.8	Pulzní terapie pankreatického adenokarcinomu Panc02 směsí manan-BAM + R-848 + POLY (I:C) + LTA v kombinaci s NAD ⁺ v NaHCO ₃	32
6	VÝSLEDKY.....	34
6.1	Vliv vazby kotvy BAM na aktivitu laktát oxidázy	34

6.2	Pulzní terapie pankreatického adenokarcinomu Panc02 směsí manan-BAM + R-848 + POLY (I:C) + LTA v kombinaci s LO-BAM	34
6.3	Stanovení změny koncentrace laktátu v nádoru v průběhu terapie směsí manan-BAM + R-848 + POLY (I:C) + LTA v kombinaci s LO-BAM.....	37
6.4	Porovnání cytotoxického efektu LO a LO-BAM na buňky pankreatického adenokarcinomu Panc02	37
6.5	Vliv vazby kotvy BAM na aktivitu laktát 2-monooxygenázy	38
6.6	Pulzní terapie pankreatického adenokarcinomu Panc02 směsí manan-BAM + R-848 + POLY (I:C) + LTA v kombinaci s L2M-BAM	39
6.7	Stanovení změny koncentrace laktátu v nádoru v průběhu terapie směsí manan-BAM + R-848 + POLY (I:C) + LTA v kombinaci s L2M-BAM	41
6.8	Pulzní terapie pankreatického adenokarcinomu Panc02 směsí manan-BAM + R-848 + POLY (I:C) + LTA v kombinaci s NAD ⁺ v NaHCO ₃	41
7	DISKUSE	44
8	ZÁVĚR.....	48
9	SEZNAM ZKRATEK.....	49
10	LITERATURA	52

1 ÚVOD

Nádorová onemocnění tvoří obrovskou skupinu onemocnění vyznačující se nekontrolovatelným bujením buněk. Díky neustálým výzkumným a medicínským pokrokům umožňujícím časnější záchyt a účinnější léčbu nádorových chorob dochází k prodlužování přežití i k poklesu úmrtnosti (Siegel a kol., 2018). Přesto onkologická onemocnění představují dle americké statistiky druhou nejčastější příčinu úmrtí a počet pacientů s nádorovými chorobami se stále zvyšuje (Siegel a kol., 2018; Miller a kol., 2016).

Většina primárních nádorů může být úspěšně léčena kombinací chirurgické, radiační a chemoterapeutické léčby, avšak v případě mikro-metastáz ve vzdálených orgánech a nádorových buněk diseminovaných v krevním oběhu je tato terapie stále velice neúčinná (Schuster a kol., 2006). Slibnou metodou v léčbě nádorů se ukazuje nádorová imunoterapie, jež je účinná pro celou škálu různých nádorů a jejíž účinky se zdají být dlouhodobé (Otáhal a Trněný, 2015).

Tato diplomová práce, jež je součástí projektu kolektivu RNDr. Jana Ženky, CSc., se zabývá studiem možnosti zvýšení účinků terapie nádorů stimulací nespecifické imunity a úpravou nádorového prostředí. Záměrem práce je přispět novými znalostmi v oblasti imunoterapie nádorů.

2 PŘEHLED LITERATURY

2.1 Vznik a vlastnosti nádorové tkáně

Nádor, označován také jako novotvar, neoplazma, či tumor, je charakterizován jako abnormální tkáň s neregulovanou buněčnou proliferací. Předpokladem pro vznik nádorové buňky je akumulace somatických mutací v průběhu času. Tato skutečnost přispívá jak k růstu nádoru, progresi, úniku imunitnímu systému, tak i k vývoji rezistence vůči lékům (Beerenwinkel a kol., 2014). Jak se nádorové buňky neustále dělí, objevují se další mutace, díky nimž se nádorová onemocnění řadí mezi vysoce heterogenní onemocnění (Shiabata, 2012). Navzdory vysoké heterogenitě lze přesto nádory charakterizovat vlastnostmi typickými pro tyto útvary, a to soběstačností v růstových signálech, necitlivostí vůči inhibičním signálům, neomezeným replikačním potenciálem, rezistencí k apoptóze, indukci angiogeneze, invazí a tvorbou metastáz (Hanahan a Weinberg, 2011). Nádorová tkáň je tkáň heterogenní obsahující nejen nádorové buňky, ale i fibroblasty a myeloidní buňky, jež jsou součástí nádorového mikroprostředí (Hui a Chen, 2015).

2.1.1 Nádorové mikroprostředí

Solidní nádory představují strukturálně složité a heterogenní systémy, jež obsahují nádorové buňky a buňky stromální (Kessenbrock a kol., 2010). Oproti normálním tkáním zde nalézáme vyšší počet fibroblastů, které zde syntetizují růstové faktory, chemokiny a adhezní buňky (Trédan a kol., 2007). Poměr složek nádorového stroma se může u jednotlivých nádorů lišit (Kessenbrock a kol., 2010).

Přestože nádorová tkáň je vyživována vlastní vaskulární sítí, průtok krve je v mnoha nádorech variabilní a neorganizovaný, což má za následek vznik hypoxie na mnoha místech nádorové tkáně (Trédan a kol., 2007). Hlavní úlohu v adaptaci nádorových buněk na hypoxický stres hraje transkripční faktor indukovaný hypoxií Faktor 1 (HIF-1); (Vaupel, 2004). Jako výsledek adaptace na hypoxický stres dochází v hypoxických oblastech nádoru za účelem produkce ATP (důležitého pro energetické pochody) ke glykolýze tedy konverzi glukózy na laktát (Trédan a kol., 2007). Většina nádorů upřednostňuje anaerobní glykolýzu namísto oxidativní fosforylace, která představuje efektivnější způsob produkce ATP, i za přístupu kyslíku (Vander Heiden a kol., 2009). Tato skutečnost vede k nízkému extracelulárnímu pH nádoru (Trédan a kol., 2007). Hypoxie nádorové tkáně dále zvyšuje

genomickou nestabilitu, a tudíž podporuje klonální expanzi nádorových buněk (Hockel a Vaupel, 2001).

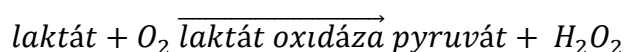
Zvýšená produkce laktátu podporuje vývoj a aktivaci myeloidních supresorových buněk (MDSC). MDSC společně s laktátem a nízkým pH v nádorovém mikroprostředí inhibují funkci NK buněk (*Natural Killer*) a T lymfocytů, čímž usnadňují progresi nádoru (Husain a kol., 2013). Laktát produkovaný nádorem inhibuje NK buňky nejen nepřímo prostřednictvím MDSC, ale také přímou inhibicí cytolytické funkce NK buněk (Husain a kol., 2013). Vysoké množství naakumulovaného laktátu v nádorech je také spojováno s výskytem vzdálených metastáz, a to i v raném stádiu onemocnění, neboť hromadění laktátu v nádorové tkáni aktivně zvyšuje stupeň nádorové malignity (Walenta a Mueller-Klieser, 2004).

Složení nádorového mikroprostředí ovlivňuje maligní transformaci, schopnost metastazování a invaze i citlivost nádorových buněk na léčbu (Trédan a kol., 2007).

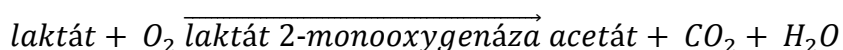
Jelikož nádorové buňky interagují s okolním mikroprostředím, zaměření na nádorové mikroprostředí při léčbě nádorových onemocnění by mohlo doplnit tradiční léčby a zlepšit terapeutické výsledky (Hui a Chen, 2015).

2.1.1.1 Modifikace nádorového mikroprostředí pomocí laktát oxidázy a laktát 2-monooxygenázy

Laktát oxidáza (LO) řadící se do skupiny oxidoreduktáz je flavoenzym využívající flavinmononukleotid (FMN) jako svůj kofaktor. Nacházíme ji u některých virů a bakterií. LO katalyzuje oxidaci laktátu na pyruvát. Reakce se děje za přítomnosti rozpuštěného kyslíku a tvorby peroxidu vodíku (Ghisla a Massey, 1977). Děj je graficky znázorněn v následující rovnici:



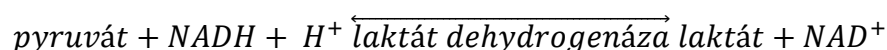
Laktát 2-monooxygenáza (L2M), stejně jako LO, patří mezi FMN dependentní flavoenzymy s oxidoredukčními vlastnostmi (Murphy a kol., 1983). L2M katalyzuje oxidaci laktátu na acetát a oxid uhličitý (Giegel a kol., 1990). Reakce je popsána následující rovnicí:



Oba enzymy odbourávají laktát, čím snižují jeho množství. Jelikož laktát nejen stimuluje angiogenezi, ale také suprimuje imunitní systém, jeví se zaměření na snížení hladiny laktátu v nádoru jako slibná léčebná strategie (Romero-Garcia a kol., 2016).

2.1.1.2 Modifikace nádorového mikroprostředí pomocí NAD⁺

Nikotinamidadeninukleotid (redukováný – NADH, oxidovaný – NAD⁺) je důležitým kofaktorem v přenosu elektronů v energetickém metabolismu. Účastní se redoxních reakcí katalyzovaných NADH/NAD⁺ dependentními oxidoreduktázami (Hung a kol., 2011). V mitochondriích řídí NADH/NAD⁺ pár produkci ATP oxidativní fosforylací, v cytosolu glykolýzou (Blacker a kol., 2014). Očekává se tedy, že zvýšení NADH/NAD⁺ bude mít vliv na metabolickou distribuci (Berríos-Rivera a kol., 2002). Pro podporu glykolýzy a tím i přeměny laktátu na pyruvát je nutné dostatečné množství NAD⁺, tato přeměna je popsána následující souhrnnou rovnicí (Phypers a Pierce, 2006).



2.1.1.3 Modifikace nádorového mikroprostředí pomocí hydrogenuhličitanu sodného

Hydrogenuhličitan sodný (NaHCO₃), také známý jako jedlá soda, je sůl kyseliny uhličité, která reaguje alkalicky a neutralizuje kyselé pH. Vysoce kyselé prostředí solidních nádorů způsobené extenzivní tvorbou kyselých metabolitů podporuje jejich invazivitu a metastazování (Böhme a Bosserhoff, 2016). Nízké pH také blokuje aktivaci T lymfocytů. Neutralizace acidity nádorů by mohla umožnit zvýšení infiltrace nádoru imunitními buňkami a omezit progresi onemocnění (Pilon-Thomas a kol., 2016).

2.2 Klasifikace nádorů

Nádorová buňka je modifikovaná fyziologická buňka, která si zachovává některé z původních vlastností. Novodobá WHO (*World Health Organization*) klasifikace nádorů proto vychází z původu nádorové tkáně, dále také podle orgánové lokalizace a biologického původu (Adam a kol., 2003).

Podle **původu nádorové tkáně** rozlišujeme 5 základních kategorií: nádory epitelové, mezenchymové, hematopoetické, nádory s víceliniovou diferenciací a neklasifikované nádory (Adam a kol., 2003).

Podle **orgánové lokalizace** rozlišujeme velké množství nádorů. Mezi vůbec nejčastější nádory patří nádory prsu, plic a průdušek, prostaty, tlustého střeva a rekta a slinivky (Siegel a kol., 2018).

Podle **biologického hlediska** dělíme nádory na benigní a maligní, jež se navzájem odlišují rychlostí proliferace, lokálně infiltrativním a destruktivním růstem, tvorbou metastáz a architekturou tkáně. Pro benigní nádory je typický pomalejší a expanzivní růst, dále také ohraničený růstový potenciál. Maligní nádory se vyznačují rychlým, destruktivním a invazivním růstem a schopností metastazovat (Adam a kol., 2003).

Jedním z měřítek pro zařazení nádoru do příslušné kategorie je také **morfologický obraz podpůrného stroma** (Pietras a Östman, 2010).

2.3 Adenokarcinom pankreatu

Adenokarcinom pankreatu se řadí mezi nejagresivnější nádory vůbec. Celkový medián přežití je jeden rok od diagnózy, neboť se ve většině případů podaří nemocné diagnostikovat až v pokročilém stádiu (Thota a kol., 2014). Jedná se o 5. nejčastější typ rakoviny a předpokládá se, že do roku 2030 bude druhou hlavní příčinou úmrtí na nádorová onemocnění (Ryan a kol., 2014; Cohen a kol., 2015). U 5-10 % případů bývá prokázána dědičnost (Salo-Mullen a kol., 2015).

Typickým rysem nádoru je hypoxie a deprivace živin. Rozsah podpůrného stroma je velmi často větší než epiteliární složka nádoru, může tvořit až 80 % nádoru. Husté a fibrotické nádorové mikroprostředí utlačuje cévy a vytváří vysoký intersticiální tlak, což omezuje vaskularitu nádoru. Aby pankreatické nádorové buňky udržely vysokou proliferaci, vyžadují velké množství energie, proto se adaptují na náročné podmínky pro přežití v mikroprostředí karcinomu. V reakci na nedostatek kyslíku a vysokou náročnost na ATP dochází ke zvýšení anaerobní glykolýzy. Pankreatický adenokarcinom je považován za nádor s velmi špatnou prognózou a nejhorší prognózou mezi maligními nádory trávicího traktu. V důsledku hypoxie a dalších mechanismů je adenokarcinom pankreatu vysoce invazivní nádor s časným metastatickým potenciálem (Cohen a kol., 2015).

Karcinom slinivky břišní je vysoce odolný vůči chemoterapeutické i cílené léčbě (Schevchenko a kol., 2013). Pro svoji agresivitu byl vybrán jako výchozí model v experimentech této diplomové práce.

2.4 Možnosti léčby nádorových onemocnění

Léčba maligních chorob znamená pro pacienta obrovskou zátěž, neboť je zaměřená na buňky vzniklé transformací vlastních buněk. Skoro vždy proto dochází k napadání i fyziologických buněk a tkání (Adam a kol., 2003). Mezi základní metody léčby nádorových onemocnění patří chirurgická, radiologická, chemoterapeutická, cílená léčba a jejich kombinace (Miller a kol., 2016).

Kromě samotné protinádorově zaměřené léčbě je důležitou součástí i **léčba paliativní**, jejímž zaměřením je zmírnění symptomů vyvolaných jak nádorem samotným, tak onkologickou léčbou. Paliativní péče v onkologii si dává za cíl zmírnění tělesných a psychosociálních symptomů a celkové zlepšení kvality života (Hui a kol., 2015).

2.4.1 Chirurgická léčba

Chirurgické metody jsou stále nepřekonaným základem nádorové terapie. Chirurgickou léčbu můžeme rozdělit na **radikální** s cílem vyléčit nádor a **paliativní**, jež se zaměřuje na odstranění příznaků (Kala a kol., 2011). Chirurgie se tedy uplatňuje při diagnostice, léčbě i paliativní péči. U pokročilých stádiích onemocnění, u nichž lze předpokládat systémovou diseminaci, jsou chirurgické metody již součástí komplexní léčby (Adam a kol., 2003).

2.4.2 Radiologická léčba

Radioterapie využívá k léčbě nádorů ionizační záření – elektromagnetické (fotonové) nebo korpuskulární (hadronové, elektronové). Nejčastěji je využívána léčba fotonovými svazky. Podle místa účinku můžeme radiační terapii rozdělit na **zevní radioterapii** a vnitřní radioterapii neboli **brachyterapii** (Dvořák, 2014).

V důsledku ozáření tkáně dochází k ionizaci molekul. V případě **přímého účinku radiace** reagují fotony, či elektrony s molekulou DNA přímo. DNA je ionizací velmi poškozena, což má na buňky letální účinek. Ve většině případů je ale letální účinek radiace způsoben **nepřímo ionizujícím účinkem radiace**. Nepřímá ionizace ionizuje vodu, ze které se buňka z velké části skládá, a tím způsobuje vznik kyslíkových radikálů. Kyslíkové radikály jsou velice reaktivní a poškozují DNA. Buňka s naakumulovanými závažnými poruchami

DNA již není schopna projít mitózou a umírá. U rychle proliferujících buněk se poškození způsobené radiací projevuje dříve než u pomaleji proliferujících buněk. (Adam a kol., 2003).

Nežádoucími účinky radiologické léčby, kterým se nelze zcela vyhnout, jsou poškození i zdravé tkáně a vznik duplicitních nádorů, proto by radioterapie měla být kompromisem mezi dávkou nutnou k vyléčení a dávkou poškozující zdravou tkáň (Hynková a Doleželová, 2008).

2.4.3 Chemoterapeutická léčba

Chirurgie i radioterapie zabíjejí a poškozují nádorové buňky jen cíleně v určitých oblastech. Chemoterapie naopak působí po celém těle a je tedy vhodná i k léčbě metastáz vzdálených od primárního nádoru. Chemoterapeutické léky se využívají k záměru vyléčení, zmenšení novotvarů i ke zmírnění potíží (Cheung-Ong a kol., 2013).

Chemoterapeutické léky působí na buňky v různých fázích buněčného cyklu a jejich účinkem je následné omezení nebo inhibice buněčné proliferace. Nádorové buňky mají tendenci rychlé proliferace, což z nich činí dobrý cíl pro chemoterapeutické látky. Nicméně se jedná o léčbu nespecifickou a dochází k poškození i zdravých buněk a tkání, z čehož vyplývá řada nežádoucích účinků (Klener, 2008).

Protinádorová chemoterapie má i svá omezení. Primární příčinou selhávání této terapie je vrozená, či získaná rezistence nádoru na léčivo, která často vede k recidivám. Musí se brát zřetel na poškození zdravých tkání, některé léky mohou poškodit i buňky srdce, ledvin, plic, nervového systému a močového měchýře (Cheung-Ong a kol., 2013).

Síla vedlejších nežádoucích účinků může být snížena kombinací chemoterapeutik s různými účinky působení a s nepřekrývajícími se toxicitami (Cheung-Ong a kol., 2013).

2.4.4 Cílená léčba

S poznáváním molekulárních mechanismů a metabolických rozdílů mezi fyziologickou a nádorovou buňkou se rozvíjí relativně mladá cílená léčba. Tato molekulárně zaměřená léčba cílí na specifické inhibitory kancerogeneze. Působí pouze na specifické části nádorových buněk, které je odlišují od buněk zdravých. Mezi nejrozšířenější cílené léky patří monoklonální protilátky a inhibitory proteinkináz (Goněk a Kozáková, 2014).

2.4.5 Imunoterapie

Nádorová imunoterapie využívá v boji proti tumorům mechanismů imunitního systému. Mezi základní pilíře protinádorové imunoterapie úspěšně užívané již řadu let patří nádorově specifické protilátky. Další strategií imunoterapie je stimulace nespecifické imunity imunomodulačními látkami, jež vyvolávají protinádorovou imunitní odpověď (Vitásková a Melichar, 2015). Vztahu a interakcím imunitního systému s nádorovými buňkami jsou věnovány následující kapitoly.

