

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

**Nádorová imunoterapie založená na použití ligandů fagocytárních
receptorů, kotvených na nádorové buňky. Studium možností
zesílení jejího účinku a specifity**

Diplomová práce

Bc. Hana Husníková

Vedoucí práce: RNDr. Jan Ženka, CSc.

České Budějovice 2014

Husníková, H., 2014: Nádorová imunoterapie založená na použití ligandů fagocytárních receptorů, kotvených na nádorové buňky. Studium možností zesílení jejího účinku a specifity. [Cancer immunotherapy based on the use of ligands of phagocytic receptors anchored to tumor cells. Study of possibilities of amplification of its effect and specificity. Mgr. Thesis, in Czech] - 83 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

ANOTACE:

The main goal of this thesis was to study cancer immunotherapy based on combination of ligands of TLR and phagocytic receptor agonists. This study is focused on looking for proper and save TLR stimulation and specific anchoring of phagocytic ligands.

PROHLÁŠENÍ:

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

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

V Českých Budějovicích, 12. 12. 2014

.....
Husníková Hana

Poděkování:

Na tomto místě bych chtěla poděkovat především svému školiteli RNDr. Janu Ženkovi, CSc. za jeho trpělivost a ochotu mi kdykoliv a s čímkoliv pomoci při vedení této diplomové práce. Velký dík patří také Mgr. Veronice Caisové za trpělivost, ochotu a pomoc při metodickém postupu a zpracování výsledků průtokové cytometrie. Dále děkuji pracovníkům Oddělení imunologie parazitů Parazitologického ústavu AV ČR v Českých Budějovicích za vytvoření příjemného pracovního prostředí. A v neposlední řadě si velké poděkování zaslouží má rodina, která mě po celou dobu studia velice podporovala.

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	PŘEHLED LITERATURY	2
2.1	Nádorová onemocnění	2
2.1.1	Extracelulární prostředí nádoru	2
2.1.2	Příčiny vzniku nádorového onemocnění	3
2.1.3	Klasifikace nádorů	5
2.1.4	Melanom	6
2.1.4.1	Studovaný druh nádoru v této práci – melanom B16-F10	7
2.1.5	Terapie nádorového onemocnění	7
2.2	Imunitní systém a nádorové bujení	8
2.2.1	Nespecifická imunita	9
2.2.2	Specifická imunita	10
2.2.3	Protinádorová imunologie	11
2.2.3.1	Nádorové antigeny	11
2.2.3.2	Vzájemný vztah rakoviny a imunitního systému	12
2.2.3.3	Mechanismy odolnosti a úniku nádorových buněk před imunitním systémem	14
2.3	Imunoterapie nádorových onemocnění	16
2.4	Imunoterapie nádorových onemocnění založená na antigenně specifické imunitě	16
2.5	Imunoterapie nádorových onemocnění založená na nespecifické imunitě	18
2.5.1	Pathogen associated molecular patterns (PAMPs)	18
2.5.2	Pathogen recognition receptors (PRRs)	19
2.5.2.1	PRRs cytoplasmatické	19
2.5.2.2	PRRs sekretované	20
2.5.2.3	PRRs membránové	20
2.5.3	PAMPs a jejich terapeutické využití	22
2.6	Nádorová terapie založená na kombinaci TLR agonistů a ligandů fagocytárních receptorů	23
2.6.1	TLR agonisté	23
2.6.1.1	Lipopolysacharidy (LPS), agonisté TLR4	23
2.6.1.2	Flagelin - TLR5 agonista	26
2.6.1.3	Resiquimod (R-848) – TLR7 a TLR8 agonista	27
2.6.2	Fagocytární receptory a jejich agonisté	27
2.6.2.1	Manan, manozu vázající lektin (MBL), lektinová cest aktivace komplementu, manozový receptor	27
2.6.2.2	Beta-glukan, aktivace komplementového receptoru CR3	29
2.6.2.3	N-formylmethioninové peptidy a jejich receptoru (FPR)	31
2.7	Fosfatidylserin (PS)	34
2.7.1	CD47 a jeho blokace	35
3	CÍLE PRÁCE	36
4	MATERIÁL A METODY	37
4.1	Chemikálie	37
4.1.1	Příprava terapeutických látek	39
4.2	Laboratorní zvířata	40
4.3	Buňky melanomu B16-F10	40
4.4	Příprava buněk B16-F10 pro transplantaci	40
4.5	Transplantace buněk B16-F10	41
4.6	Měření velikosti nádorů	41