2.5 Imunitní systém

Imunitní systém hraje zásadní a nenahraditelnou roli v obraně organismu před potenciálními hrozbami nejenom vnějšího, ale také vnitřního původu. Vyvinul se původně k boji s virovými a bakteriálními infekcemi, ovšem chrání organismus i před jinými nebezpečími, například likviduje poškozené nebo odumírající buňky. Nádorové buňky představují pro organismus obrovskou hrozbu a měli by být imunitním systémem rozpoznány a následně zničeny. Přesto bývají nádorové buňky tolerovány, ba dokonce chráněny imunitním systémem stejně jako buňky fyziologicky normální, to je dáno podobností nádorových buněk buňkám normálním. Rakovinné buňky mají navíc řadu mechanismů, kterými se úspěšně brání imunitnímu ataku (Corthay, 2014; Hořejší, 2015).

2.5.1 Mechanismy imunitního systému

Odpověď organismu na nebezpečí a poškození tvoří velmi složitá a vzájemně propojená soustava obranných reakcí. Imunitní systém funguje na mnoha úrovních. Pro přehlednost se dělí do dvou základních složek – vrozenou a adaptivní. Musíme mít ale na paměti, že imunitní odpověď je velmi komplexní a jednotlivé složky jsou propojeny na mnoha úrovních. Dělení proto slouží spíše pro studijní účely a snadnější pochopení.

2.5.1.1 Anatomické a fyziologické bariéry

První a rozhodující obrannou linií proti patogenům zajišťují anatomické a fyziologické bariéry těla. Ochranu na úrovni přirozených bariér zajišťuje kůže, mukociliární clearance, pH, teplota, slzy, sliny a jiné tělní sekrety (Turvey a Broide, 2010).

2.5.1.2 Vrozená imunita

Vrozená imunita se vyznačuje velmi rychlou odpovědí, zánětlivá reakce se vyvíjí během několika minut. Imunitní odpověď vrozené imunity se rozvíjí po rozpoznání povrchových struktur mikroorganismů souhrnně nazvaných **PAMPs** (*Pathogen Associated Molecular Patterns*) a signálů poškození tzv. vzory **DAMPs** (*Damage Associated Molecular Patterns*). DAMPs jsou uvolňovány během lýzy buněk nebo jejich poškození. K rozpoznání PAMP/DAMP slouží pouze omezený počet tzv. PRR receptorů (*Pattern Recognition Receptor*), z čehož vyplývá ne-specifita vrozené imunity. PRR receptory jsou ale specifické pro vysoce konzervované struktury exprimované velkým množstvím mikroorganismů a pro běžné důsledky infekce, čímž je tato „ne-specifita“ vykompenzována. Odpověď na signály PAMP/DAMP je velice komplexní a zahrnuje téměř všechny tělní systémy. **PRR receptory** jsou vyjádřeny na membránách všech buněk těla s nejvyšší hustotou na buňkách vrozené imunity. Dále je můžeme nalézt na vnitrobuněčných kompartmentech, zejména na endosomech, i volně rozptýlené v cytoplasmě (Turvey a Broide, 2010).

Další strategií nespecifické imunity je **downregulace MHC molekul I. třídy**. MHC I molekuly jsou exprimovány všemi zdravými buňkami. Dojde-li k infekci buňky mikroblem, buňka sníží svoji expresi MHC I molekul, tento jev nastává rovněž často i u nádorových buněk. Ústřední roli v likvidaci buněk se sníženou expresí MHC I hrají NK (*Natural Killers*) buňky (Carrillo-Bustamante a kol., 2015).

Buněčná složka vrozené imunity je tvořena fagocyty (monocyty, makrofágy, dendritické buňky, mastocyty, neutrofilů, eozinofilů), cytotoxickými NK buňkami a epiteliárními buňkami (př. kůže nebo dýchacího traktu). Neméně důležitou součástí vrozené imunity je **složka humorální** (složky komplementu, MBL-lektin vázající manózu, antimikrobní peptidy, C-reaktivní protein a další složky akutní fáze), která obvykle vede k aktivaci komplementového systému (Turvey a Broide, 2010).

Donedávna se předpokládalo, že imunologická paměť je otázkou pouze adaptivní imunity. Hromadí se ale důkazy, že opakovaná expozice vede nejen ke zlepšení specifické imunologické paměti, ale také ke zlepšení odpovědi zprostředkované vrozenou imunitou. Hovoříme o tzv. trénování imunity, které je definováno jako zvýšení reakce na sekundární infekci (Netea a kol., 2011). Předpokládá se, že zvýšená odpověď makrofágů, monocytů a NK buněk při sekundární infekci je následkem epigenetických změn (Netea a kol., 2016).

2.5.1.3 Adaptivní imunita

Vrozená imunita zajišťuje rychlou odpověď na širokou škálu patogenů, repertoár patogenních molekulových vzorů, které je schopna rozeznat, je ale značně omezený. Variabilita patogenních antigenních struktur a schopnost patogenů mutovat si žádala vývoj adaptivní imunity. Adaptivní imunitní systém, také nazývaný specifický, poskytuje širší a specifičtější zásobu receptorů, ale její aktivace trvá déle (několik hodin až dnů). Obrovské množství receptorů je dáno somatickými rekombinacemi spousty genových segmentů. Adaptivní imunita je zajištěna B a T lymfocyty ve spolupráci s hlavním histokompatibilním systémem (MHC) a buňkami prezentující antigen (APC). Molekuly MHC I. třídy se vyskytují na všech buňkách a prezentují antigen CD8⁺ buňkám (cytotoxické Tc lymfocyty), MHC II molekuly se vyskytují pouze na APC (dendritické buňky, B-lymfocyty, makrofágy) a prezentují antigen CD4⁺ buňkám (pomocné Th lymfocyty). Aktivace adaptivního imunitního systému je komplexem mnoha systémů, jehož výsledkem je klonální proliferace specifických T a B lymfocytů a jejich diferenciaci na cytotoxické efektorové T buňky, plazmatické B buňky produkující specifické protilátky a paměťové B a T buňky (Bonilla a Oettgen, 2010).

Vedle obrovské diverzity a specifity se adaptivní imunita vyznačuje schopností imunologické paměti. Při prvním setkání lymfocytů s patogenem se kromě efektorových a plazmatických buněk diferenciují i buňky paměťové. Tyto paměťové buňky se při opětovné infekci stejným patogenem aktivují rychleji a poskytují tak rychlejší a robustnější odezvu. Paměťové buňky mají dlouhou životnost, některé přežívají i po celý lidský život. Dokáží tak zajistit až doživotní imunitu (Bonilla a Oettgen, 2010).

2.6 Nádor vs. imunitní systém

Imunitní systém využívá řadu mechanismů, kterými eliminuje cizí nebezpečné patogeny, také musí umět rozpoznat vlastní od cizího a tolerovat vlastní tkáně a orgány. Jelikož nádorové buňky vznikají transformací vlastních buněk, sdílejí s nimi také většinu povrchových antigenů, které jsou imunitním systémem tolerovány (Hořejší, 2015). Nádory, které mutacemi nevytvoří dostatečné množství odlišných antigenů, nejsou vyhodnoceny jako potenciální nebezpečí, neboť jsou pro imunitní systém málo imunogenní. Pokud je však odlišnost v antigenních strukturách nádoru dostatečně veliká, je imunitní systém schopen nádor rozpoznat. V boji proti nádoru se pak mohou podílet v podstatě všechny mechanismy vrozené (neutrofily, aktivované makrofágy, NK buňky) i specifické (opsonizační protilátky

aktivující komplement, fagocytózu a buněčnou cytotoxicitu, zánětlivé Th1 a cytotoxické Tc lymfocyty) imunity (Šťastný a Říhová, 2015).

2.6.1 Nádorové antigeny

Jak již bylo zmíněno, základním předpokladem pro imunitní reakci proti nádorům je existence povrchových nádorových antigenů, které by umožnily rozpoznání nádorových buněk imunitním systémem. Podle specifity můžeme nádorové antigeny rozdělit do dvou tříd: antigeny specifické pro nádory a antigeny s nádory asociované (Hořejší, 2015).

Antigeny specifické pro nádory (TSA) jsou antigeny s vysokou nádorovou specifitou, neboť na netransformovaných buňkách se vůbec nevyskytují. Do třídy TSA můžeme zahrnout abnormální – nádorově specifické fragmenty produktů vniklých bodovými mutacemi nebo fragmenty onkogenních virů. Tyto fragmenty jsou prezentované společně s MHC molekulami I. třídy a indukují nádorově specifickou T buněčnou odpověď. Jako antigeny s vysokou nádorovou specifitou mohou fungovat také abnormální glykoproteiny vyskytující se na povrchu nádorů. (Vigneron, 2015).

Antigeny asociované s nádory (TAA) můžeme, na rozdíl od TSA, nalézt nejen na nádorových buňkách, ale také na normálních buňkách. Mají proto nízkou nádorovou specifitu, jejich detekce je přesto velmi užitečná. TAA slouží jako nádorové markery. Řadíme sem antigeny odvozené od proteinů nacházejících se i v tkáních, ze kterých příslušný nádor pochází. Dále také antigeny, které jsou exprimované na všech tkáních, ale na nádorech je jejich množství podstatně vyšší (Vigneron, 2015).

2.6.2 Nádorová imunoeditace

Imunitní systém má schopnost svými mechanismy potlačit i podpořit nádorový růst. Tato dvojrole imunitního systému bývá vysvětlována nádorovou imunoeditací. Během imunoeditace prochází vztah mezi imunitním systémem a nádorovými buňkami třemi fázemi. Tento vztah bývá někdy nazýván také jako teorie 3E, z anglického *elimination, equilibrium, escape* – tedy eliminace, rovnováha a únik (Mittal a kol., 2014).

V eliminační fázi dochází ve spolupráci vrozené a adaptivní imunity k detekci nádorových buněk a likvidaci nádoru ještě, než se stane klinicky významným. Během fáze eliminace dochází k selekci nádorových buněk se sníženou imunogenitou, které unikají

imunitní destrukci a dostávají se tak do další fáze. **Ve fázi rovnováhy** se objevují nové varianty nádorových buněk nesoucí nové mutace, které zvyšují jejich odolnost vůči imunitnímu ataku. Imunitní systém eliminuje více imunogenní varianty, naopak méně imunogenní nádorové buňky imunitnímu systému unikají. Nedochází tak ke kompletní eliminaci rakovinných buněk, ale jejich schopnost nekontrolovatelného růstu a metastazování je držena pod kontrolou. Fáze rovnováhy tak může být různě dlouhá, někdy může trvat i několik let (Kim a kol., 2007). Díky imunoselekčnímu tlaku získávají nádorové buňky schopnost zcela uniknout imunitnímu systému a dostávají se tak do **fáze úniku**. Proto jakmile se nádor stává klinicky detekovatelným, vlastní již řadu mechanismů umožňujících únik imunitní odpovědi (Teng a kol., 2015).

2.6.3 Protinádorové mechanismy imunitního systému

Mezi nejdůležitější imunitní protinádorové mechanismy patří **cytotoxické T lymfocyty (Tc)**. T buněčná imunitní odpověď je zahájena navázáním T buněk na antigenní peptidy zpracovaných nádorových antigenů prezentovaných v komplexu s MHC molekulami. Uvolňované nádorové antigeny jsou zachyceny, zpracovány a prezentovány na povrchu antigen prezentujících buněk v komplexu s MHC I respektive II. třídy. Jako takové APC fungují hlavně dendritické buňky, případně makrofágy nebo aktivované B lymfocyty. Fragmenty nádorových antigenů prezentované APC mohou být následně rozpoznány antigenně specifickým receptorem T buněk (TCR). K tomu, aby došlo k protinádorové odpovědi a nebyla vyvolána tolerance, musí být tento krok doprovázen kostimulačními signály (kostimulační molekuly CD80/86 a prozánětlivé cytokiny APC). Po navázání antigenu TCR začnou prekurzory Tc proliferovat a diferenciovat se ve zralé klony efektorových cytotoxických Tc buněk. Zralé Tc již mohou cytotoxicky zabíjet (uvolní obsah svých granulí, které způsobí lýzu buňky) nádorové buňky, které mají na svém povrchu prezentované MHC s fragmenty příslušných antigenů. Některé nádorové buňky mohou mít na svém povrchu apoptický receptor-Fas. Interakce Fas-ligandu (FasL) aktivovaných Tc buněk s receptorem Fas aktivuje apoptické mechanismy napadené nádorové buňky (Chen a Mellman, 2013; Hořejší, 2015).

Velmi důležitou pozici v protinádorové odpovědi zaujímají **NK buňky**, které mají silnou cytotoxickou aktivitu. K dosažení protinádorové aktivity nevyžadují NK buňky selekci nebo klonální expanzi. Na rozdíl od lymfocytů, NK buňky nemají antigenně specifické receptory. NK buňky rozlišují nádorové buňky od zdravých buněk prostřednictvím jednak

inhibičních receptorů specifických pro MHC I. Vazba inhibičních receptorů s MHC I inhibuje degranulaci cytotoxických granul a chrání tak zdravé buňky před jejich atakem. Druhým rozlišovacím mechanismem je vazba aktivačních receptorů s ligandy spojenými s buněčným stresem. Nádorové buňky, které mají sníženou expresi MHC molekul I. třídy a zvýšené množství povrchových signálních molekul (př. NKG2D) rozeznávaných aktivačními receptory, poskytují dostatečnou signalizaci k aktivaci NK buněk (Vitale a kol., 2014). Druhý způsob spuštění degranulace NK buněk zahrnuje interakci Fc receptoru NK buněk s Fc fragmentem protilátek navázaných na povrchu nádorových buněk. Hovoříme o tzv. ADCC- na protilátkách závislé cytotoxicitě (Hořejší, 2015). Jiná cesta aktivace NK buněk zahrnuje vazbu apoptických receptorů nádorových buněk s FasL na NK buňkách, což vede k apoptóze cílových buněk (Smyth a kol., 2005).

V protinádorové reakci se uplatňují také **protilátky**. Pro tvorbu vysokoafinitních protilátek je potřeba nejen vazba specifických B lymfocytů na povrchové TSA nebo TAA antigeny, ale i kostimulační signály pomocných Th lymfocytů, pro jejichž aktivaci je důležitá prezentace nádorových antigenů v komplexu MHC molekulami antigen prezentujícími buňkami. Protilátky nádorové buňky opsonizují, a tím umožňují a zvyšují jejich fagocytózu (především neutrofilními granulocyty N1 a makrofágy M1). Zprostředkovávají také ADCC NK buňkami a aktivují komplement, který napomáhá opsonizaci, chemotaxi fagocytárních buněk a lýze buněk membranolýtickým komplexem (Hořejší, 2015).

Nádory jsou obvykle značně infiltrovány **makrofágy**, jejichž hlavní funkcí je fagocytóza a produkce několika cytokinů. Podílejí se také na vzniku zánětlivých reakcí. Klasické makrofágy subtypu M1, které účinně fagocytují poškozené buňky a podílejí se na vzniku zánětu, vznikají pod vlivem interferonu- γ (IFN- γ) jako výsledek aktivace pomocnými Th1 buňkami. V nádorovém mikroprostředí se ale pod vlivem interleukinu-4 (IL-4) a interleukinu-13 (IL-13) aktivují v alternativní subtyp M2 jako výsledek aktivace Th2 buňkami. Na rozdíl od M1 makrofágů, které produkují prozánětlivý IL-12, M2 makrofágy produkují především protizánětlivý IL-10 a TNF- β (*Tumor necrosis factor β* „faktor nádorové nekrózy“). Podporují tak nádorový růst, nádorovou angiogenezi, invazi a metastazování. Makrofágy asociované s nádory mají proto na protinádorovou imunitní odpověď spíše negativní vliv, poněvadž bývají především typu M2 (Qian a Pollard, 2010).

Neutrofilny zajišťují první linii obrany proti infekcím. Nádorové buňky a stromální buňky nádoru vylučují řadu chemokinů, které způsobují migraci neutrofilů do nádoru. Zde mohou fagocytovat nádorové buňky, produkovat neutrofilní extracelulární síť (NET), reaktivní formy kyslíku (ROS) a řadu cytokinů a chemokinů, kterými přitahují další imunitní

buňky. Jejich funkce je zde přesto spíše negativní. Nádory produkují faktory, kterými řídí přeměnu protinádorově polarizovaných N1 neutrofilů na pronádorové N2 typy. N2 neutrofilů během progresu nádoru uvolňují faktory, kterými stimulují nádorovou proliferaci (Liang a Ferrara, 2016).

2.6.4 Strategie úniku nádorů imunitnímu systému

Nádory během svého vývoje nabývají různých způsobů, kterými moduluji imunitní reakce. Imunitní systém vlastní mechanismy, kterými chrání zdravé tkáně před autoimunitními reakcemi, čehož některé nádorové buňky využívají k úniku před imunitním dozorem.

V důsledku genetických změn, kterými nádorové buňky procházejí během jejich expanze, ztrácejí nádory své povrchové antigeny. Imunoselekční tlak zajistí, že přežívají jen málo imunogenní varianty nádorových buněk, které nemá imunitní systém čím rozpoznat (Teng a kol., 2015).

Nádorové buňky prezentující nádorové antigeny mohou své antigeny maskovat molekulami glykokalyxu, neboť často syntetizují více glykokalyxových molekul než buňky zdravé (Šťastný a Říhová, 2015).

Nádorové antigeny jsou imunitním buňkám prezentovány v komplexu s MHC molekulami. Některé nádorové buňky snižují nebo dokonce ztrácejí expresi MHC-I. Nemohou tak na nich být prezentovány antigeny cytotoxickým T lymfocytům, čímž unikají T buněčné efektorové odpovědi (Garrido a kol., 2016).

Nádory se aktivně brání imunitnímu dozoru produkcí imunosupresivních molekul a cytokinů (např. TGF- β nebo IL-10), které utlumují nebo zcela inhibují funkci efektorových T lymfocytů, případně chemoatrakují subpopulace buněk podporující nádorový růst (Šťastný a Říhová, 2015). Například nádorově asociované makrofágy typu M2 nebo neutrofilů typu N2, které mění nádorové prostředí a podporují nádorovou proliferaci (viz kapitola 2.6.3).

Některé nádorové buňky ligují kontrolní body tzv. *checkpointy* imunitního systému (např.: CTLA-4, PD-1, LAG-3 nebo TIM-3). Kontrolní body se vyskytují na povrchu aktivovaných T buněk a vážou se na ligandy vyskytující se především na APC. Kontrolní body jsou nezbytné pro udržení tolerance vůči vlastním antigenům, regulují imunitní odpověď a zabraňují nadměrné imunitní reakci. Jejich ligací aktivně blokují imunitní odpověď a aktivují

regulační T lymfocyty (Treg). Treg buňky se podílejí na regulaci imunitní odpovědi. Potlačují aktivitu jiných typů T lymfocytů a produkují inhibiční cytokiny, jako jsou IL-10, IL-6 nebo TGF- β (Klabusay, 2015).

Důležitou únikovou strategií nádorů je snížení exprese apoptického Fas receptoru na jejich povrchu, unikají tak vlastní apoptóze. Naopak mohou na svém povrchu prezentovat Fas-ligand a indukovat tím apoptózu v infiltrujících T-lymfocytech a NK buňkách, které exprimují Fas (Šťastný a Říhová, 2015).

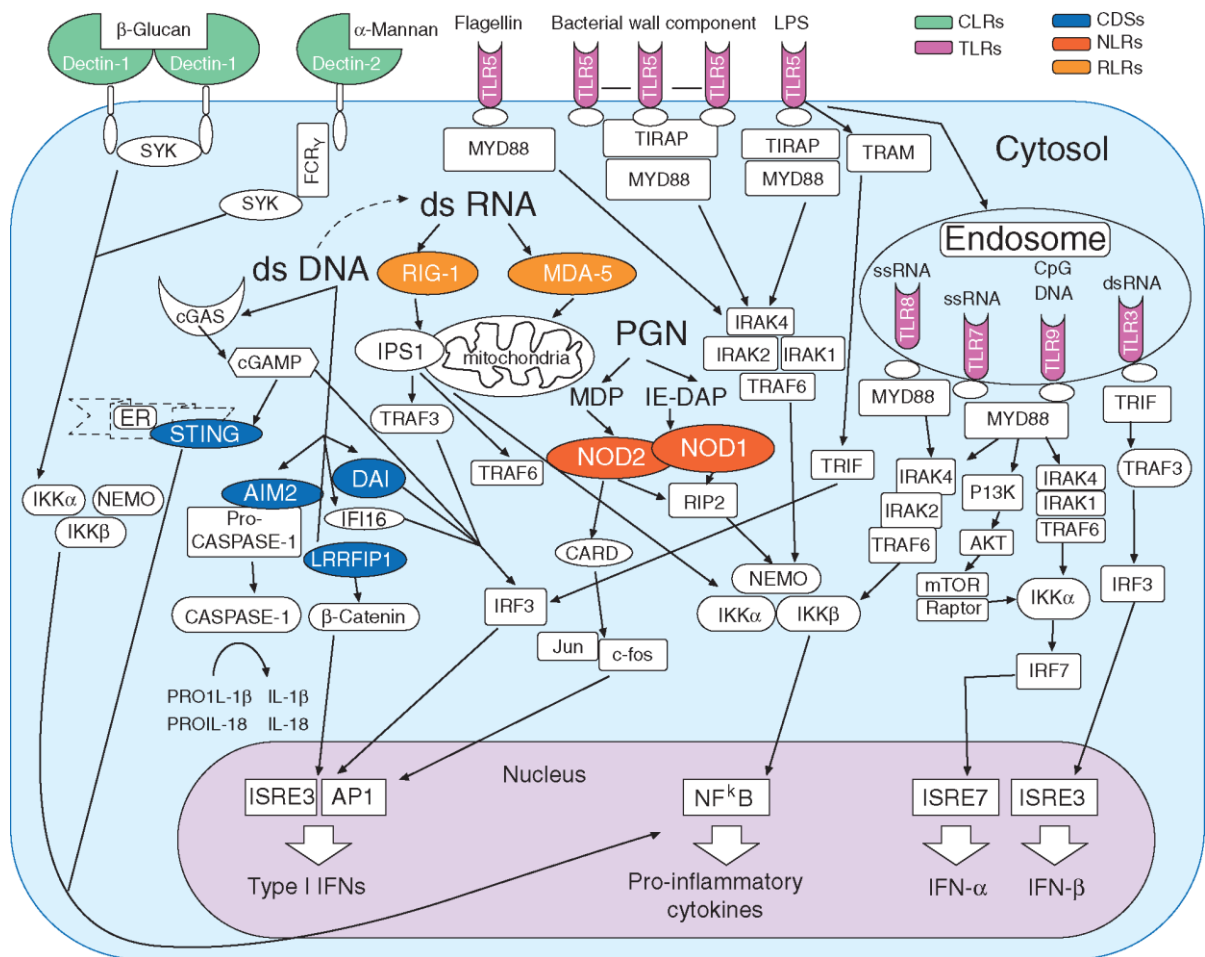
Špatná prognóza nádorů bývá také spojována s akumulací MDSC (myeloidní supresorové buňky) v nádorovém mikroprostředí. MDSC inhibují T buněčnou odpověď několika způsoby. V místě nádoru bývá aktivita MDSC antigenně nespecifická a zprostředkována především produkcí volných radikálů a oxidu dusnatého, které inhibují T buněčnou odpověď. MDSC také produkují protizánětlivý IL-10 a podporují vývoj Treg buněk (Nagaraj a Gabrilovich, 2008).

2.7 Imunoterapie stimulací vrozené imunity

V kapitole 2.5.1.2 bylo zmíněno, že vrozený imunitní systém rozpoznává patogenní mikroorganismy svými PRR receptory, které se váží na konzervované povrchové molekuly mikroorganismů, tedy na PAMPs molekuly. Skutečností, že vazba PAMP na PRR vyvolá imunitní odezvu s následnou degradací mikroorganismů, je využito v této diplomové práci. Podle studie Underhilla a Gantera dochází k nejsilnější nespecifické imunitní odpovědi při současném použití ligandů Toll-like receptorů a ligandů stimulujících fagocytózu (Underhill a Ganter, 2004). Roli PAMPs zde hrají resiquimod, kyselina lipoteichoová a kyselina polyinosinová:polycytidylová, jakožto ligandy Toll-like receptorů, a manan, jakožto ligand stimulující fagocytózu. Následující kapitoly se zaměřují na jejich účinky a receptory, které ligují.

2.7.1 Pattern recognition receptors – PRRs

Funkcí PRRs je regulace imunitního systému, proto je v hojném množství nalézáme především na buňkách imunitního systému. Nalezneme je ale i na neprofesionálních ne-imunitních buňkách. Výsledkem aktivace PRR je exprese regulačních cytokinů a interferonů typu II. Rozlišujeme několik rodin: transmembránové Toll-like receptory (TLR), a C-lektinové receptory (CLR), dále cytoplazmatické RIG-I-like receptory (RLR), NOD-like receptory (NLR) a DNA senzory (Shekarian a kol., 2017). Signalizační cesty jednotlivých PRR po rozpoznání signálů nebezpečí/poškození (PAMPs/DAMPs) jsou zobrazeny na obrázku 1.



Obr. 1: Signalizační dráhy aktivovaných PRRs stimulovaných molekulárními vzory PAMPs a DAMPs (Shekarian a kol., 2017).

2.7.1.1 Lektinové receptory typu C (CLRs)

CLRs představují velkou skupinu receptorů. Charakteristické jsou pro ně Ca^{2+} -dependentní domény rozpoznávající sacharidy (CRD). Uplatňují se proto především v antifungální imunitní obraně. Některé CLR mohou mít CRD-like doménu (CTDL), které nemusí nutně vázat jen sacharidové ligandy. V závislosti na signalizačních motivech v jejich CRD a CTDL doménách mají mnoho různých funkcí. Mohou indukovat fagocytární, endocytární, antimikrobní, protizánětlivou i prozánětlivou odpověď (Hoving a kol., 2014). Podle molekulární struktury můžeme rozlišit transmembránové CLRs (př. manózový receptor) a sekretované CLRs, jejichž příkladem je lektin vázající manózu (Shekarian a kol., 2017).

- **Manózový receptor (MR)**

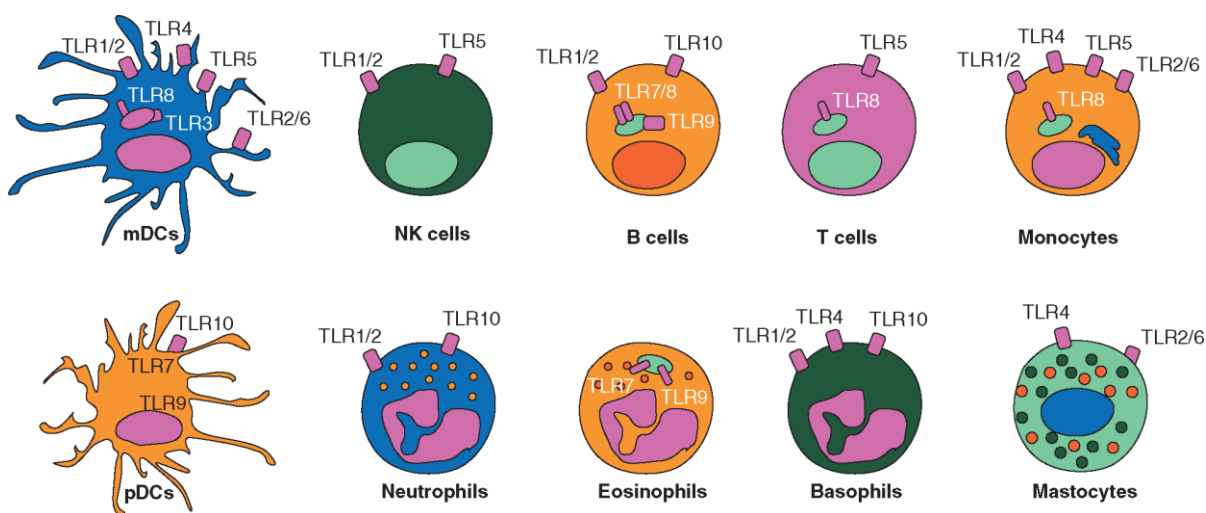
Manózový receptor se nachází u některých populací makrofágů, dendritických buněk a některých buněk endotelu. MR je transmembránový receptor se třemi typy extracelulárních domén. Obsahuje dokonce dvě nezávislé domény vázající sacharidy. N-terminální CR doména bohatá na cystein váže sulfátové sacharidy, Ca^{2+} -dependentní domény (CRD) váží manosylované sacharidy. Třetí fibronectin II (FNII) doména váže kolagen a zprostředkovává internalizaci kolagenu prostřednictvím makrofágů (Miller a kol., 2008). Vazba ligandů na MR zajišťuje vysoce efektivní endocytózu, podporu prezentace antigenu i modulaci buněčné aktivity (Martinez-Pomares, 2012).

- **Lektin vázající manózu (MBL)**

Lektin vázající manózu je plazmatický protein syntetizovaný buňkami jater, jež je velmi důležitou součástí vrozené imunity. Patří mezi kolektiny, neboť obsahuje kolagenovou i lektinovou doménu. Váže množství sacharidů (př. i manózu), rozeznává tak širokou škálu mikroorganismů. V oběhu cirkuluje v komplexu se serinovými proteázami, jejichž prostřednictvím aktivuje po vazbě na ligand lektinovou dráhu komplementu. Aktivuje tak tvorbu membranolýtického komplexu a opsonizačních složek komplementu. MBL po vazbě na ligand se také může přímo vázat prostřednictvím kolektinového receptoru na fagocytární buňky, čímž zprostředkovává fagocytózu přímo (Takahashi a Ezekowitz, 2005).

2.7.1.2 Toll-like receptory (TLRs)

Toll-like receptory patří mezi transmembránové PRR. U lidí bylo identifikováno 10 TLR (TLR 1-10) a u myši 12 TLR (TLR 1-9 a TLR 11-13). Mohou být exprimovány jak na povrchu buňky (TRL 1, 2, 5 a 6), tak i na vnitrobuněčných kompartmentech, př. endosomech (TLR 3, 7, 8, 9 a 10). TLR 4 může být exprimován jak na cytoplasmatické membráně, tak i na endosomální membráně. Nalezneme je na membránách imunitních buněk (obrázek 2), také na endotelových nebo střevních epiteliálních buňkách (Shekarian a kol., 2017). Různé TLR rozeznávají různé ligandy, přehled všech TLR a jejich ligandů je zaznamenán v tabulce I.



Obr. 2: Expresse Toll-like receptorů lidskými imunitními buňkami (Shekarian a kol., 2017).

Každý TLR se skládá z extracelulární domény bohaté na leucinové repetice, transmembránové a cytoplasmatické Toll/IL-1 receptorové domény (TIR). Po aktivaci rozeznáním motivu PAMP/DAMP se spouští intracelulární signální dráhy přes jejich TIR doménu za pomoci adaptérových molekul, jako jsou MyD88, TRIF, TIRAP nebo TRAM (viz obrázek 1). Aktivace TLR vede k produkci prozánětlivých cytokinů, chemokinů a interferonu typu I. Aktivace TLR antigen prezentujících buněk zvyšuje jejich prezentaci antigenu a expresi kostimulačních adhezních molekul na jejich povrchu. TLR také hrají roli v aktivaci a diferenciaci B lymfocytů, mohou působit jako kostimulační receptory T buňkám nebo přímo či nepřímo modifikovat imunosupresivní funkce Treg buněk (Thompson a kol., 2011).

Tab. I: Přehled TLRs, jejich lokalizace, adaptorová molekula a příklady ligandů, které vážou (Kaczanowska a kol., 2013).

TLR	Buněčná lokalizace TLR	Adaptorová molekula	Ligand
TLR 1-2	Cytoplazmatická membrána	MyD88	Triacylové lipoproteiny, lipoteichoová kyselina, peptidoglykany, Zymosan, Pam ₃ CSK ₄
TLR 2-6	Cytoplazmatická membrána	MyD88	Diacylové lipoproteiny, kyselina močová, fibronectiny proteiny, HSPs, HMGB1, Pam ₃ CSK ₄
TLR 3	Endosomální membrána	TRIF	dsDNA, Poly IC
TLR 4	Cytoplazmatická membrána/endosomální membrána	MyD88/TRIF	Lipopolysacharid, kyselina lipoteichoová, fibronectin, β -defensin 2, HMGB1, tenascin C, snapin
TLR 5	Cytoplazmatická membrána	MyD88	flagelin
TLR 7-8	Endosomální membrána	MyD88	ssRNA, CpG-A
TLR9	Endosomální membrána	MyD88	Nemetylované CpG DNA
TLR10	Cytoplazmatická membrána	MyD88	Pam ₃ CSK ₄

2.7.2 Imunostimulační látky

- **Resiquimod (R-848)**

Resiquimod je nízkomolekulární syntetická molekula patřící mezi deriváty imidazolu. Bylo zjištěno, že R-848 funguje jako agonista TLR 7 a TLR 8 (u myši pouze TLR 7), ačkoliv přirozenými agonisty TLR 7 a 8 jsou ssRNA. Indukuje produkci IL-1, IL-6, IFN- α a TNF- α (faktor nádorové nekrózy), čím se řadí mezi antivirové i protinádorové imunomodulační látky (Dockrell a Kinghorn, 2001). V této diplomové práci byl použit R-848.HCl, kyselina chlorovodíková byla na resiquimod navázána, aby zvýšila jeho rozpustnost ve vodě.

- **Kyselina lipoteichoová (LTA)**

Kyselinu lipoteichoovou nalezneme v buněčné stěně Gram-pozitivních bakterií. LTA stimuluje imunitu prostřednictvím vazby na cytoplazmatický TLR-2 receptor, což vede

k produkci řady cytokinů, např. IL-12, IL-10 nebo TNF- α (Cleveland a kol., 1996; Wang a kol., 2000).

- **Kyselina polyinosinová:polycytidylová (Poly I:C)**

Poly (I:C) je synteticky připravený analog dvouvláknové RNA a je vázán jak TLR-3, tak RIG-1 receptory, jež se oba uplatňují v protivirové imunitě (Cheng a Xu, 2010). Aktivace obou receptorů zároveň vede k produkci prozánětlivých cytokinů i IFN typu 1 (Kawai a Akira, 2008).

- **Manan**

Manan může být lineární nebo rozvětvený polysacharid složený D-manóзовých a D-glukózových podjednotek spojených β -glykosidickou vazbou. Vyskytuje se v buněčné stěně kvasinek a vyšších rostlin (Cawley a Ballou, 1972; Moreira, 2008). Imunitním systémem je rozpoznáván transmembránovým manóзовým receptorem a plazmatickým lektinem vázajícím manózu. Aktivace těchto receptorů vede k účinné fagocytóze buněk s navázaným mananem (Shekarian a kol., 2017).

2.7.3 Biokompatibilní kotva BAM

BAM je ve vodě rozpustný derivát jednoho řetězce kyseliny olejové a polyethylenglykolu. Hydrofóbní kyselina olejová umožňuje ukotvení BAM do cytoplazmatické membrány savčích buněk. Hydrofilní polyethylenglykol usnadňuje rozpustnost molekuly ve vodě, navíc má na svém konci navázanou NHS skupinu (Kato a kol, 2004). V této diplomové práci jsou na NHS skupinu vázány ligandy, které tak mohou být ukotveny v cytoplazmatické membráně nádorových buněk.

3 CÍLE PRÁCE

- Analýza vlivu úpravy nádorového prostředí (pH, laktát) na účinnost imunoterapie
- In vitro studium příslušných mechanismů

4 MATERIÁL

4.1 Chemikálie

- BAM₄₀₀₀ (*Biocompatible anchor for cell membrane*), Mw 4000, NOF Europe
- D-MEM (*Dullbecco's modified eagle medium*), Biowest
- DMSO (*Dimethylsulfoxide*), Sigma-Aldrich
- EDTA (*Ethylenediaminetetraacetic acid*), Sigma-Aldrich
- FCS (*Fetal calf serum*), Biowest
- HCl (*Hydrochloric acid*), Sigma-Aldrich
- Lactate Assay Kit, Sigma-Aldrich
- Laktát sodný, Sigma-Aldrich
- LO (*Lactate oxidase*), izolovaný z *Pediococcus*, Sigma-Aldrich
- L2M (*Lactate 2-monooxygenase*), izolovaný z *Native Aerococcus viridans*, Shirley
- LTA (*Lipoteichoic acid*), izolovaná z *Bacillus subtilis*, Sigma-Aldrich
- Manan, Sigma-Aldrich
- NAD⁺ (*β-Nicotinamide adenine dinucleotide salt*), Sigma-Aldrich
- NaHCO₃ (*Sodium bicarbonate*), Sigma-Aldrich
- PBS (*Phosphate buffered saline*), Sigma-Aldrich
- Poly I:C (*Polyinosinic:polycytidylic acid*), Sigma-Aldrich
- R-848 (*Resiquimod*), Toris
- Trypanová modř, Sigma-Aldrich
- Trypsin, Sigma-Aldrich

4.2 Laboratorní myši

Pro experimenty byly pořízeny samice kmene C57BL/6N z chovu Charles River Laboratories. Po celou dobu byly chovány za standartních podmínek s neomezeným přístupem ke sterilní vodě a sterilní potravě. Umístěny byly ve zvěřinci se stálou teplotou (22 °C), s vlhkostí vzduchu 65 % a fotoperiodou (12/12 h).

4.3 Linie pankreatického adenokarcinomu Panc02

Linie Panc02 byla darem profesora Partecke (*University of Greifswald*). Buňky byly kultivovány v D-MEM médiu (s obsahem 10 % FCS obsahujícím penicilin (100 U/ml),

streptomycin (100 $\mu\text{g/ml}$), amfotericin B (0,25 $\mu\text{g/ml}$), L-glutamin (2,2 mM) a merkaptoethanol (50 μM) při teplotě 37 °C v atmosféře nasycené 5 % CO_2 a vodními parami.