4.7	Počítání plicních metastáz	41
4.8	Analýza dat	41
4.9	Experimenty.....	43
4.9.1	Terapie melanomu pomocí f-MLFG ₅ K ₈ (K(STE))(K(STE))-NH ₂ a případná synergie s LPS nebo flagelinem	43
4.9.2	Terapie melanomu pomocí beta-glukanu aplikovaného perorálně a případná synergie s mannan-BAM.....	43
4.9.3	Terapie melanomu pomocí beta-glukanu aplikovaného intraperitoneálně a případná synergie s mannan-BAM.....	44
4.9.4	Terapie melanomu pomocí beta-glukanu aplikovaného subkutánně a případná synergie s mannan-BAM.....	45
4.9.5	Terapie melanomu pomocí beta-glukanu aplikovaného intratumorálně a případná synergie s mannan-BAM.....	45
4.9.6	Terapie melanomu prostřednictvím f-MLFKKK14AK a případná synergie s LPS	46
4.9.7	Použití anti CD47 aptameru v nádorové terapii	47
4.9.8	Studium otázky exprese fosfatidylserinu na povrchu nádorových buněk pomocí průtokové cytometrie.....	47
4.9.8.1	Míra exprese fosfatidylserinu na melanomových buňkách B16-F10 z buněčné kultury v závislosti na pH	47
4.9.8.2	Porovnání exprese fosfatidylserinu na melanomových buňkách B16-F10 z buněčné kultury a z prostředí nádoru	49
5	VÝSLEDKY	50
5.1	Terapie melanomu pomocí f-MLFG ₅ K ₈ (K(STE)) (K(STE))-NH ₂ a případná synergie s LPS nebo flagelinem.....	50
5.2	Terapie melanomu pomocí beta-glukanu aplikovaného perorálně a případná synergie s mannan-BAM	53
5.3	Terapie melanomu pomocí beta-glukanu aplikovaného intraperitoneálně a případná synergie s mannan-BAM.....	54
5.4	Terapie melanomu pomocí beta-glukanu aplikovaného subkutánně a případná synergie s mannan-BAM.....	55
5.5	Terapie melanomu pomocí beta-glukanu aplikovaného intratumorálně a případná synergie s mannan-BAM.....	56
5.6	Terapie melanomu prostřednictvím f-MLFKKK14AK a případná synergie s LPS..	57
5.7	Použití anti CD47 aptameru v nádorové terapii	59
5.8	Studium otázky exprese fosfatidylserinu na povrchu nádorových buněk pomocí průtokové cytometrie.....	62
5.8.1	Míra exprese fosfatidylserinu na melanomových buňkách B16-F10 z buněčné kultury v závislosti na pH.....	62
5.8.2	Porovnání exprese fosfatidylserinu na melanomových buňkách B16-F10 odebraných z buněčné kultury a jeho srovnání s <i>in vivo</i> pokusy	65
6	DISKUZE.....	67
7	ZÁVĚR.....	74
8	POUŽITÁ LITERATURA.....	75

1 ÚVOD

Nádorová onemocnění představují v České republice druhou nejčastější příčinu úmrtí. Data poskytovaná Ústavem zdravotnických informací hovoří jasně: každý třetí člověk onemocní v průběhu svého života rakovinou a každý čtvrtý na ni umírá. Udává se, že každý rok v ČR zemře na rakovinu více než 27 tisíc osob, což je 23 % z celkové úmrtnosti. V roce 2010 bylo do Národně onkologického registru ČR nahlášeno 82 606 případů zhoubných novotvarů a novotvarů in situ (Zvolský 2013).

Z uvedeného vyplývá, že nádorová onemocnění patří mezi nejhorší onemocnění vůbec a je potřeba s těmito nemocemi bojovat. Chirurgické odstranění nádorů, doplněné o chemoterapii či radioterapii, se zdá být v první fázi léčby vhodným terapeutickým přístupem. Ale ne vždy je plně úspěšné. Hlavní problém je ve specifčnosti terapie, při níž jsou poškozovány jak buňky nádorové, tak i buňky zdravé. Proto je třeba zavést jiný léčebný postup, tzv. cílenou imunoterapii, která pomáhá vyřešit nedostatky dosavadních terapií. Právě imunoterapií nádorového onemocnění se zabývá tato diplomová práce.

Imunoterapie je na rozdíl od chemoterapie či radioterapie šetrnější léčebná metoda, která je založená na aktivaci imunitních systémů těla vlastních. Další výhodou je využití imunitních mechanismů, které cíleně směřují léčivo do nádorových buněk a tím nejsou zdravé buňky poškozovány. Obsahem této diplomové práce je studium imunoterapie založené na kombinaci agonistů TLR a fagocytárních receptorů a možnosti její výhledové aplikace v humánní medicíně.