5 METODY

5.1 Příprava nádorových buněk

Z narostlé linie Panc02 bylo odstraněno kultivační médium a pro důkladné očištění byly buňky třikrát šetrně propláchnuty sterilním PBS (fyziologickým pufovaným roztokem). Následně byly adherované buňky uvolněny trypsinizací, a sice roztokem 0,02 % trypsinu a 0,02 % EDTA v PBS po dobu pěti minut při teplotě 37 °C. K ukončení trypsinizačního procesu bylo přidáno D-MEM médium s 10 % FCS. Uvolněné buňky byly rozsuspendovány Pasteurovou pipetou a spočítány v Bürkerově komůrce. K počítání množství buněk bylo použito malé množství roztoku buněk s Trypanovou modří, a to v poměru 1:1. Spočítány byly pouze živé buňky (mrtvé byly obarveny Trypanovou modří). Pro dosažení požadované koncentrace byla suspenze buněk nejdříve centrifugována (160 g, 4 °C, 5 min). Vzniklý supernatant byl odlit a pelet naředěn D-MEM médiem (s obsahem 10 % FCS obsahujícím penicilin (100 U/ml), streptomycin (100 µg/ml), amfotericin B (0,25 µg/ml), L-glutamin (2,2 mM) a merkaptoethanol (50 µM)) na výslednou koncentraci.

5.2 Transplantace Panc02

Transplantace buněk pankreatického adenokarcinomu byla provedena subkutánně do pravé části zad, a sice v množství 400 000 buněk ve 100 µl D-MEM bez séra na jednu myš. Pro snadnější manipulaci byly myši v místě transplantace nádorových buněk předem vyholeny.

5.3 Měření velikosti a výpočet objemů nádorů

Nádory byly měřeny za pomoci kaliperu každý druhý den po celou dobu léčby. Vždy byl měřen nejdelší (A) a nejkratší (B) rozměr. K výpočtu objemu nádorů byl využit vzorec $V = \pi/6 \cdot AB^2$ [mm³].

5.4 Syntéza manan-BAM₄₀₀₀

Syntéze mananu-BAM předcházela redukce mananu kyanoborohydridem sodným v roztoku octanu amonného při pH 7,5 a teplotě 50 °C. Po pěti dnech redukce byl roztok podroben dialýze přes dialyzační membránu (MWCO 3500, Serva) proti PBS po dobu

12 hodin. Takto byl získán roztok mananu-NH₂ v PBS, k němuž byl přidán 7,3 mM BAM v DMSO. Reakce probíhala po dobu 2 hodin (při pokojové teplotě a pH 7,3), poté byla zastavena 1 M roztokem TRIS/HCL. Následovala dialýza proti PBS (12 h). Získán byl 0,2 mM manan-BAM₄₀₀₀ v PBS, který byl skladován při teplotě -20 °C.

5.5 Syntéza R-848.HCl

R-848.HCl byl připraven smícháním resiquimodu s ekvimolárním množstvím 3,5 % HCl. Pro experimenty byla upravena koncentrace R-848.HCl na 0,5 mg/ml roztoku. Skladován byl při teplotě -20 °C.

5.6 Syntéza LO-BAM₄₀₀₀

Nejdříve byl připraven roztok LO v PBS (5 mg LO (100 U) doplněn na 0,5 ml pomocí PBS), k němuž byl následně přidán roztok BAM₄₀₀₀ (0,25 mg) v DMSO (9 µl). Syntéza LO-BAM probíhala při pokojové teplotě a pH 7,6 po dobu 1 hodiny. Následovala dialýza proti PBS po dobu 12 hodin. Získán byl roztok LO-BAM 200U/ml v PBS, který byl skladován při teplotě -20 °C.

5.7 Syntéza L2M-BAM₄₀₀₀

K roztoku L2M v PBS (5 mg L2M (100 U) doplněn na 0,5 ml pomocí PBS), byl přidán roztok BAM₄₀₀₀ (0,25 mg) v DMSO (9 µl). Syntéza L2M-BAM probíhala při pokojové teplotě a pH 7,6 po dobu 1 hodiny. Následovala dialýza proti PBS po dobu 12 hodin. Připraven byl L2M-BAM 200U/ml, který byl skladován při teplotě -20 °C.

5.8 Stanovení koncentrace laktátu pomocí *Lactate Assay Kit*

Pro stanovení koncentrace laktátu byl použit *Lactate Assay Kit* (Sigma-Aldrich). Součástí balení byl *Lactate Assay Buffer*, *Lactate Probe*, *Lactate Enzyme Mix*, *100 nmol/µl Lactate Standard*. Postupováno bylo podle návodu dodaného společně s kitem. K *Lactate Enzyme Mix* bylo přidáno 220 µl *Lactate Assay Buffer*. První byl připraven 1 nmol/µl standard smícháním 10 µl 100 nmol/µl *Lactate Standard* a 990 µl *Lactate Assay Buffer*. Připravený standard byl přidán v množství 0, 2, 4, 6, 8 a 10 µl do destičky (96 jamek,

ploché dno). Standard v jednotlivých jamkách byl doplněn na celkový objem 50 μ l pomocí Lactate Assay Buffer. Tím byly získány 0, 2, 4, 6, 8 a 10 nmol/jamka standardy. Měřené vzorky byly napipetovány do jamek v určitém množství a byly doplněny na celkový objem 50 μ l pomocí Lactate Assay Buffer. Do každé jamky, včetně standardů, bylo napipetováno 50 μ l Master Reaction Mix, který byl připraven smícháním Lactate Assay Buffer, Lactate Enzyme Mix a Lactate Probe v poměru 46:2:2. Všechny jamky byly promíchány opatrným propipetováním. Následně byla destička inkubována 30 minut na tmném místě. Po uplynutí inkubační doby byla změřena absorbance při 570 nm. Od všech získaných hodnot byla odečtena absorbance 0 nmol/jamka standardu, který sloužil jako Blank. Z naměřených hodnot standardů byla v MS excel sestavena kalibrační křivka, ze které byly vypočítány koncentrace laktátu v jednotlivých jamkách.

5.9 Analýza dat

Pro statistické vyhodnocení výsledků byl využit program STATISTICA 12. Data byla vyhodnocena pomocí Anovy a doplněna Tukey post-hoc testem. Data přežívání byla hodnocena Long-rang testem. Pro průměrný objem nádorů byla spočítána plocha pod křivkou (AUC) z grafu objemů nádorů v čase. Rozptyl dat je v grafech znázorněn střední chybou průměru (SEM).

5.10 Experimenty

5.10.1 Vliv vazby kotvy BAM na aktivitu laktát oxidázy

Připraven byl 1 mM roztok laktátu v PBS, který byl vytemperován na teplotu 37 °C. Následně byla připravena vodní lázeň s teplotou 95 °C. Odebráno a vloženo do vodní lázně na dobu 5 minut bylo 0,2 ml 1 mM laktátu (vzorek: Laktát 0 min). Poté bylo vždy smícháno 5 ml 1 mM laktátu s 5 µl enzymu. Roztok laktátu s enzymem byl inkubován a po 2, 5 a 10 minutách bylo odebráno 200 µl vzorku, který byl vždy vložen do vodní lázně na 5 min, tak došlo k inaktivaci enzymu. Přehled vzorků je shrnut v tabulce II.

Tab. II: Přehled roztoků 1 mM laktátu s LO/LO-BAM a dobou inkubace.

Vzorek	1 mM laktát	Enzym 200 U/ml	Doba inkubace
Laktát 0	Ano	-	0
A	Ano	LO	2 min
B	Ano	LO	5 min
C	Ano	LO	10 min
D	Ano	LO-BAM	2 min
E	Ano	LO-BAM	5 min
F	Ano	LO-BAM	10 min

Následně byla stanovena koncentrace laktátu podle postupu v kapitole 5.8. Pro stanovení bylo použito 10 µl vzorku. Všechny vzorky byly připraveny v dubletech. Z koncentrace laktátu v jednotlivých vzorcích bylo spočítáno množství zoxidovaného laktátu odečtením naměřené hodnoty od vzorku Laktát 0. Z těchto hodnot byla zjištěna aktivita enzymu, tedy množství zoxidovaného laktátu za minutu (µmol/min).

5.10.2 Pulzní terapie pankreatického adenokarcinomu Panc02 směsí manan-BAM + R-848 + POLY (I:C) + LTA v kombinaci s LO-BAM

Myším bylo transplantováno subkutánně 400 000 buněk Panc02. Terapie byla započata 12. den po transplantaci (den 0), kdy byly myším změřeny nádory a injikováno terapeutikum. Vždy bylo injikováno intratumorálně 50 µl terapeutika. Nádory byly měřeny obden až do ukončení léčby (den 30). Po ukončení léčby bylo sledováno přežívání myší do 130. dne. Složení jednotlivých terapeutických směsí a časové schéma aplikace je popsáno v tabulce III.

Tab. III: Složení terapeutických roztoků, den a množství aplikace.

Terapeutická směs	složení	Den aplikace	Množství
A (manan-BAM, Poly (I:C), R-848, LTA)	0,5 mg R-848 + 0,5 mg Poly (I:C) + 0,5 mg LTA/ml 0,2 mM manan-BAM v PBS	0, 1, 2, 8, 9, 10, 16, 17, 18, 24, 25, 26	50 µl i.t.
B (LO-BAM)	LO-BAM 20 U/ml PBS	0, 8, 16, 24	50 µl i.t.
	PBS	1, 2, 9, 10, 17, 18, 25, 26	50 µl i.t.
C (manan-BAM, Poly (I:C), R-848, LTA, LO-BAM)	LO-BAM 20 U/ml směsi A	0, 8, 16, 24	50 µl i.t.
	Směs A	1, 2, 9, 10, 17, 18, 25, 26	50 µl i.t.
D (PBS)	PBS	0, 1, 2, 8, 9, 10, 16, 17, 18, 24, 25, 26	50 µl i.t.

5.10.3 Stanovení změny koncentrace laktátu v nádoru v průběhu terapie směsí manan-BAM + R-848 + POLY (I:C) + LTA v kombinaci s LO-BAM

Pro tento pokus bylo využito celkem 9 myší, kterým bylo transplantováno subkutánně 400 000 buněk Panc02. 25. den po transplantaci jim bylo intratumorálně injikováno 50 µl roztoku LO-BAM (LO-BAM 20 U/ml PBS) podle schématu v tabulce IV. V čase 0, 2 a 4 hodiny po injikaci LO-BAM jim byly nádory změřeny, vypitvány (myši byly předem usmrceny), zváženy a následně přidány do 1 ml destilované vody. Jednotlivé vzorky nádorů v destilované vodě byly na 10 minut dány do předem připravené vodní lázně vytemperované na 95 °C. Tímto došlo k inaktivaci LO-BAM. Schéma pokusu je graficky znázorněno v tabulce IV.

Tab. IV: Aplikace LO-BAM a doba odběru nádorů.

Skupina		Injikace roztoku LO-BAM	Doba odběru nádoru po injikaci
A	Myš 1	-	0 min
	Myš 2	-	0 min
	Myš 3	-	0 min
B	Myš 4	50 μ l	2 hod
	Myš 5	50 μ l	2 hod
	Myš 6	50 μ l	2 hod
C	Myš 7	50 μ l	4 hod
	Myš 8	50 μ l	4 hod
	Myš 9	50 μ l	4 hod

Připravené vzorky byly zhomogenizovány pístovým homogenizátorem a centrifugovány (15 min, 160 g). Pro stanovení koncentrace laktátu ve vzorcích bylo použito 25 μ l supernatantu, vždy v dubletech. Koncentrace laktátu byla stanovena podle postupu v kapitole 5.8.

5.10.4 Porovnání cytotoxického efektu LO a LO-BAM na buňky pankreatického adenokarcinomu Panc02

Pro porovnání cytotoxického efektu LO a LO-BAM na nádorové buňky byly připraveny buňky Panc02 s koncentrací 0,5 mil/ml D-MEM média. Do 12 jamek 96 jamkové destičky s plochým dnem bylo napipetováno 100 μ l roztoku buněk a 100 μ l D-MEM média, tím bylo dosaženo koncentrace 50 000 buněk v jamce. Takto připravené buňky se nechaly inkubovat 24 hodin v termostatu při teplotě 37 °C v atmosféře nasycené 5 % CO₂ a vodními parami. Po uplynutí inkubační doby bylo médium pipetou opatrně staženo a do každé jamky bylo přidáno 199 μ l nového D-MEM média. Do tří jamek s buňkami byl přidán 1 μ l LO 26 U/ml, do tří jamek 1 μ l LO-BAM 26 U/ml a do tří jamek 1 μ l PBS (Tab. V). Následovala inkubace 24 hodin v termostatu při teplotě 37 °C v atmosféře nasycené 5 % CO₂ a vodními parami. Následně bylo médium pipetou opatrně stáhnuto, adherované buňky byly uvolněny trypsinizačním procesem a mrtvé buňky byly spočítány pomocí Trypanové modři (viz kapitola 5.1).

Tab. V: Složení jednotlivých skupin.

Skupina	Jamka	Obsah jamek
A	1	50 000 Panc02/jamka + 1 µl/jamka LO 26 U/ml
	2	
	3	
B	4	50 000 Panc02/jamka + 1 µl/jamka LO-BAM 26 U/ml
	5	
	6	
C	7	50 000 Panc02/jamka + 1 µl/jamka PBS
	8	
	9	

5.10.5 Vliv vazby kotvy BAM na aktivitu laktát 2-monooxygenázy

Připraven byl 1 mM roztok laktátu v PBS, který byl vytemperován na teplotu 37 °C. Následně byla připravena vodní lázeň s teplotou 95 °C. Odebráno a vloženo do vodní lázně na dobu 5 minut bylo 0,2 ml 1 mM laktátu (vzorek: Laktát 0 min). Poté bylo vždy smícháno 5 ml 1 mM laktátu s 5 µl enzymu. Roztok laktátu s enzymem byl inkubován a po 2, 5 a 10 minutách bylo odebráno 200 µl vzorku, který byl vždy vložen do vodní lázně na 5 min, tak došlo k inaktivaci enzymu. Přehled vzorků je shrnut v tabulce VI.

Tab. VI: Přehled roztoků 1 mM laktátu s L2M/L2M-BAM a dobou inkubace.

Vzorek	1 mM laktát	Enzym 200 U/ml	Doba inkubace
Laktát 0	Ano	-	0
A	Ano	L2M	2 min
B	Ano	L2M	5 min
C	Ano	L2M	10 min
D	Ano	L2M-BAM	2 min
E	Ano	L2M-BAM	5 min
F	Ano	L2M-BAM	10 min

Následně byla stanovena koncentrace laktátu podle postupu v kapitole 5.8. Pro stanovení bylo použito 10 µl vzorku. Všechny vzorky byly připraveny v dubletech. Z koncentrace laktátu v jednotlivých vzorcích bylo spočítáno množství zoxidovaného laktátu odečtením naměřené hodnoty od vzorku Laktát 0. Z těchto hodnot byla zjištěna aktivita enzymu, tedy množství zoxidovaného laktátu za minutu (µmol/min).

5.10.6 Pulzní terapie pankreatického adenokarcinomu Panc02 směsí manan-BAM + R-848 + POLY (I:C) + LTA v kombinaci s L2M-BAM

Myším bylo transplantováno subkutánně 400 000 buněk Panc02. Terapie byla započata 12. den po transplantaci (den 0), kdy byly myším změřeny nádory a injikováno terapeutikum. Vždy bylo injikováno intratumorálně 50 µl terapeutika. Nádory byly měřeny obden až do ukončení léčby (den 30). Po ukončení léčby bylo sledováno přežívání myši do 130. dne. Složení jednotlivých terapeutických směsí a časové schéma aplikace je popsáno v tabulce VII.

Tab. VII: Složení terapeutických roztoků, den a množství aplikace.

Terapeutická směs	složení	Den aplikace	Množství
A (manan-BAM, Poly (I:C), R-848, LTA)	0,5 mg R-848 + 0,5 mg Poly (I:C) + 0,5 mg LTA/ml 0,2 mM manan-BAM v PBS	0, 1, 2, 8, 9, 10, 16, 17, 18, 24, 25, 26	50 µl i.t.
B (L2M-BAM)	L2M-BAM 20 U/ml PBS	0, 8, 16, 24	50 µl i.t.
	PBS	1, 2, 9, 10, 17, 18, 25, 26	50 µl i.t.
C (manan-BAM, Poly (I:C), R-848, LTA, L2M-BAM)	L2M-BAM 20 U/ml směsi A	0, 8, 16, 24	50 µl i.t.
	Směs A	1, 2, 9, 10, 17, 18, 25, 26	50 µl i.t.
D (PBS)	PBS	0, 1, 2, 8, 9, 10, 16, 17, 18, 24, 25, 26	50 µl i.t.

5.10.7 Stanovení změny koncentrace laktátu v nádoru v průběhu terapie směsí manan-BAM + R-848 + POLY (I:C) + LTA v kombinaci s L2M-BAM

Pro tento pokus bylo využito celkem 9 myši, kterým bylo transplantováno subkutánně 400 000 buněk Panc02. 25. den od transplantace jim bylo intratumorálně injikováno 50 µl roztoku L2M-BAM (L2M-BAM 20 U/ml PBS) podle schématu v tabulce VIII. V čase 0, 2 a 4 hodiny po injikaci L2M-BAM jim byly nádory změřeny, vypitvány (myši byly předem

usmrceny), zváženy a následně přidány do 1 ml destilované vody. Jednotlivé vzorky nádorů v destilované vodě byly na 10 minut dány do předem připravené vodní lázně vytemperované na 95 °C. Tímto došlo k inaktivaci L2M-BAM. Schéma pokusu je graficky znázorněno v tabulce VIII.

Tab. VIII: Aplikace L2M-BAM a doba odběru nádorů.

Skupina		Injikace roztoku L2M-BAM	Doba odběr nádoru po injikaci
A	Myš 1	-	0 min
	Myš 2	-	0 min
	Myš 3	-	0 min
B	Myš 4	50 µl	2 hod
	Myš 5	50 µl	2 hod
	Myš 6	50 µl	2 hod
C	Myš 7	50 µl	4 hod
	Myš 8	50 µl	4 hod
	Myš 9	50 µl	4 hod

Připravené vzorky byly zhomogenizovány pístovým homogenizátorem a centrifugovány (15 min, 160 g). Pro stanovení koncentrace laktátu ve vzorcích bylo použito 25 µl supernatantu, vždy v dubletech. Koncentrace laktátu byla stanovena podle postupu v kapitole 5.8.

5.10.8 Pulzní terapie pankreatického adenokarcinomu Panc02 směsí manan-BAM + R-848 + POLY (I:C) + LTA v kombinaci s NAD⁺ v NaHCO₃

Myším bylo transplantováno subkutánně 400 000 buněk Panc02. Terapie byla započata 12. den po transplantaci (den 0), kdy byly myším změřeny nádory a injikováno terapeutikum. Vždy bylo injikováno intratumorálně 50 µl terapeutika. Nádory byly měřeny obden až do ukončení léčby (den 30). Po ukončení léčby bylo sledováno přežívání myši do 130. dne. Složení jednotlivých terapeutických směsí a časové schéma aplikace je popsáno v tabulce IX.

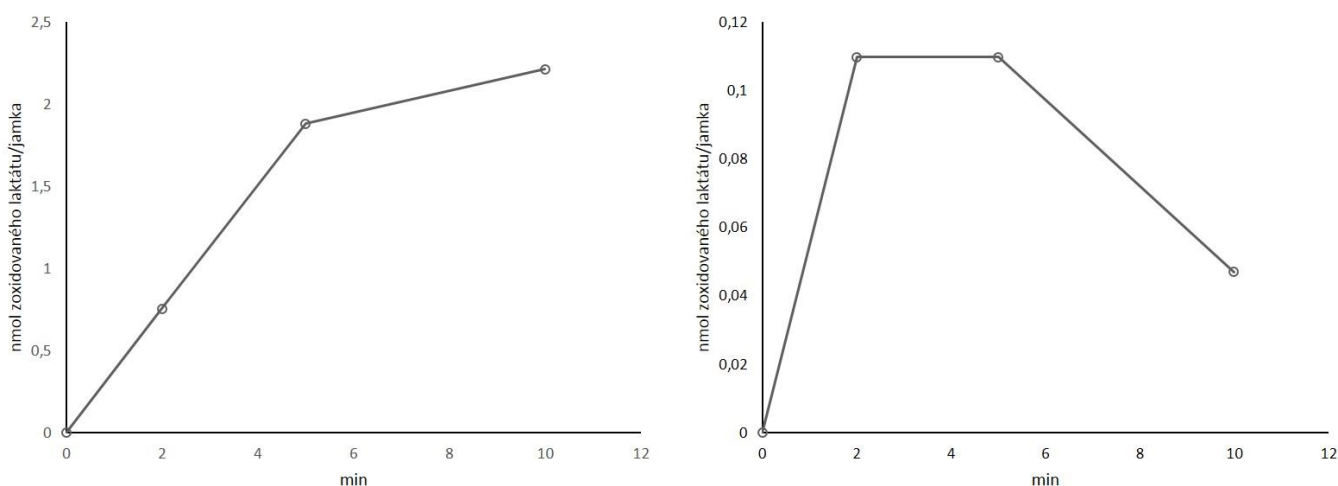
Tab. IX: Složení terapeutických roztoků, den a množství aplikace.

Terapeutická směs	složení	Den aplikace	Množství
A (manan-BAM, Poly (I:C), R-848, LTA)	0,5 mg R-848 + 0,5 mg Poly (I:C) + 0,5 mg LTA/ml 0,2 mM manan-BAM v PBS	0, 1, 2, 8, 9, 10, 16, 17, 18, 24, 25, 26	50 µl i.t.
B (NaHCO ₃ + NAD ⁺)	10 mg NAD ⁺ /ml 5 % NaHCO ₃	0, 1, 2, 8, 9, 10, 16, 17, 18, 24, 25, 26	50 µl i.t.
C (manan-BAM, Poly (I:C), R-848, LTA + NaHCO ₃ + NAD ⁺)	0,5 mg R-848 + 0,5 mg Poly (I:C) + 0,5 mg LTA + 10 mg NAD ⁺ + 50 mg NaHCO ₃ /ml 0,2 mM manan-BAM v PBS	0, 1, 2, 8, 9, 10, 16, 17, 18, 24, 25, 26	50 µl i.t.
D (PBS)	PBS	0, 1, 2, 8, 9, 10, 16, 17, 18, 24, 25, 26	50 µl i.t.

6 VÝSLEDKY

6.1 Vliv vazby kotvy BAM na aktivitu laktát oxidázy

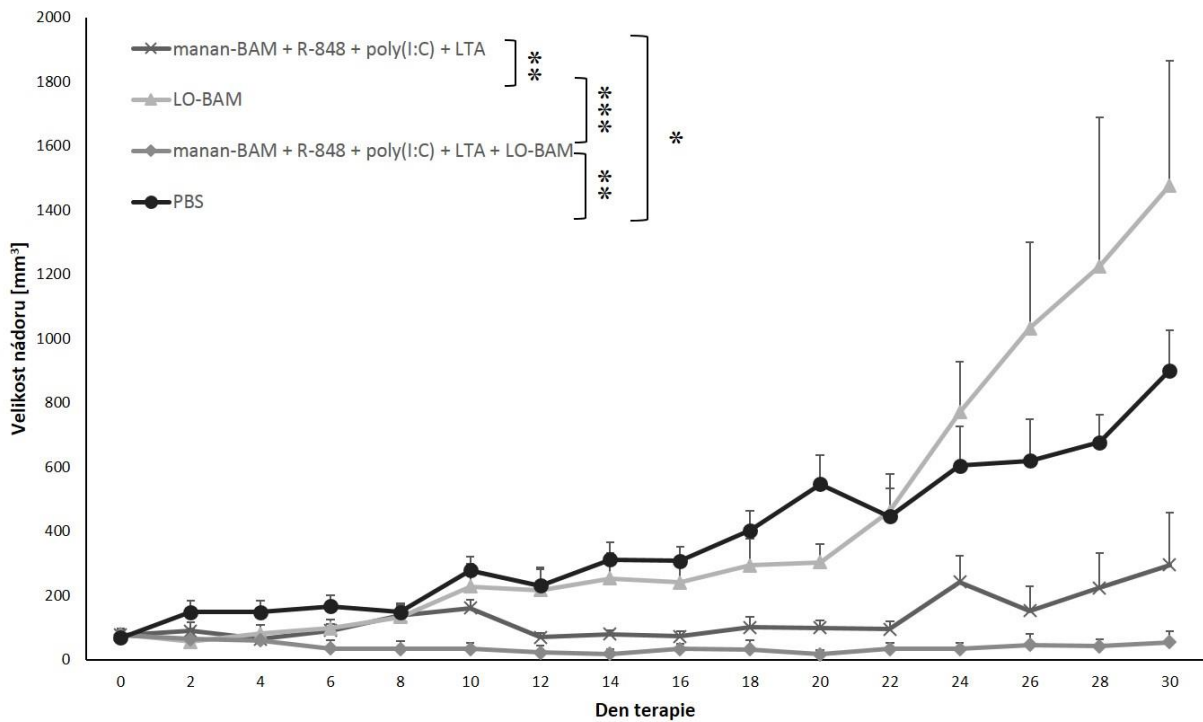
Cílem tohoto experimentu bylo zjistit jaký vliv má biokompatibilní kotva BAM na aktivitu enzymu laktát oxidázy. Z obrázku (Obr. 3) je patrné, že po navázání BAM (graf vpravo) došlo k výraznému poklesu aktivity LO. Enzym si po navázání BAM zachoval pouze 13,18 % své původní aktivity.



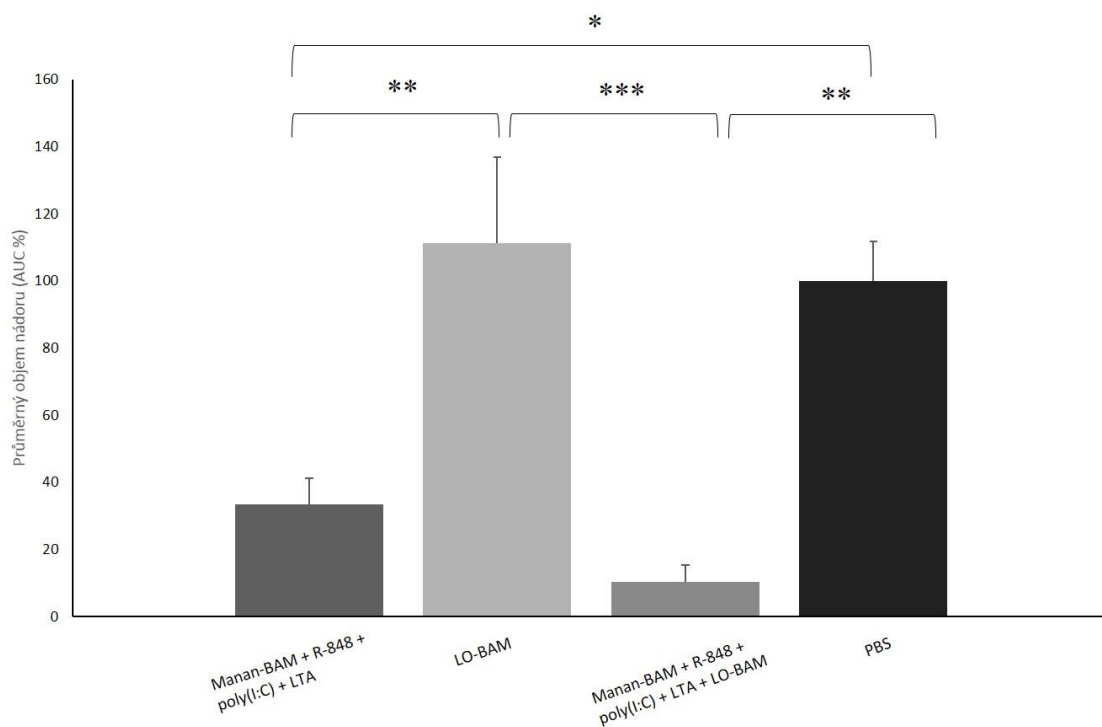
Obr. 3: Množství zoxidovaného laktátu enzymem LO (vlevo) a LO-BAM (vpravo) v průběhu času.

6.2 Pulzní terapie pankreatického adenokarcinomu Panc02 směsí manan-BAM + R-848 + POLY (I:C) + LTA v kombinaci s LO-BAM

V tomto experimentu by sledován vliv LO-BAM v kombinaci s terapií směsí kotveného mananu, reziquimodu, kyseliny polyinosin:polycytidylové a kyseliny lipoteichoové. Na obrázku 4 a 5 si můžeme povšimnout, že imunoterapie v kombinaci s LO-BAM způsobila velmi signifikantní pokles nádorové masy v porovnání s kontrolou. Došlo k malému zlepšení i oproti samotné terapii bez LO-BAM, ale statistická významnost nebyla potvrzena. Naproti tomu samotný LO-BAM má na nádorový růst pozitivní účinek a růst nádorů podpořil.

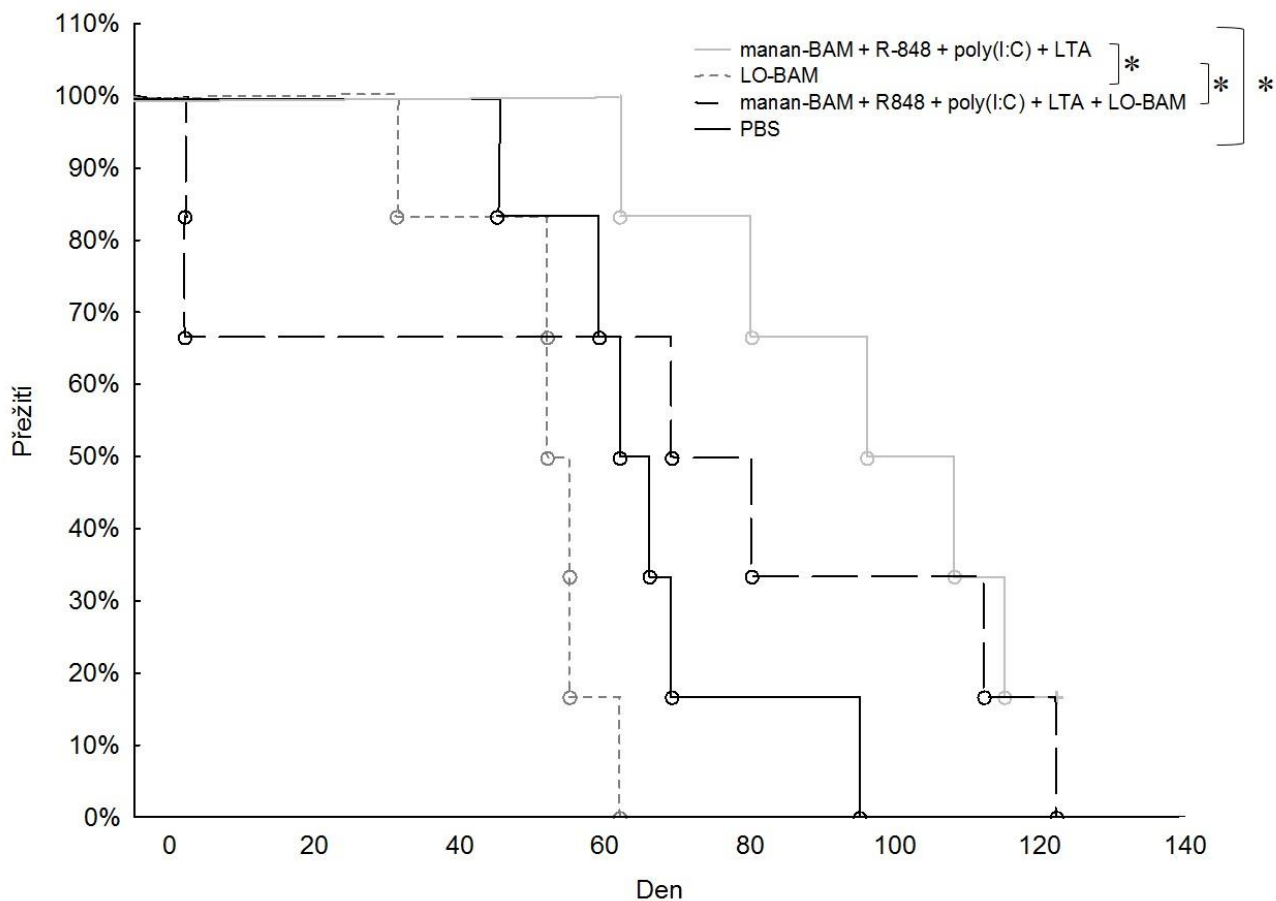


Obr. 4: Vliv terapie založené na směsi manan-BAM + R-848 + poly(I:C) + LTA v kombinaci s LO-BAM na redukci nádorového růstu. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$



Obr. 5: Průměrný objem nádorů u terapie založené na směsi manan-BAM + R-848 + poly(I:C) + LTA v kombinaci s LO-BAM. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$

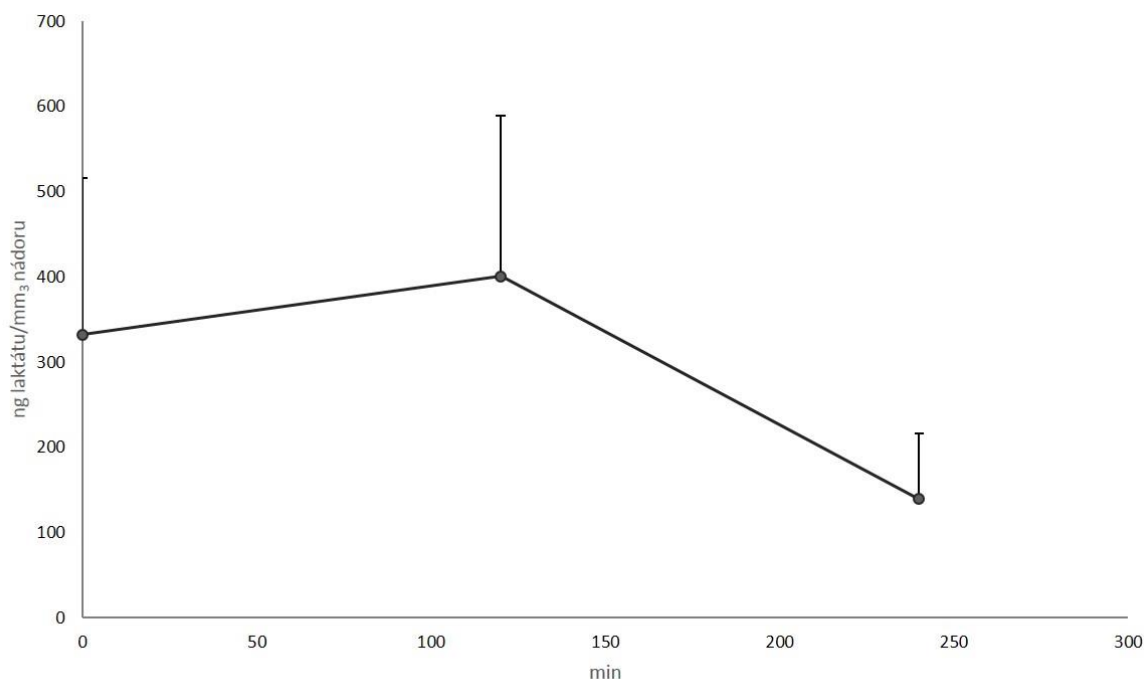
U tohoto pokusu byla v průběhu terapie a následně i po ukončení terapie sledována délka přežití myši. Ve skupině léčené směsí manan-BAM + R-848 + poly(I:C) + LTA v kombinaci s LO-BAM se poslední myš dožila 122. dne od počátku terapie. Jak si ale můžeme povšimnout na obrázku 6, nedošlo ke statisticky významnému prodloužení doby úhynu ani oproti samotné terapii bez LO-BAM, ani oproti kontrole.



Obr. 6: Vliv terapie založené na směsi manan-BAM + R-848 + poly(I:C) + LTA v kombinaci s LO-BAM na délku přežití. * $p \leq 0,05$

6.3 Stanovení změny koncentrace laktátu v nádoru v průběhu terapie směsí manan-BAM + R-848 + POLY (I:C) + LTA v kombinaci s LO-BAM

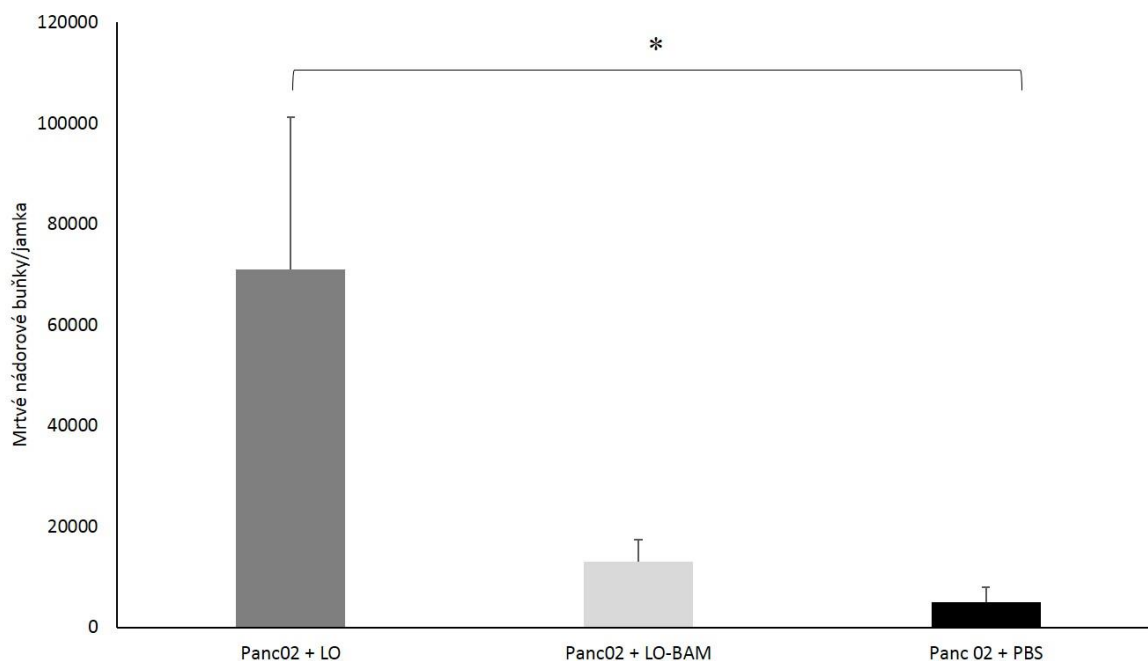
V tomto experimentu bylo měřeno množství laktátu v průběhu terapie směsí manan-BAM + R-848 + poly(I:C) + LTA v kombinaci s LO-BAM. Jak je z grafu (Obr. 7) patrné, zpočátku se koncentrace laktátu v nádoru zvýšila, v průběhu času ale začala klesat. Po dvou hodinách kleslo množství laktátu z původní hladiny o 58 %.