2 PŘEHLED LITERATURY

2.1 Nádorová onemocnění

Nádorové onemocnění je různorodá skupina onemocnění, při kterých dochází k nekontrolovatelnému dělení nádorových buněk. Nádorové buňky vznikají často maligní transformací, která je důsledkem selhání rozmanitých mechanismů regulace buněčného dělení a regulace sociálního chování buněk. Takové poruchy bývají obvykle vyvolané mutacemi v tzv. onkogenech nebo anti-onkogenech. Nádorové buňky vznikají z normálních buněk, což přináší řadu problémů při jejich eliminaci imunitním systémem. Odlišnosti od normálních buněk jsou buď příliš malé, takže jsou imunitním systémem ignorovány. Nebo nádorové buňky používají mechanismy, které jim umožňují paralyzovat některé účinky imunitního systému (Hořejší a Bartůňková 2009).

Mezi základní charakteristické znaky nádorových buněk patří šest biologických schopností získaných během vícestupňového vývoje nádorů. Jsou to: neschopnost odpovídat na signály pro ukončení růstu, schopnost růst bez přítomnosti většiny růstových faktorů, omezená citlivost až rezistence vůči indukci programované buněčné smrti, indukce angiogeneze neboli stimulace růstu krevních kapilár zásobujících nádor, neomezená schopnost dělení a invazivita spojená se schopností metastazovat neboli schopnost šířit se do vzdálených tkání (Hanahan a Weinberg 2011). Kromě těchto základních biologických schopností, které jsou pozorovány v různé míře u všech nádorových buněk, se vyskytují ještě i jiné schopnosti: přeprogramování metabolických drah, schopnost unikát imunitnímu dohledu a častá přítomnost nádor podporujícího zánětu v okolí nádorových buněk. Nádory vykazují další rozměr složitosti. Kromě nádorových buněk obsahují široký repertoár zdánlivě normálních buněk, které přispívají k získání speciálních charakteristických znaků tím, že vytvoří „nádorové mikroprostředí“ (Hanahan a Weinberg 2011).

2.1.1 Extracelulární prostředí nádoru

Zdravé buňky žijí v prostředí, ve kterém jsou přísně regulovány mechanismy buněčného cyklu. To znamená, že je zde rovnováha mezi proliferací, maturací, diferenciací a apoptózou. Regulaci buněčného cyklu zajišťuje velké množství látek enzymové a neenzymové povahy. Při narušení rovnováhy buněčného cyklu dochází buď k omezené schopnosti dělení buněk, anebo naopak k nekontrolovatelnému dělení, jako je tomu v případě nádorového onemocnění.

Mikroprostředí v nádorech se fyziologicky liší od normálních tkání. Je charakterizováno nízkým (hypoxie) až nedostatečným (anoxie) zásobením tkání kyslíkem, deprivací živin a energie, vysokou hladinou laktátu a extracelulární acidózou. Tyto změny umožňují nádorům určitou progresi a rezistenci vůči léčbě (Vapuel 2004). Úspěšná adaptace na měnící se podmínky mikroprostředí hraje klíčovou roli při karcinogenezi. Bylo zjištěno, že vlivem selektivního tlaku v nádorech jsou zvýhodněny buňky, jejichž metabolismus lépe reaguje na lokální změny hladiny kyslíku, glukózy a pH. Přežívání a proliferace nádorových buněk je omezena v důsledku snížené hladiny kyslíku. Nízká hladina kyslíku ovlivňuje glykolýzu. Zvýšená glykolýza indukuje okyselení nádorového prostředí, omezení proliferace a indukci buněčné smrti prostřednictvím nekrózy a apoptózy. Tak vznikají rezistentní fenotypy (Smallbone a kol. 2007).

Kolem bazální membrány se vytváří tenká vrstva epiteliálních buněk. Mechanismy zajišťující homeostázu nedovolují epitelu zasahovat do bazální membrány. Vlivem karcinogeneze je homeostáza narušena a nádorové buňky se stávají hyperplastickými, tedy rychle proliferujícími. Vlivem proliferace se tloušťka normálního epitelu zvětší a začne zasahovat do bazální membrány. Tím je narušena vzdálenost mezi bazální membránou a krevním řečištěm. To znamená, že živiny a odpadní látky musí překonávat mnohem větší vzdálenost a proto nádorové buňky žijí v prostředí s malým či nedostatečným zásobením kyslíkem (hypoxie až anoxie) (Smallbone a kol. 2007).