Obr: 7: Množství laktátu v nádoru v průběhu času po aplikaci směsí manan-BAM + R-848 + poly(I:C) + LTA v kombinaci s LO-BAM.

6.4 Porovnání cytotoxického efektu LO a LO-BAM na buňky pankreatického adenokarcinomu Panc02

Cytotoxický vliv LO a LO-BAM na buňky pankreatického adenokarcinomu Panc02 byl sledován v tomto experimentu. Výsledky experimentu jsou shrnuty v grafu (Obr. 8). Jak je z grafu patrné LO měl na nádorové buňky výrazný cytotoxický vliv a došlo k odumření statisticky signifikantního počtu buněk oproti kontrole. Naopak LO-BAM na nádorové buňky působil jen nepatrně.

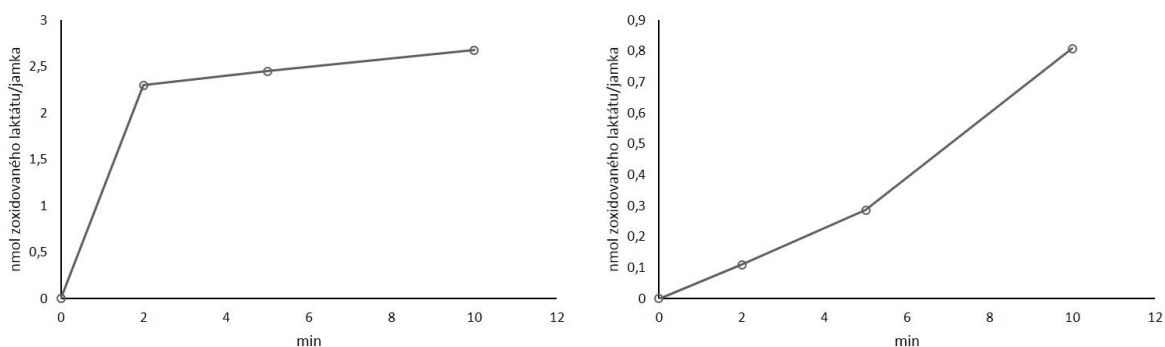


Obr. 8: Cytotoxický efekt LO a LO-BAM na buňky pankreatického adenokarcinomu Panc02.

* $p \leq 0,05$

6.5 Vliv vazby kotvy BAM na aktivitu laktát 2-monooxygenázy

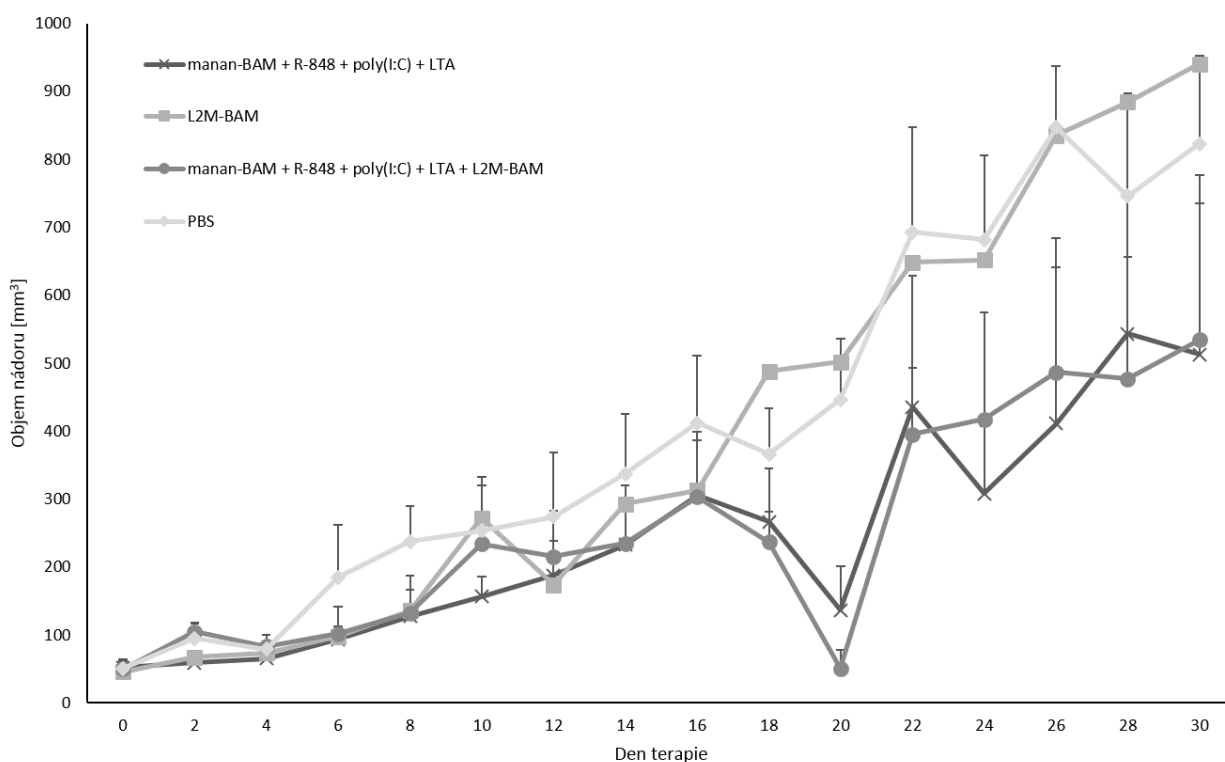
Účelem tohoto pokusu bylo porovnat aktivitu enzymu laktát-2-monooxygenázy před a po navázání biokompatibilní kotvy BAM. Z obrázku 9 je zřejmé, že po navázání kotvy BAM (graf vpravo) došlo k výraznému snížení aktivity enzymu. Enzym si po navázání kotvy BAM zachoval pouze 12,82 % ze své původní aktivity.



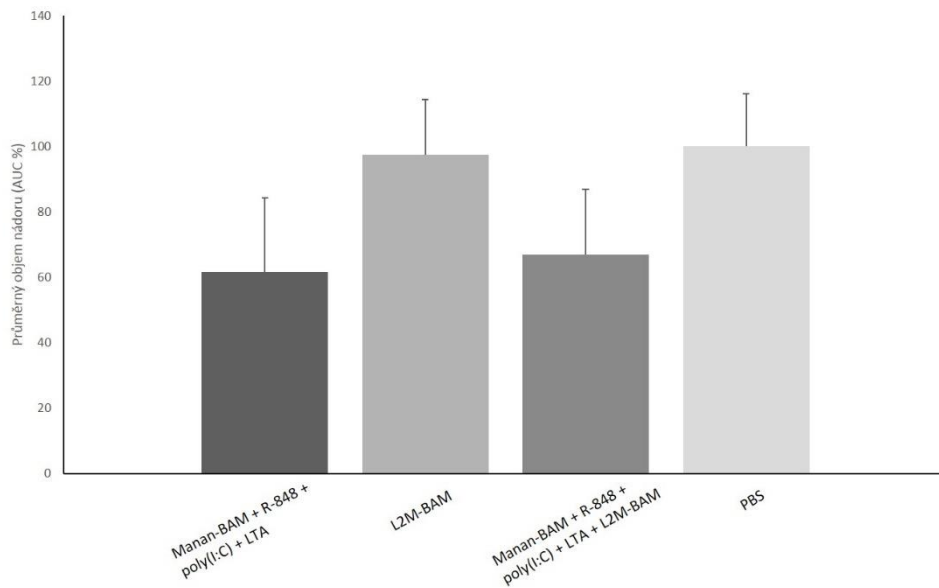
Obr. 9: Množství zoxidovaného laktátu enzymem L2M (vlevo) a L2M-BAM (vpravo) v průběhu času.

6.6 Pulzní terapie pankreatického adenokarcinomu Panc02 směsí manan-BAM + R-848 + POLY (I:C) + LTA v kombinaci s L2M-BAM

V tomto experimentu byl sledován vliv enzymu L2M-BAM v kombinaci s imunoterapií pomocí směsi manan-BAM + R-848 + poly(I:C) + LTA na růst nádorů. Z grafů (Obr. 10 a 11) je patrné, že nedošlo k žádnému signifikantnímu poklesu. Terapie kombinací imunoterapie s L2M-BAM byla srovnatelná se samotnou imunoterapií bez enzymu. Naopak aplikace samotného enzymu nádorový růst v závěru experimentu částečně podpořila.

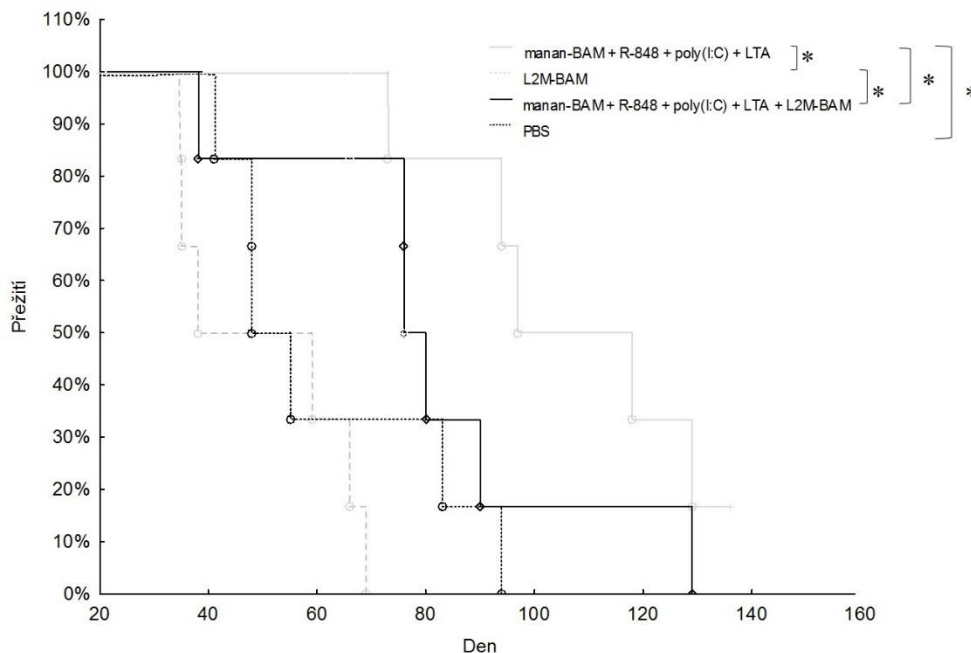


Obr. 10: Vliv terapie založené na směsi manan-BAM + R-848 + poly(I:C) + LTA v kombinaci s L2M-BAM na redukci nádorového růstu.



Obr. 11: Průměrný objem nádorů u terapie založené na směsi manan-BAM + R-848 + poly(I:C) + LTA v kombinaci s L2M-BAM.

Dále byla u terapie založené na manan-BAM + R-848 + poly(I:C) + LTA v kombinaci s L2M-BAM měřena doba přežití (obr. 12). Ve skupině léčené imunoterapeutickou směsí v kombinaci s L2M-BAM došlo k úhynu poslední myši ve 129. den. V tomto případě přípravek L2M-BAM vedl ke zkrácení přežití.



Obr. 12: Vliv terapie založené a na směsi manan-BAM + R-848 + poly(I:C) + LTA v kombinaci s L2M-BAM na délku přežití. * $p \leq 0,05$

6.7 Stanovení změny koncentrace laktátu v nádoru v průběhu terapie směsí manan-BAM + R-848 + POLY (I:C) + LTA v kombinaci s L2M-BAM

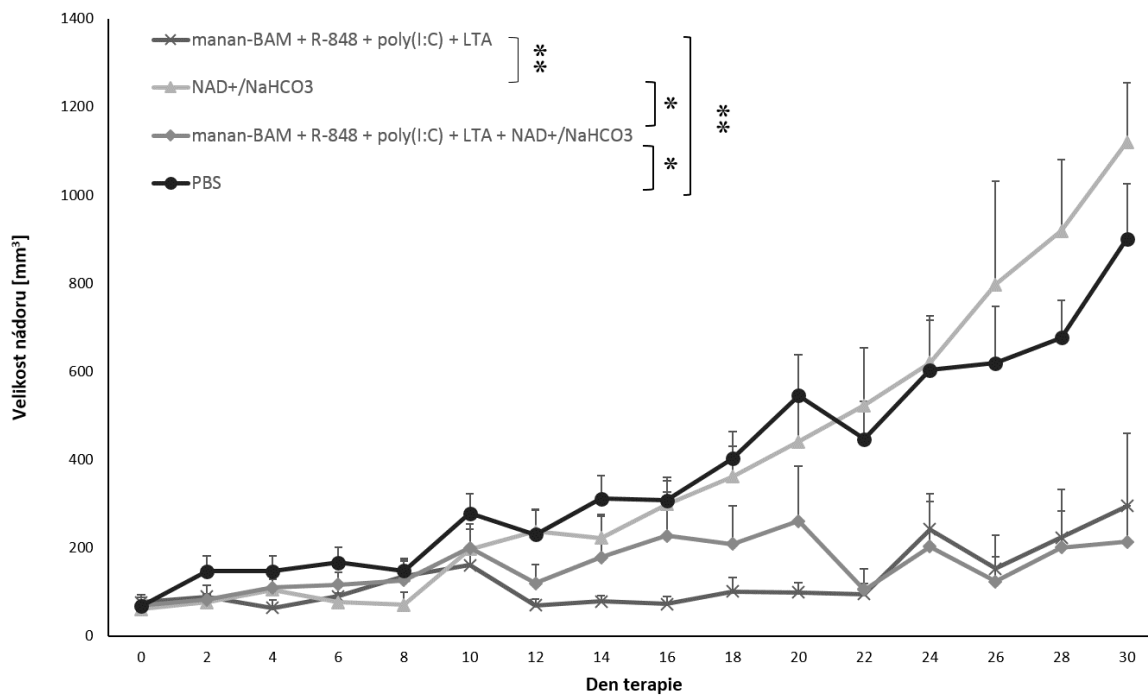
V tomto pokusu bylo měřeno množství laktátu v průběhu imunoterapie směsí manan-BAM + R-848 + poly(I:C) + LTA v kombinaci s L2M-BAM. Jak je z grafu (Obr. 13) patrné, zpočátku koncentrace laktátu v nádoru stoupla, v průběhu času ale začala klesat. Po dvou hodinách kleslo množství laktátu z původní hladiny o 16,8 %.



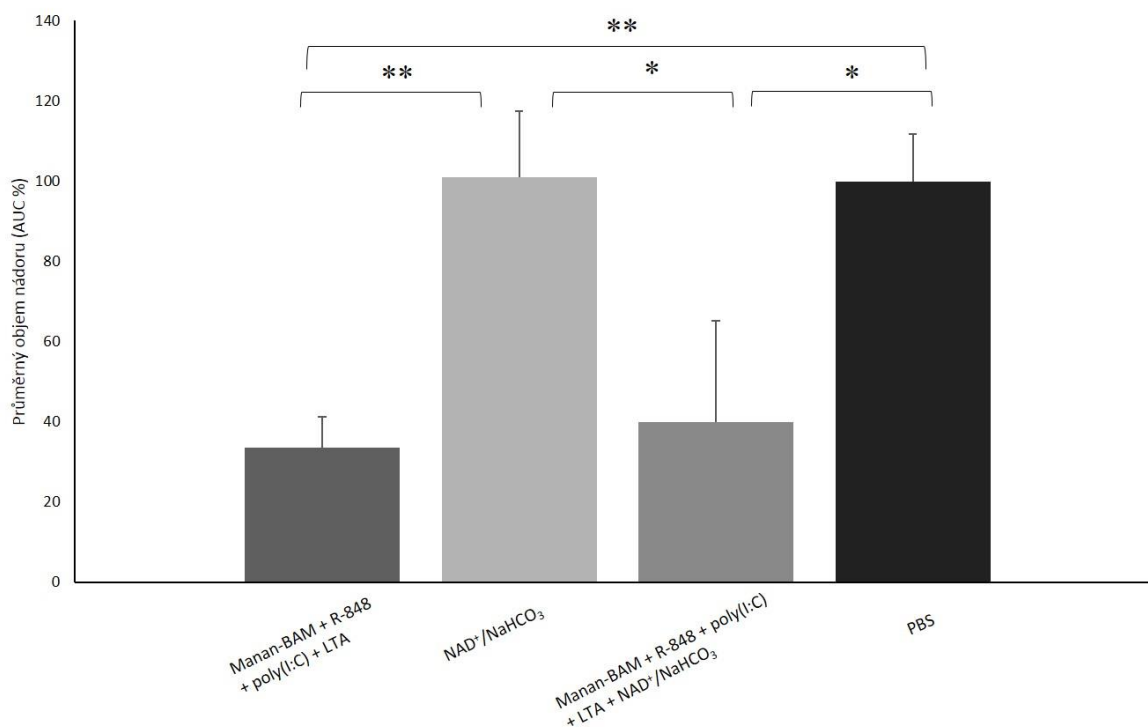
Obr. 13: Množství laktátu v nádoru v průběhu času po aplikaci směsí manan-BAM + R-848 + poly(I:C) + LTA v kombinaci s L2M-BAM.

6.8 Pulzní terapie pankreatického adenokarcinomu Panc02 směsí manan-BAM + R-848 + POLY (I:C) + LTA v kombinaci s NAD^+ v NaHCO_3

V pulzní terapii Panc02 směsí manan-BAM + R-848 + POLY (I:C) + LTA v kombinaci s NAD^+ v NaHCO_3 byl zjišťován vliv NAD^+ v NaHCO_3 na imunoterapii. Na obrázku 14 a 15 si můžeme všimnout, že imunoterapie v kombinaci s NAD^+ v NaHCO_3 způsobila statisticky významný pokles nádorového objemu oproti kontrole. Přesto terapie v kombinaci s NAD^+ v NaHCO_3 byla porovnatelná se samotnou imunoterapií.