Hypoxie až anoxie způsobí, že buňka není schopná pokrýt své energetické nároky. Důsledkem je zvýšená frekvence glykolýzy a tím i zvýšená produkce H^+ iontů. Vlivem vyšší hladiny H^+ iontů dochází ke změně pH v místě nádoru, k tzv. acidifikaci nádorového mikroprostředí. Změna pH vyvolá apoptózu u buněk, které obsahují funkční protein p53. Tím jsou v místě nádoru eliminovány zdravé buňky a naopak se zde hromadí buňky nádorové, které mají rezistenci ke kyselému pH. Kyselé prostředí navíc umožňuje některým nádorovým buňkám pronikat k bazální membráně, dostat se do blízkosti krevních a lymfatických elementů a tím zakládat vzdálená ložiska krevní cestou, tzv. metastazovat (Smallbone a kol. 2007).

2.1.2 Příčiny vzniku nádorového onemocnění

Je všeobecně známo, že nádorová onemocnění vznikají v důsledku nahromadění mutací v genech na úrovni DNA buňky (Hemminki 1993). Rozlišujeme tři hlavní druhy genů, jejichž poškození může vzniknout rakovina – **onkogeny**, **tumor supresorové geny** a **reparační geny** (Ringer a Schniper 2001).

Většina onkogenů vzniká důsledkem mutací určitých normálních genů, tzv. protoonkogenů. Protoonkogeny jsou „dobré“ geny, které za normálních okolností kódují velké množství proteinů s různými funkcemi (např. signální molekuly, geny buněčné signalizace, regulační geny, cykliny). Když protoonkogen zmutuje na onkogen, stává se z něj „špatný“ gen, který způsobí, že buňka roste mimo kontrolu a to vede k rozvoji rakoviny. Převážná část mutací na úrovni onkogenů je získaná, ne dědičná. To znamená, že onkogeny vznikají v důsledku chromosomální přestavby, genovou duplikací či mutací (Ringer a kol. 2001). Tumor supresorové geny jsou normální geny, které zpomalují dělení buněk, opravují DNA chyby, nebo řídí programovanou buněčnou smrt. Pokud tumor supresorové geny nepracují správně, mohou buňky růst mimo kontrolu, což může vést k rakovině (Ringer a kol. 2001). Proteiny reparačních genů jsou zodpovědné za stabilitu genomu, jelikož opravují chyby na úrovni DNA molekuly. Pokud i tyto geny jsou poškozeny, chyby na úrovni DNA zůstávají a výsledkem je také nekontrolovatelný růst nádorových buněk a rozvoj rakoviny (Wood a kol. 2001).

Za změnu genetického materiálu v buňce jsou zodpovědné mutageny. Mutageny mohou být **chemické, fyzikální** nebo **biologické povahy**. **1) chemickými mutageny** jsou látky chemické povahy (např. kyslíkové radikály, těžké kovy, polycyklické aromatické uhlovodíky), které buď poškozují DNA, anebo poškozují mechanismy zodpovídající za buněčný cyklus (Hemminki 1993). **2) Mezi fyzikální mutageny** řadíme různé druhy záření (UV, RTG záření, ionizující záření), které také poškozují buňku na úrovni DNA molekuly (Brash a kol. 1991). **3) Biologickými mutageny** jsou tzv. onkogenní viry (např. virus Epsteina-Baarové, herpetické viry, adenoviry a další), které mohou v infikovaných buňkách hostitele způsobovat mutace v DNA (McLaughlin a Munger 2009). Všechny mutageny nejsou doposud známé, a proto není snadné určit přesnou příčinu rakoviny.

2.1.3 Klasifikace nádorů

Nádory klasifikujeme podle biologických vlastností, histologické struktury a podle anatomické lokalizace (Vorlíček a kol. 2012). Každá tkáň, u které je podezření výskytu nádorových buněk, musí být poslána na oddělení patologické anatomie a řádně vyšetřena lékařem. Lékař danou tkáň vyšetří morfoloogicky, případně imunohistochemicky, molekulárně-geneticky či cytologicky.

Biologickými vlastnostmi nádorů myslíme invazivitu a schopnost metastazovat. Na základě těchto vlastností dělíme nádory do dvou základních skupin:

- **Benígní nádory** - nezhooubné nádory rostoucí expanzivně. Zůstávají na místě svého vzniku, nezakládají dceřiná ložiska krevní cestou (nemetastazují), ale svým neomezeným růstem mohou okolní tkáň a orgány ohrozit. Benígní nádory se výrazně neliší od původní tkáň a obvykle nemají větší negativní účinek na organismus (Vorlíček a kol. 2012).
- **Malígní nádory** - zhoubné nádory rostoucí zpravidla rychle. Šíří se infiltrativně a destruktivně do okolí prostřednictvím krevních a lymfatických cév, kde zakládají vzdálená ložiska - metastázy. Malígní nádory připomínají mikroskopicky nezralé tkáň (Vorlíček a kol. 2012). Metastázování patří k hlavním projevům malígních nádorů a může být trojího typu: **porogenní, hematogenní, lymfogenní**. **1) Metastázování porogenní** je šíření buněk v tělních dutinách nebo štěrbinách, kde nepřítomnost anatomických překážek umožňuje volný pohyb buněk. **2) Metastázování krevním řečištěm (hematogenní)** je proces, kdy nádorové buňky vniknou do krevní cévy, tokem krve jsou zaneseny na vzdálené místo a zde se usídlí, rozmnoží a vytvoří nové ložisko. **3) Metastázování lymfatickými cestami (lymfogenní)** je analogické zakládání nových ložisek v průběhu lymfatických cest a jejich „filtrů“ – lymfatických uzlin (Vorlíček a kol. 2012).

Další způsob klasifikace je podle histologické struktury, kde rozeznáváme nádory pojivové tkáň, nádory krycí a výstelkové tkáň, nádory z krve tvorné a lymfatické tkáň, nádory nervové tkáň, nádory ze zárodečných tkání a nádory smíšené pocházející z více tkání (Vorlíček a kol. 2012).

Důležitá je i klasifikace nádorů podle anatomické lokalizace, tzn. místa, kde se nádor u pacienta vyskytuje, např. nádory tlustého střeva, prsu, vaječníků, varlat, prostaty, plic, kůže apod.

2.1.4 Melanom

Maligní melanom je nádorové onemocnění postihující převážně kůži, vzácně může postihnout i jiná místa jako např. oko, ucho, GIT, sliznici úst (Tuong a kol. 2012). Jedná se o agresivní typ nádoru a klinické příznaky se mohou výrazně lišit. Tento typ nádoru je zodpovědný za téměř 60% letálních kožních nádorů a jeho výskyt se v posledních dvou desetiletích značně zvýšil u bílé populace (Bandarchi a kol. 2010). Vzniká z maligní transformace melanocytů (Tuong a kol. 2012). Melanocyty jsou kožní pigmentové buňky, jejichž hlavní funkcí je tvorba pigmentu melaninu. Tento pigment chrání pokožku před UV zářením. Pokud je narušena tvorba melaninu, vznikají melanomové buňky a z nich kožní nádory (Bandarchi a kol. 2010).

Nejrizikovějším faktorem je UV záření. Proto se tento typ nádorů vyskytuje nejvíce u bílé populace vystavené vysoké intenzitě slunečního záření. Dalšími rizikovými faktory jsou např. mutace v genech KIT, BRAF a NRAS, dědičné predispozice, nadměrné užívání solária (Williams a Sagebiel 1994).

Klinicky se maligní melanom projevuje jako drobná pigmentová skvrna na kůži, nejčastěji hnědé nebo modro-černé barvy. Skvrna často mění tvar, barvu a velikost (Williams a Sagebiel 1994). Pro snadnější diagnostiku bylo vytvořeno ABCDE pravidlo, které umožňuje rozeznat varovné příznaky melanomu (Bandarchi a kol. 2010):

- A – Asymetry (asymetrie) – nepravidelnost pigmentové skvrny
- B – Border (nepravidelnost ohraničení) – okraje nejasně ohraničené s četnými výběžky
- C – Color variegation (barevná pestrost) – různé odstíny hnědé, šedé a černé
- D – Diameter (průměr) – rozměr větší než 6 mm
- E – Evolution (vývoj) – změna skvrny v průběhu několika posledních týdnů či měsíců

Podle biologického chování rozlišujeme 5 typů maligního melanomu: Lentigo maligna melanom (LMM), povrchově šířící se melanom (Superficial spreading melanoma-SSM), nodulární melanom (Nodular melanoma-NM), akrolentiginózní melanom (Acral-lentiginous melanoma-ALM) a mukolentiginózní melanom (Mucosal lentiginous melanoma-MLM) (Bandarchi a kol. 2010).

2.1.4.1 Studovaný druh nádoru v této práci – melanom B16-F10

Myši začaly být používány jako modelový organismus na začátku 20. století, kdy byl poprvé objeven spontánní melanom, který vznikl na inbredních kmenech myší. Tyto spontánní melanomy byly dobře transplantovatelné na kongenních myších a navíc bylo možno je dobře kultivovat a studovat *in vitro*. Díky těmto vlastnostem se staly ústředním prostředkem k řešení základních otázek v biologii melanomu (Damsky a Bosenberg 2010). Nejpoužívanějším melanomem je melanom B16. U tohoto typu rozlišujeme 4 buněčné linie: B16-F0, B16-F1, B16-F10 a B16-BL6. Buněčná linie B16-F10 je nejpoužívanější v laboratorních pokusech, jelikož rychle roste a dobře metastazuje do plic (Nakamura a kol. 2002).