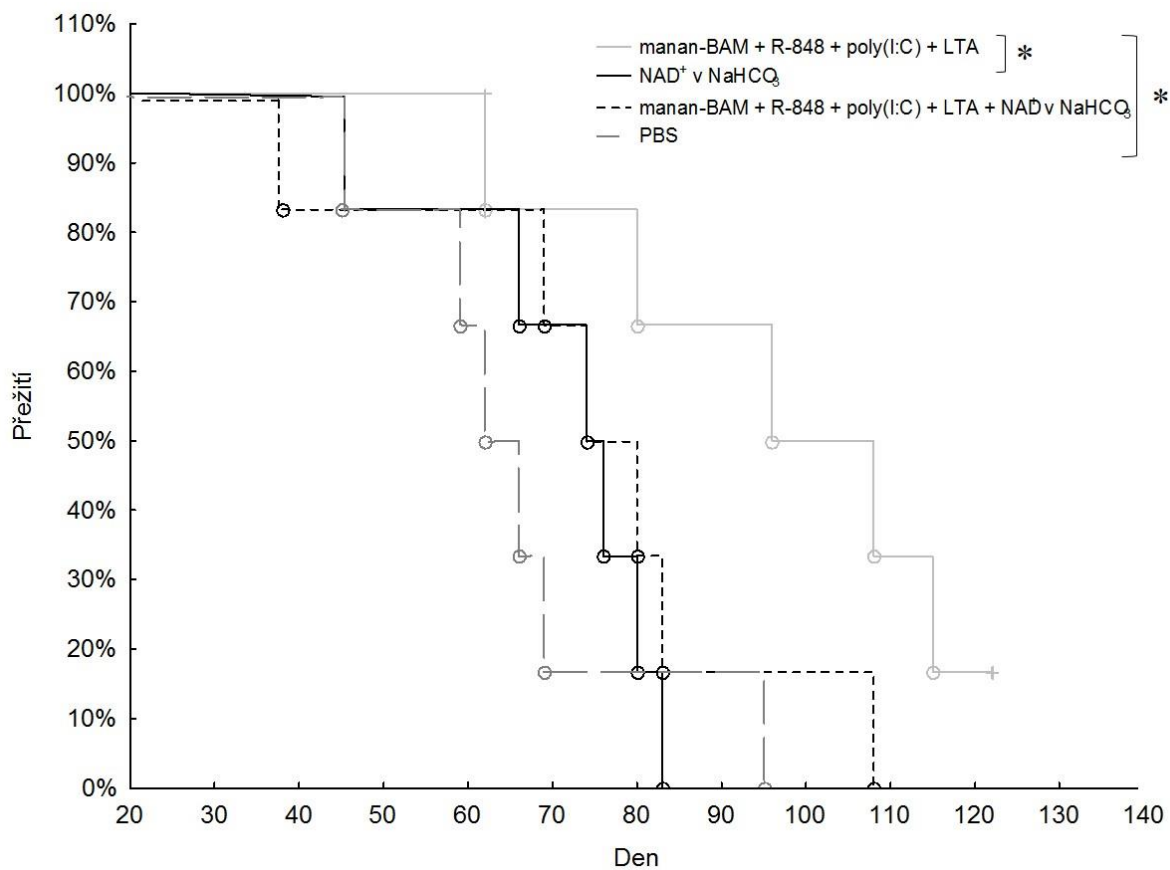


Obr. 14: Vliv terapie založené na směsi manan-BAM + R-848 + poly(I:C) + LTA v kombinaci s NAD⁺ v NaHCO₃ na redukci nádorového růstu. * p ≤ 0,05, ** p ≤ 0,01



Obr. 15: Průměrný objem nádorů léčených směsí manan-BAM + R-848 + poly(I:C) + LTA v kombinaci s NAD⁺ v NaHCO₃ na redukci nádorového růstu. * p ≤ 0,05, ** p ≤ 0,01

V tomto experimentu bylo sledováno přežití myši v průběhu i po ukončení terapie (Obr. 16). Poslední myš ze skupiny léčené směsí manan-BAM + R-848 + poly(I:C) + LTA v kombinaci s NAD^+ v NaHCO_3 uhynula 108. den. NAD^+ v NaHCO_3 neprodloužilo u imunoterapie dobu přežití.



Obr. 16: Vliv terapie založené a na směsi manan-BAM + R-848 + poly(I:C) + LTA v kombinaci s NAD^+ v NaHCO_3 na délku přežití. * $p \leq 0,05$

7 DISKUSE

Imunoterapie se ukazuje jako vhodná alternativa agresivní chemoterapie nebo radioterapie, a to díky stimulaci mechanismů tělu vlastních s možností specifického zacílení na nádorové buňky. Pracovní kolektiv pod vedením Dr. Jana Ženky, pod jehož vedením vznikla i tato práce, se zabývá výzkumem léčby nádorů stimulací nespecifické imunity současným využitím Toll-like receptorů a ligandů stimulujících fagocytózu, což je i v souladu se studií Underhilla a Gantera (Underhill a Ganter, 2004). V práci Kumžákové byl zjištěn synergický efekt resiquimodu s kotveným mananem a v práci Glaserové byl zjištěn efekt Poly(I:C) na dobu přežití (Kumžáková, 2015; Glaserová, 2015). V bakalářské práci, v jejíž přímé návaznosti vznikala tato diplomová práce, jsem se zabývala vylepšením imunoterapeutické směsi kotveného mananu (ligand stimulující fagocytózu), resiquimodu (TLR 7 ligand) a kyseliny polyinosinové:polycytidylové (TLR 3 ligand). Vhodným synergickým TLR ligandem se ukázala kyselina lipoteichoová (TLR 2 ligand). V léčbě melanomu imunoterapeutickou směsí mananu-BAM, R-848, Poly(I:C) a LTA bylo dosaženo velmi uspokojivých výsledků (83 % úspěšnost vyléčení). Došlo k úplnému vyléčení 4 myši ze 6 ještě v průběhu terapie a zbývající 2 jedinci se vyléčili po ukončení terapie (v jednom případě došlo k recidivě). Co se týče doby přežití, došlo k výraznému prodloužení a všichni vyléčení jedinci byli odolní vůči retransplantaci (Masáková, 2016). V případě léčby agresivnějšího adenokarcinomu pankreatu sice došlo k výrazné redukci nádorové hmoty (Masáková, 2016), avšak k úplnému vyléčení myši nedošlo a k uhynutí všech myši došlo do 84. dne (Jandová, 2017). Tímto nastala otázka, čím vylepšit stávající imunoterapii, aby došlo k úplnému vyléčení i těch nejagresivnějších typů rakoviny. Rozhodli jsme se pomoci terapii neimunologickým atakem, a to atakem na metabolické úrovni.

Jednou z výrazných odlišností solidních nádorů od zdravých tkání je tzv. Warburgův efekt. Zdravé buňky za aerobních podmínek upřednostňují oxidativní fosforylaci, která představuje efektivnější způsob produkce ATP a za anaerobních podmínek se uchylují ke glykolýze, tedy méně efektivnímu způsobu produkce ATP konverzí glukózy na laktát (Garber, 2004). Na mnoha místech solidních nádorů vzniká hypoxický stres (Trédan a kol., 2007), v jehož důsledku dochází k anaerobní glykolýze (Vander Heiden a kol., 2009). Co je ale typické pro nádorové buňky a co popsal Otto H. Warburg téměř před sto lety, nádorové buňky preferují anaerobní glykolýzu i za přístupu kyslíku (Warburg a kol., 1927). Z tohoto důsledku dochází k hromadění laktátu a snižování pH v nádorovém mikroprostředí. Vysoká koncentrace laktátu společně s nízkým pH škodí imunoterapii, působí imunosupresivně a

podporuje růst nádorů i metastazování (Husain a kol., 2013). Z tohoto důvodu se jeví zaměření na odstranění laktátu a nízkého pH z nádorového mikroprostředí velmi slibně a rozhodli jsme se odstranit laktát z nádorového prostředí pomocí enzymů.

Prvním zkoušeným enzymem byla laktát oxidáza. Je známo, že imobilizované enzymy bývají stabilnější (Bornscheuer, 2003), proto byly využity kotvené enzymy. Druhým účelem kotvení bylo zajistit dlouhodobější perzistenci enzymů v nádorovém prostředí. Jelikož byl LO kotven na nádorové buňky pomocí biokompatibilní kotvy BAM, bylo potřeba zjistit, jakou aktivitu si enzym zachová po navázání kotvy BAM. V prvním experimentu bylo zjištěno, že LO-BAM si zachoval pouze 13,18 % své původní aktivity, proto bylo v terapii použito vyšší koncentrace enzymu.

V druhém experimentu byl sledován vliv LO-BAM v kombinaci s imunoterapeutickou směsí manan-BAM + R-848 + poly(I:C) + LTA na redukci pankreatického adenokarcinomu a dobu přežití. LO-BAM v kombinaci s imunoterapií vedl jen k nepatrnému, a tedy statisticky nevýznamnému poklesu objemu nádoru oproti samotné imunoterapii. Toto bylo patrně způsobeno tím, že samotný LO-BAM nádorový růst velmi podpořil a došlo dokonce k většímu nárůstu nádorů oproti kontrolní skupině. Odstranění laktátu sice omezí inhibici imunitních buněk, ale současně také podpoří nádorový růst, neboť odstranění laktátu jako koncového produktu metabolismu glukózy nejspíše podpořilo tuto metabolickou dráhu tvorby ATP. Aktivní imunitní buňky v některých situacích také preferují produkci ATP Warburgovým jevem (Pearce a Pearce, 2013). Vzhledem k tomu, že mají imunitní a nádorové buňky podobný metabolismus, záleží na jejich vzájemném poměru. Je tedy pravděpodobné, že čím větší byla infiltrace nádoru imunitními buňkami, tím by došlo k výraznější nádorové redukci.

LO-BAM v kombinaci se směsí manan-BAM + R-848 + poly(I:C) + LTA neprodloužil průměrnou dobu přežití. Ve skupině léčené LO-BAM + manan-BAM + R-848 + poly(I:C) + LTA došlo druhý den k úhynu dvou myší. Vedlejším produktem oxidace laktátu katalyzovanou LO je peroxid vodíku, jež má na buňky cytotoxický vliv. Je tedy možné, že množství cytotoxického H_2O_2 v kombinaci s imunitním atakem způsobilo velké zatížení organismu myší.

Dále bylo potřeba potvrdit, zda skutečně dochází v nádorech za přítomnosti LO-BAM k úbytku laktátu. Ve třetím experimentu bylo proto měřeno množství laktátu v průběhu terapie LO-BAM v kombinaci se směsí manan-BAM + R-848 + poly(I:C) + LTA. Zpočátku došlo k nepatrnému nárůstu koncentrace laktátu v nádorovém prostředí. Tento nárůst byl patrně

zapříčiněn intratumorální aplikací terapeutika. Injikace pravděpodobně porušila nádorové buňky a mohlo tak dojít k uvolnění laktátu z intracelulárního prostředí nádorových buněk do extracelulárního nádorového mikroprostředí. Po dvou hodinách působení terapeutické směsi došlo ale k poklesu množství laktátu z původní hladiny až o 58 %. Je tedy patrné, že za přítomnosti LO-BAM skutečně došlo k úbytku množství laktátu.

Již bylo zmíněno, že vedlejším produktem oxidace laktátu laktát oxidázou je pro buňky cytotoxický peroxid vodíku. V dalším experimentu byl tedy porovnáván cytotoxický efekt LO a LO-BAM na nádorové buňky. Původní představou bylo, že enzym kotvený přímo na nádorové bude vytvářet H_2O_2 v těsné blízkosti buněk, a tudíž způsobí úhyn více nádorových buněk. Tato představa se ale nepotvrdila, neboť LO vykazoval větší cytotoxický vliv na nádorové buňky než LO-BAM.

LO-BAM v kombinaci s imunoterapií způsobil ve druhém experimentu úhyn 2 myší hned zpočátku terapie, proto byl zkoumán efekt enzymu laktát 2-monooxygenázy na zlepšení imunoterapie. Vedlejšími produkty štěpení laktátu enzymem L2M jsou CO_2 a H_2O , jelikož nevzniká H_2O_2 , měla by terapeutická směs L2M-BAM v kombinaci s mananem-BAM, R-848, poly(I:C) a LTA být pro myší organismus šetrnější.

Stejně jako LO, L2M byl na nádorové buňky kotven pomocí kotvy BAM, proto byl před započítáním léčby porovnán vliv vazby BAM na L2M. Bylo zjištěno, že L2M-BAM si zachovává 12,82 % své původní aktivity, proto bylo v terapeutické směsi použito větší koncentrace enzymu.

V šestém experimentu byl sledován vliv L2M-BAM v kombinaci s mananem-BAM, R-848, poly(I:C) a LTA na redukci pankreatického adenokarcinomu i dobu přežití. L2M-BAM v kombinaci s imunoterapií neměl žádný efekt na redukci nádorového růstu ani neprodloužil dobu přežití. Absence H_2O_2 pravděpodobně zapříčinila slabší efekt terapie než v případě léčby LO-BAM v kombinaci s imunoterapií. Naopak samotný L2M-BAM nádorový růst velmi podpořil. Domníváme se, že stejně jako v případě LO-BAM, závisí terapeutický efekt na síle infiltrace nádoru imunitními buňkami, tedy k čímu větší by došlo infiltraci, tím by byl terapeutický efekt větší.

Ke zjištění, zda v přítomnosti L2M-BAM skutečně dochází k úbytku laktátu, bylo v následujícím experimentu měřeno množství laktátu v průběhu terapie L2M-BAM v kombinaci se směsí manan-BAM + R-848 + poly(I:C) + LTA. Zpočátku terapie došlo k nárůstu koncentrace laktátu, stejně jako v případě terapie s LO-BAM. Nárůst byl

pravděpodobně zapříčiněný narušením nádorových buněk intratumorální injekcí terapeutika. Po dvou hodinách ale již došlo k poklesu koncentrace laktátu, oproti LO-BAM, pouze o 16,8 % z původní hladiny. Nižší pokles laktátu je v souladu s tím, že terapie L2M-BAM v kombinaci s imunoterapií byla slabší než terapie LO-BAM v kombinaci s imunoterapií.

Hodnoty pH v solidních nádorech bývají v rozmezí 6,5 až 6,8. Toto kyselé prostředí je důležitým faktorem pro progresi nádoru (Riemann a kol., 2011). V posledním experimentu bylo proto sledováno, jaký terapeutický efekt má odstranění laktátu z nádorového prostředí a zároveň zvýšení pH kyselého nádorového prostředí. K tomuto účelu bylo využito NAD^+ , který měl posunout rovnováhu od laktátu k pyruvátu (Phypers a Pierce, 2006), a NaHCO_3 , který sloužil k neutralizaci kyselého pH. NAD^+ a NaHCO_3 v kombinaci s imunoterapeutickou směsí manan-BAM + R-848 + poly(I:C) + LTA neměli na redukci nádorů žádný efekt. K prodloužení přežití také nedošlo. Terapie nádorů pouze NAD^+ a NaHCO_3 nepatrně podpořila nádorový růst, avšak oproti kontrole statisticky nevýznamně. Tyto výsledky potvrzují domněnku, že odstranění laktátu a v tomto případě i zvýšení pH pomáhá ve funkci nejen buňkám imunitního systému, ale také buňkám nádorovým.

Domníváme se, že výsledek nádorové terapie vycházející z ovlivnění Warburgova efektu a odstranění laktátu bude záviset na intenzitě infiltrace nádoru imunitními buňkami a intenzitě protinádorové imunitní reakce.

8 ZÁVĚR

- Vazba kotvy BAM na enzymy LO a L2M výrazně snižuje jejich enzymatickou aktivitu.
- LO má na nádorové buňky výrazný cytotoxický efekt. Naopak LO-BAM má na nádorové buňky jen nepatný cytotoxický vliv.
- Enzym LO-BAM snížil koncentraci laktátu v nádorovém prostředí o 58 %, L2M-BAM pouze o 16,8 %.
- Odstranění laktátu, respektive zvýšení pH v kombinaci se zavedenou imunoterapií pomocí kotveného mananu, resiquimodu, kyseliny polyinosin:polycytidylové a kyseliny lipoteichoové má zanedbatelný vliv na redukci nádorového růstu.
- Odstranění laktátu, respektive zvýšení pH nezpůsobilo prodloužení přežití.
- Samotné odstranění laktátu, respektive zvýšení pH nádoru působí kontraproduktivně a vede k posílení nádorového růstu. Možný mechanismus je diskutován.