2.1.5 Terapie nádorového onemocnění

Terapie nádorového onemocnění prodělaly za posledních několik desítek let značný pokrok a v dnešní době jsou lékaři schopni vyléčit velké množství nádorů. Zároveň je k dispozici mnoho prostředků, které sice rakovinu nevyléčí, ale díky nimž jsou lékaři schopni zajistit nemocným pacientům kvalitní prožití zbytku života. Veškerou terapii nádorů můžeme rozdělit na kurativní a paliativní.

1) Kurativní terapie – cílem kurativní terapie je nádor vyléčit (zlikvidovat celý nádorový proces) (Frei 1985). K dispozici je několik typů terapií, ale nejvíce se používají čtyři základní: chirurgická léčba, chemoterapie, radioterapie a biologická léčba.

a) Chirurgická léčba – chirurgické odstranění nádorů představuje jeden z nejstarších způsobů léčby rakoviny a mnohdy bývá jediným léčebným postupem, který dokáže pacienta vyléčit. Často bývá prvním krokem v léčbě rakoviny, který je kombinován s radioterapií nebo chemoterapií. Principem je odstranění celého primárního nádoru s určitou oblastí zdravé okolní tkáně. Nevýhodou je, že po chirurgickém zákroku nejsou z těla odstraněny metastázy (Eedy 2003).

b) Chemoterapie – podstatou chemoterapie je podání toxické sloučeniny (cytostatik) do těla pacienta. Tyto sloučeniny působí na všechny buňky v těle, avšak nejvíce působí na rychle se množící buňky, jako jsou právě buňky nádorové. Přes tuto výhodu si chemoterapie nezískala prvotní místo v klinické léčbě rakoviny. Hlavním problémem je vysoká toxicita pro všechny buňky těla. V současné době je chemoterapie vyhrazena pro pacienty s progresivním metastatickým onemocněním (Virgil a Huang 1982).

c) Radioterapie - princip radioterapie spočívá v toku elektronů nebo fotonů, který působí na nádorovou masu (Strojan 2010). Ozařováním jsou destruovány všechny buňky v těle, ale v mnohem větší míře buňky nádorové. Poškození okolní zdravé tkáně a vznik sekundárních zhoubných nádorů, které vznikají jako důsledek léčby ozařováním, představuje hlavní problém radioterapie (Sebag-Montefiore a kol. 2009). Proto se radioterapie také neřadí na první místo v klinické léčbě rakoviny, ale spíše doplňuje chemoterapii nebo chirurgickou léčbu (Strojan 2010).

d) Biologická léčba – o biologické léčbě můžeme mluvit také jako o cílené terapii, kdy jsou pacientovi podávány látky o různém chemickém složení a s různými mechanismy účinku, které stimulují imunitní systém k boji proti rakovině. Cílená terapie využívá znalostí pochodů dějů jak uvnitř buňky, tak na jejím povrchu. Princip spočívá buď v navázání protilátek na povrchové receptory, nebo se používají různé inhibitory přenosu signálů do buňky. Příkladem biologických léčiv jsou monoklonální protilátky proti cytokinům, rekombinantní peptidy a proteiny nebo syntetické oligonukleotidy. Problémem této léčby jsou enormní ceny biologických léčiv. A navíc biologické preparáty doprovází řada nežádoucích účinků (Trail a kol. 2003).

2) Paliativní terapie – hlavním cílem této léčby není nádor vyléčit. Paliativní terapie si především klade za cíl zlepšit kvalitu života nemocného. Právě kvalita života je u nevléčitelně nemocného pacienta jedna z nejdůležitějších věcí a neměla by se opomíjet (Bronson 1967).

2.2 Imunitní systém a nádorové bujení

V prostředí, ve kterém žijeme, je lidské tělo vystaveno velké škále různých infekčních organismů, nazývaných patogeny, které vnímají naše tělo jako snadno napadnutelný cíl. Hlavní funkcí savčího imunitního systému je bránit tělo právě proti těmto patogenům jako jsou bakterie, viry, houby, plísně a parazitičtí červi. Tato úloha je tak komplexní, že si savci vyvinuli velmi účinný a sofistikovaný systém obrany, který je schopen rozpoznat a usmrtit případný patogen (Dzivenu a kol. 2003). Obranný imunitní systém by měl fungovat i v protinádorové imunologii. Do jisté míry tomu tak je, ale velmi často se stává, že nádorové buňky jsou schopny unikat imunitnímu dozoru, nejsou tak eliminovány a rozvíjí se rakovina (Hořejší a Bartůňková 2009).

Jinými slovy, imunitním systémem myslíme komplex mechanismů, který zajišťují integritu organismu tím, že rozpoznává škodlivé od neškodného a chrání tak organismus proti infekčním agens zevního i vnitřního původu. Tato funkce se projevuje jako obranyschopnost, autotolerance a imunitní dohled (Hořejší a Bartůňková 2009).