9 SEZNAM ZKRATEK

ATP (*Adenosine triphosphate*) – adenosintrifosfát

CLR (*C-type lectin receptor*) – C-typ lektinový receptor

CpG-A (*Cytosine-phosphate-guanine A*) – cytosin-fosfát-guanin A

CRD (*Ca²⁺-dependent carbohydrate recognition domain*) - Ca²⁺-dependentní doména rozpoznávající sacharidy

CTDL (*C-type lectin domain*) – CRD-like doména

CTLA-4 (*Cytotoxic T-lymphocyte-associate antigen 4*) – cytotoxický antigen asociovaný s T-lymfocyty

DAMP (*Damage-associated molecular pattern*) – molekulární vzory asociované se signály poškození

DNA (*Deoxyribonucleic acid*) – deoxyribonukleová kyselina

dsDNA (*double-stranded Deoxyribonucleic acid*) – dvouvláknová DNA

FasL (*Fas ligand*) – Fas ligand (ligand apoptického receptoru)

Fas/FasR (*Apoptosis signal receptor*) – apoptický receptor

FMN (*Flavin mononucleotide*) - flavinmononukleotid

HIF-1 (*Hypoxia-inducible factor 1*) – Faktor 1 (transkripční faktor indukovaný hypoxií)

HMGB1 (*High-mobility group box 1*) – amfoterin

HSPs (*Heat shock protein*) – proteiny teplotního šoku

IFN (*Interferon*) - interferon

IL (*Interleukin*) - interleukin

L2M (*Lactate 2-monooxygenase*) – laktát 2-monooxygenáza

LAG-3 (*Lymphocyte-activation gene 3*) – LAG-3 checkpoint receptor

LO (*Lactate oxidase*) – laktát oxidáza

LTA (*Lipoteichoic acid*) – kyselina lipoteichoová

MBL (*Mannan-binding lectin*) – lektin vázající manózu

MDSC (*Myeloid derived suppressor cells*) – myeloidní supresorové buňky

MHC (*Major histocompatibility complex*) – hlavní histokompatibilní komplex

MR (*Mannose receptor*) – manóзовý receptor

MyD88 (*Myeloid differentiation primary factor 88*) – myeloidní diferenciační faktor 88

NAD (*Nicotin amide adenine dinucleotide*) – nikotinamidadenindinukleotid

NaHCO₃ (*Sodium bicarbonate*) – hydrogenuhličitan sodný

NK buňky (*Natural killers*) – přirození zabíječi

NLR (*NOD-like receptor*) – NOD-like receptor

Pam₃CSK₄ (*Palmitoyl-3-cysteiny-l-seryl-lysine-4*) - palmitoyl-3-cysteiny-l-seryl-lysine-4

PAMP (*Pathogen-associated molecular pattern*) – molekulové vzory asociované s patogeny

Poly I:C (*Polyinosinic:polycytidylic acid*) – polyinosynová-polycytidylová kyselina

PD-1 (*Programmed cell death receptor 1*) – checkpoint receptor programované smrti

pH (*potential of hydrogen*) – potenciál vodíku

PRR (*Pattern recognition receptor*) – vzory rozpoznávající receptory

RLR (*RIG-1-like receptor*) – RIG-1-like receptor

ssRNA (*single-stranded ribonucleic acid*) – jednovláknová RNA (ribonukleová kyselina)

TAA (*Tumor-associated antigen*) – antigen asociovaný s nádory

Tc (*Cytotoxic T cell*) – cytotoxický T-lymfocyt

TCR (*T-cell receptor*) – T-buněčný receptor

Th (*T helper cell*) – pomocný T-lymfocyt

TIM-3 (*T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing 3*) – T buněčný imunoglobulin obsahující mucinovou doménu 3

TIR (*Toll/IL-1 receptor*) – Toll/IL-1 receptor

TIRAP (*TIR domain containing adaptor protein*) – TIR doména obsahující adaptorovou molekulu

TLR (*Toll-like receptor*) – Toll-like receptor

TNF (*Tumor necrosis factor*) – faktor nekrotizující nádory

TRAM – (*TRIF related adaptor molecule*) – adaptérová molekula obsahující TIR doménu 2

Treg (*Regulatory T cell*) – regulační T-lymfocyt

TRIF (*TIR-domain-containing adapter-including interferon- β*) – adaptérová molekula obsahující TIR doménu

TSA (*Tumor-specific antigen*) – antigen specifický pro nádory

WHO (*World Health Organization*) Světová zdravotnická organizace

10 LITERATURA

Adam, Z., Vorlíček, J., & Koptíková, J. (2003). *Obecná onkologie a podpůrná léčba*. Grada publishing.

Beerenwinkel, N., Schwarz, R. F., Gerstung, M., & Markowitz, F. (2014). Cancer evolution: mathematical models and computational inference. *Systematic Biology*, *64*(1), e1-e25.

Berrios-Rivera, S. J., Bennett, G. N., & San, K. Y. (2002). The effect of increasing NADH availability on the redistribution of metabolic fluxes in *Escherichia coli* chemostat cultures. *Metabolic Engineering*, *4*(3), 230-237.

Blacker, T. S., Mann, Z. F., Gale, J. E., Ziegler, M., Bain, A. J., Szabadkai, G., & Duchon, M. R. (2014). Separating NADH and NADPH fluorescence in live cells and tissues using FLIM. *Nature Communications*, *5*, 3936.

Böhme, I., & Bosserhoff, A. K. (2016). Acidic tumor microenvironment in human melanoma. *Pigment Cell & Melanoma Research*, *29*(5), 508-523.

Bonilla, F. A., & Oettgen, H. C. (2010). Adaptive immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *125*(2), S33-S40.

Bornscheuer, U. T. (2003). Immobilizing enzymes: how to create more suitable biocatalysts. *Angewandte Chemie International Edition*, *42*(29), 3336-3337.

Carrillo-Bustamante, P., Kesmir, C., & de Boer, R. J. (2015). Can selective MHC downregulation explain the specificity and genetic diversity of NK cell receptors? *Frontiers in Immunology*, *6*, 311.

Cawley, T. N., & Ballou, C. E. (1972). Identification of two *Saccharomyces cerevisiae* cell wall mannan chemotypes. *Journal of Bacteriology*, *111*(3), 690-695.

Chen, D. S., & Mellman, I. (2013). Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity*, *39*(1), 1-10.

Cheng, Y. S., & Xu, F. (2010). Anticancer function of polyinosinic-polycytidylic acid. *Cancer Biology & Therapy*, *10*(12), 1219-1223.

- Cheung-Ong, K., Giaever, G., & Nislow, C. (2013). DNA-damaging agents in cancer chemotherapy: serendipity and chemical biology. *Chemistry & Biology*, 20(5), 648-659.
- Cleveland, M. G., Gorham, J. D., Murphy, T. L., Tuomanen, E., & Murphy, K. M. (1996). Lipoteichoic acid preparations of gram-positive bacteria induce interleukin-12 through a CD14-dependent pathway. *Infection and Immunity*, 64(6), 1906-1912.
- Cohen, R., Neuzillet, C., Tijeras-Raballand, A., Faivre, S., de Gramont, A., & Raymond, E. (2015). Targeting cancer cell metabolism in pancreatic adenocarcinoma. *Oncotarget*, 6(19), 16832.
- Corthay, A. (2014). Does the immune system naturally protect against cancer?. *Frontiers in Immunology*, 5, 197.
- Dockrell, D. H., & Kinghorn, G. R. (2001). Imiquimod and resiquimod as novel immunomodulators. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48(6), 751-755.
- Dvořák, J. (2014). Radioterapie karcinomu prostaty. *Onkologie*, 8(1), 19-22.
- Garber, K. (2004). Energy boost: the Warburg effect returns in a new theory of cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 96(24), 1805-1806.
- Garrido, F., Aptsiauri, N., Doorduijn, E. M., Lora, A. M. G., & van Hall, T. (2016). The urgent need to recover MHC class I in cancers for effective immunotherapy. *Current Opinion in Immunology*, 39, 44-51.
- Ghisla, S., & Massey, V. (1977). Studies on the mechanism of action of the flavoenzyme lactate oxidase: proton uptake and release during the binding of transition state analogs. *Journal of Biological Chemistry*, 252(19), 6729-6735.
- Giegel, D. A., Williams, C. H., & Massey, V. (1990). L-lactate 2-monooxygenase from *Mycobacterium smegmatis*. Cloning, nucleotide sequence, and primary structure homology within an enzyme family. *Journal of Biological Chemistry*, 265(12), 6626-6632.
- Glaserová, S. (2015). Studium klinicky aplikovatelné nádorové imunoterapie a jejich mechanismů. Diplomová práce. *Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích*, 66 s.

- Goněk, R., & Kozáková, Š. (2014). Cílená léčba versus klasická cytostatika. *Onkologie*, 8(5), 231-233.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674.
- Hockel, M., & Vaupel, P. (2001). Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *Journal of the National Cancer Institute*, 93(4), 266-276.
- Hořejší, V. (2015). Protinádorové zbraně imunitního systému. *Klinická onkologie*, 15.
- Hoving, J. C., Wilson, G. J., & Brown, G. D. (2014). Signalling C-type lectin receptors, microbial recognition and immunity. *Cellular Microbiology*, 16(2), 185-194.
- Hui, L., & Chen, Y. (2015). Tumor microenvironment: Sanctuary of the devil. *Cancer Letters*, 368(1), 7-13.
- Hui, D., Kim, Y. J., Park, J. C., Zhang, Y., Strasser, F., Cherny, N., Kaasa, S., Davis, M. P. & Bruera, E. (2015). Integration of oncology and palliative care: a systematic review. *The Oncologist*, 20(1), 77-83.
- Hung, Y. P., Albeck, J. G., Tantama, M., & Yellen, G. (2011). Imaging cytosolic NADH-NAD⁺ redox state with a genetically encoded fluorescent biosensor. *Cell Metabolism*, 14(4), 545-554.
- Husain, Z., Huang, Y., Seth, P., & Sukhatme, V. P. (2013). Tumor-derived lactate modifies antitumor immune response: effect on myeloid-derived suppressor cells and NK cells. *The Journal of Immunology*, 191(3), 1486-1495.
- Husain, Z., Seth, P., & Sukhatme, V. (2013). Tumor-derived lactate and myeloid-derived suppressor cells: linking metabolism to cancer immunology. *Oncoimmunology*, 2(11), e26383.
- Hynková, L., & Doleželová, H. (2008). Nežádoucí účinky radioterapie a podpůrná léčba u radioterapie nádorů hlavy a krku. *Onkologie*, 2(2), 88-90.
- Jandová, L. (2017). Imunoterapie melanomu a pankreatického adenokarcinomu na myším modelu. *Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích*, 51 s.

- Kaczanowska, S., Joseph, A. M., & Davila, E. (2013). TLR agonists: our best frenemy in cancer immunotherapy. *Journal of Leukocyte Biology*, 93(6), 847-863.
- Kala, Z., Kysela, P., Ostřížková, L., Kiss, I., Válek, V., & Andrašina, T. (2011). Chirurgická a miniinvazivní léčba kolorektálního karcinomu. *Onkologie*, 5(5), 270-272.
- Kato, K., Itoh, C., Yasukouchi, T., & Nagamune, T. (2004). Rapid protein anchoring into the membranes of mammalian cells using oleyl chain and poly (ethylene glycol) derivatives. *Biotechnology Progress*, 20(3), 897-904.
- Kawai, T., & Akira, S. (2008). Toll-like Receptor and RIG-1-like Receptor Signaling. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1143(1), 1-20.
- Kessenbrock, K., Plaks, V., & Werb, Z. (2010). Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell*, 141(1), 52-67.
- Kim, R., Emi, M., & Tanabe, K. (2007). Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology*, 121(1), 1-14.
- Klabusay, M. (2015). Úloha regulačních T buněk v protinádorové imunitní odpovědi. *Klinická onkologie*, 23.
- Klener, P. (2008). Omezilo zavádění tzv. cílené léčby význam protinádorové chemoterapie? *Onkologie*, 2(1), 33-37.
- Kumžáková, Z., (2015). Hledání agonistů Toll-like receptorů použitelných synergicky s ligandy fagocytárních receptorů pro imunoterapii nádorových onemocnění v humánní medicíně. Diplomová práce. *Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích*. 86 s.
- Liang, W., & Ferrara, N. (2016). The complex role of neutrophils in tumor angiogenesis and metastasis. *Cancer Immunology Research*, 4(2), 83-91.
- Martinez-Pomares, L. (2012). The mannose receptor. *Journal of Leukocyte Biology*, 92(6), 1177-1186.
- Masáková, K. (2016). Nádorová imunoterapie založená na mechanismech vrozené imunity a její optimalizace. Bakalářská práce. *Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích*, 48 s.

- Miller, J. L., M deWet, B. J., Martinez-Pomares, L., Radcliffe, C. M., Dwek, R. A., Rudd, P. M., & Gordon, S. (2008). The mannose receptor mediates dengue virus infection of macrophages. *PLoS Pathogens*, 4(2), e17.
- Miller, K. D., Siegel, R. L., Lin, C. C., Mariotto, A. B., Kramer, J. L., Rowland, J. H., Stein, K. D., Alteri, R & Jemal, A. (2016). Cancer treatment and survivorship statistics, 2016. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 66(4), 271-289.
- Mittal, D., Gubin, M. M., Schreiber, R. D., & Smyth, M. J. (2014). New insights into cancer immunoediting and its three component phases—elimination, equilibrium and escape. *Current Opinion in Immunology*, 27, 16-25.
- Moreira, L. R. S. (2008). An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79(2), 165.
- Murphy, C. J., Shepherd, M. G., & Sullivan, P. A. (1983). Chemical modification of L-lactate 2-monooxygenase with fluorodinitrobenzene: evidence for two essential histidine residues. *Biochemistry*, 22(7), 1665-1669.
- Nagaraj, S., & Gabrilovich, D. I. (2008). Tumor escape mechanism governed by myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Research*, 68(8), 2561-2563.
- Netea, M. G., Joosten, L. A., Latz, E., Mills, K. H., Natoli, G., Stunnenberg, H. G., ... & Xavier, R. J. (2016). Trained immunity: a program of innate immune memory in health and disease. *Science*, 352(6284), aaf1098.
- Netea, M. G., Quintin, J., & van der Meer, J. W. (2011). Trained immunity: a memory for innate host defense. *Cell Host & Microbe*, 9(5), 355-361.
- Otáhal, P., & Trněný, M. (2015). Současné možnosti imunoterapie nádorových onemocnění. *Klinická onkologie*, 28(Suppl 3), 105-111.
- Pearce, E. L., & Pearce, E. J. (2013). Metabolic pathways in immune cell activation and quiescence. *Immunity*, 38(4), 633-643.
- Phypers, B., & Pierce, J. T. (2006). Lactate physiology in health and disease. *Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain*, 6(3), 128-132.

- Pilon-Thomas, S., Kodumudi, K. N., El-Kenawi, A. E., Russell, S., Weber, A. M., Luddy, K., Damaghi, M., Wojtkowiak, J. W., Mulé, J. J., Ibrahim-Hashim, A. & Gillies, R. J. (2016). Neutralization of tumor acidity improves antitumor responses to immunotherapy. *Cancer Research*, 76(6), 1381-1390.
- Pietras, K., & Östman, A. (2010). Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma. *Experimental Cell Research*, 316(8), 1324-1331.
- Qian, B. Z., & Pollard, J. W. (2010). Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell*, 141(1), 39-51.
- Riemann, A., Schneider, B., Ihling, A., Nowak, M., Sauvant, C., Thews, O., & Gekle, M. (2011). Acidic environment leads to ROS-induced MAPK signaling in cancer cells. *PLoS One*, 6(7), e22445.
- Romero-Garcia, S., Moreno-Altamirano, M. M. B., Prado-Garcia, H., & Sánchez-García, F. J. (2016). Lactate contribution to the tumor microenvironment: mechanisms, effects on immune cells and therapeutic relevance. *Frontiers in Immunology*, 7, 52.
- Ryan, D. P., Hong, T. S., & Bardeesy, N. (2014). Pancreatic adenocarcinoma. *New England Journal of Medicine*, 371(11), 1039-1049.
- Salo-Mullen, E. E., O'reilly, E. M., Kelsen, D. P., Ashraf, A. M., Lowery, M. A., Yu, K. H., ... Reidy, D. L., Epstein, A. S., Lincoln, A., Salida, A., Rau-Murthy, R., Zhang, L., Kurtz, R. C., Saltz, L., Offit, K., Robson, M. & Jacobs, L. M. (2015). Identification of germline genetic mutations in patients with pancreatic cancer. *Cancer*, 121(24), 4382-4388.
- Sathornsumetee, S., Reardon, D. A., Desjardins, A., Quinn, J. A., Vredenburgh, J. J., & Rich, J. N. (2007). Molecularly targeted therapy for malignant glioma. *Cancer*, 110(1), 13-24.
- Schuster, M., Nechansky, A., & Kircheis, R. (2006). Cancer immunotherapy. *Biotechnology Journal*, 1(2), 138-147.
- Shekarian, T., Valsesia-Wittmann, S., Brody, J., Michallet, M. C., Depil, S., Caux, C., & Marabelle, A. (2017). Pattern recognition receptors: immune targets to enhance cancer immunotherapy. *Annals of Oncology*, 28(8), 1756-1766.

- Shevchenko, I., Karakhanova, S., Soltek, S., Link, J., Bayry, J., Werner, J., Umansky, J., & Bazhin, A. V. (2013). Low-dose gemcitabine depletes regulatory T cells and improves survival in the orthotopic Panc02 model of pancreatic cancer. *International Journal of Cancer*, *133*(1), 98-107.
- Shibata, D. (2012). Heterogeneity and tumor history. *Science*, *336*(6079), 304-305.
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2018). Cancer statistics, 2018. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *68*(1), 7-30.
- Smyth, M. J., Cretney, E., Kelly, J. M., Westwood, J. A., Street, S. E., Yagita, H., ... & Hayakawa, Y. (2005). Activation of NK cell cytotoxicity. *Molecular Immunology*, *42*(4), 501-510.
- Šťastný, M., & Říhová, B. (2015). Únikové strategie nádorů pozornosti imunitního systému. *Klinická Onkologie*, *28*(Suppl 4), 4S28-4S37.
- Takahashi, K., & Ezekowitz, R. A. B. (2005). The role of the mannose-binding lectin in innate immunity. *Clinical Infectious Diseases*, *41*(Supplement_7), S440-S444.
- Teng, M. W., Galon, J., Fridman, W. H., & Smyth, M. J. (2015). From mice to humans: developments in cancer immunoediting. *The Journal of Clinical Investigation*, *125*(9), 3338-3346.
- Thompson, M. R., Kaminski, J. J., Kurt-Jones, E. A., & Fitzgerald, K. A. (2011). Pattern recognition receptors and the innate immune response to viral infection. *Viruses*, *3*(6), 920-940.
- Thota, R., Pauff, J. M., & Berlin, J. D. (2014). Treatment of metastatic pancreatic adenocarcinoma: a review. *Oncology (Williston Park)*, *28*(1), 70-4.
- Trédan, O., Galmarini, C. M., Patel, K., & Tannock, I. F. (2007). Drug resistance and the solid tumor microenvironment. *Journal of the National Cancer Institute*, *99*(19), 1441-1454.
- Turvey, S. E., & Broide, D. H. (2010). Innate immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *125*(2), S24-S32.

- Underhill, D. M., & Gantner, B. (2004). Integration of Toll-like receptor and phagocytic signaling for tailored immunity. *Microbes and Infection*, 6(15), 1368-1373.
- Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C., & Thompson, C. B. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*, 324(5930), 1029-1033.
- Vaupel, P. (2004). The role of hypoxia-induced factors in tumor progression. *The Oncologist*, 9(Supplement 5), 10-17.
- Vigneron, N. (2015). Human tumor antigens and cancer immunotherapy. *BioMed Research International*, 2015.
- Vitale, M., Cantoni, C., Pietra, G., Mingari, M. C., & Moretta, L. (2014). Effect of tumor cells and tumor microenvironment on NK-cell function. *European Journal of Immunology*, 44(6), 1582-1592.
- Vitásková, D., & Melichar, B. (2015). Imunoterapie v léčbě solidních nádorů. *Onkologie*, 9(1), 10-12.
- Vodička, I. (1998). Biofyzikální základy radioterapie zhoubných nádorů. *ACTA MEDICA (Hradec Králové) SUPPL*, 2, 105-163.
- Walenta, S., & Mueller-Klieser, W. F. (2004, July). Lactate: mirror and motor of tumor malignancy. In *Seminars in Radiation Oncology* (Vol. 14, No. 3, pp. 267-274). Elsevier.
- Wang, J. E., Jørgensen, P. F., Almlöf, M., Thiemermann, C., Foster, S. J., Aasen, A. O., & Solberg, R. (2000). Peptidoglycan and lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus* induce tumor necrosis factor alpha, interleukin 6 (IL-6), and IL-10 production in both T cells and monocytes in a human whole blood model. *Infection and Immunity*, 68(7), 3965-3970.
- Warburg, O., Wind, F., & Negelein, E. (1927). The metabolism of tumors in the body. *The Journal of General Physiology*, 8(6), 519.