Imunitní systém je tvořen dvěma složkami – vrozenou (nespecifickou) imunitou a získanou (specifickou) imunitou. Je prokázáno, že u obratlovců jsou obě tyto složky nepostradatelné a úzce spolupracují (Medzhitov a Janeway 2002, Hořejší a Bartůňková 2009).

2.2.1 Nespecifická imunita

Vrozený imunitní systém se vyvinul před více jak 900 miliony lety, aby chránil hostitele (Dzivenu a kol. 2003). Nespecifické mechanismy jsou založeny na molekulách a buňkách, které jsou v organismu připraveny předem a bývají obvykle účinné proti mnoha různým patogenům. Účinnost spočívá v reakci na strukturní nebo funkční rysy, které jsou patogenům společné. Vrozená imunita je tvořena dvěma složkami – **buněčnou a humorální** (Hořejší a Bartůňková 2009). **Buněčnou složku** tvoří fagocytující buňky (neutrofil, makrofágy a dendritické buňky) a přirozeně cytotoxické buňky (NK buňky, eosinofily, mastocyty) (Dzivenu a kol. 2003). **Humorální složka** je tvořena komplementovým systémem, interferony, lektiny a jinými sérovými proteiny. Složky nespecifické imunity reagují na přítomnost škodliviny rychle, řádově v minutách. A na rozdíl od specifické imunity nemají složky nespecifické imunity tzv. imunologickou paměť, tj. nejsou ovlivněny předchozím setkáním se škodlivinou (Hořejší a Bartůňková 2009).

Kromě buněčné a humorální složky má pro obranu organismu proti infekci a udržování jeho integrity vůči okolí zásadní význam neporušený povrch kůže a sliznice a jejich přirozené neimunitní obranné mechanismy. Ty lze rozdělit na **mechanické** (pohyb řasinek, longitudinální tok vzduchu v dýchacích cestách nebo tekutiny v močových cestách), **chemické** (mastné kyseliny na kůži, enzymy jako např. lysozym ve slinách, slzách a potu, pepsin v žaludku a střevě, kyselé pH žaludku a moči) a **mikrobiální** (normální nepatogenní flóra soutěžící s patogenními mikroorganismy o živiny a o receptorová místa, která zprostředkuje adhezi na epitel a produkuje antibakteriální látky) (Hořejší a Bartůňková 2009). Pokud jsou tyto obranné bariéry překonány, musí do boje s infekčními patogeny nastoupit buňky nespecifické imunity. Tyto buňky mají na svém povrchu tzv. pathogen recognition receptors (PRRs), které rozpoznávají pathogen associated molecular patterns (PAMPs). PAMPs jsou malé konzervativní struktury vyskytující se

na povrchu všem mikroorganismů. Jakmile PRRs rozpoznají infekční PAMPs dochází k rozvinutí imunitní reakce proti danému patogenu (např. fagocytóza, aktivace komplementu) (Dzivenu a kol. 2003).

2.2.2 Specifická imunita

Specifická imunita je evolučně mladší a je charakterizována třemi univerzálními znaky – **specifitou**, **diverzitou** a **imunologickou pamětí**. Specifitou myslíme schopnost imunitního systému reagovat proti specifickým molekulám nazývaných antigeny. Je totiž důležité, aby imunitní systém uměl zareagovat na exo- či endogenní škodlivé látky, ale zároveň uměl tolerovat struktury těla vlastní – jev zvaný autoimunita. Diverzita, schopnost reagovat na jakoukoli molekulu, je dalším znakem imunitního systému. Stejně jako imunologická paměť - imunitní systém vytváří unikátní skupinu buněk, nazývaných paměťové buňky, které při opakovaném setkání s antigenem jsou schopny rychlé sekundární imunitní odpovědi (Dzivenu a kol. 2003).

Specifická imunitní odpověď zahrnuje repertoár specializovaných buněk, chemikálií a hormonů, které pracují vysoce koordinovaným způsobem (Dzivenu a kol. 2003). **Humorální složka** je založená na protilátkách, **buněčná složka** je založená převážně na T lymfocytech a B lymfocytech.

Vývoj B lymfocytů probíhá u lidí v kostní dřeni a dokončuje se po setkání s antigenem v sekundárních lymfatických orgánech (slezina, uzliny, Peyerovy pláty) (Hořejší a Barůňková 2009). Po setkání s antigenem se B lymfocyty diferencují buď na plasmatické buňky, které produkují protilátky, anebo na paměťové buňky, které jsou zodpovědné za imunologickou paměť (LeBien a Tedder 2008). To znamená, že po dalším setkání se stejným antigenem (často i po mnoha letech) jsou rychle aktivovány a zahájí tzv. sekundární odpověď, která je mnohem rychlejší a efektivnější než odpověď primární (Hořejší a Bartůňková 2009). Kromě základní role v humorální imunitě jsou B lymfocyty nezbytné pro zahájení T buněčných imunitních reakcí. B lymfocyty fungují jako antigen prezentující buňky (APC), jelikož na svém membránovém povrchu mají antigenně specifický receptor B (tzv. BCR), kterým rozpoznávají příslušný antigen. Po navázání příslušného antigenu na BCR se B lymfocyt mění buď na plasmatickou buňku, paměťovou buňku, nebo daný antigen prezentuje spolu s molekulami hlavního histokompatibilního komplexu (MHC) T lymfocytům (LeBien a Tedder 2008).

Hlavní část vývoje T lymfocytů probíhá v brzlíku (thymus). Ale některé subpopulace T lymfocytů se zřejmě vyvíjí i mimo thymus. Thymus opouštějí dvě fenotypicky odlišné

subpopulace: prekurzory pomocných T buněk (Th), které mají na povrchu receptor zvaný CD4, a prekurzory cytotoxických T buněk (Tc), které mají na povrchu receptor CD8 (Hořejší a Bartůňková 2009). Prekurzory T lymfocytů mají na svém povrchu T buněčný receptor (tzv. TCR), kterým rozpoznávají příslušný antigen. Antigen je prezentován antigen prezentujícími buňkami (APC) společně s MHC glykoproteiny I. třídy případně s MHC glykoproteiny II. třídy. Když se prekurzor T lymfocytů setká s antigenem prezentovaným vhodnou APC, dochází k jeho diferenciaci na zralou efektorovou buňku (Springer 1990). Zralý Th lymfocyt produkuje řadu cytokinů regulujících jiné buňky, pro zralý Tc lymfocyt (zvaný také jako CTL) je charakteristická schopnost cytotoxicky zabíjet jiné buňky (Hořejší a Bartůňková 2009).

2.2.3 Protinádorová imunologie

Organismy mají přirozenou schopnost zabránit vzniku a vývoji tumorů. Touto schopností myslíme ochranné kontrolní mechanismy. Pokud jsou ochranné mechanismy oslabené, a nebo chybí, dochází k rozvoji rakoviny (např. neschopnost tvořit imunitní efekty, neschopnost rozpoznat antigeny či na ně reagovat) (Baba a Cătoi 2007).

Protinádorová obrana zahrnuje eliminaci buněk infikovaných exogenními onkogenními viry nebo buněk transformovaných endogenními onkogenními viry nebo eliminaci buněk vlastního těla, které se transformovaly na buňky nádorové (Baba a Cătoi 2007). Typickými vlastnostmi maligních buněk jsou: zrychlený buněčný cyklus, genomické změny, invazivní růst, zvýšená pohyblivost buněk, chemotaxe, změny buněčného povrchu, sekrece lytických faktorů atd. Morfologicky se rakovinné buňky vyznačují velkým jádrem, které má nepravidelný tvar a velikost, výraznějším jadérkem, intenzivně barevnou nebo naopak světlou cytoplazmou (Baba a Cătoi 2007).

2.2.3.1 Nádorové antigeny

Aby buňky imunitního systému byly schopny reagovat na nádory, musí mít nádorové buňky na svém povrchu antigeny, které jsou rozpoznávány jako cizí. Nádory velmi často vznikají vlivem nahromadění změn v genové expresi. Při vzniku nádorů může docházet k expresi nových antigenů (tzv. neoantigenů) nebo dochází ke změnám v existujících antigenech, které se běžně vyskytují na normálních buňkách (např. antigeny zahrnující membránové receptory, regulátory buněčného cyklu a apoptózy, nebo molekuly podílející se na přenosu signálu). Z chemického hlediska jsou nádorovými antigeny proteiny,

nejčastěji prezentovány MHC I a MHC II molekulami na povrchu buněk. Nádorové antigeny rozdělujeme do dvou kategorií: **antigeny specifické pro nádory (TSA)** a **antigeny asociované s nádory (TAA)** (Hořejší a Bartůňková 2009).

- **Antigeny specifické pro nádory (TSA)**

Antigeny specifické pro nádory představují fragmenty peptidů (malé proteiny), které se vyskytují pouze na nádorových buňkách. Jedná se často o **produkty mutovaných genů a supresorových genů**, které vznikly bodovými mutacemi. Vlivem mutací dochází ke změně proteinů na povrchu buněk (Philipps a kol. 1985). Jinými nádorově specifickými antigeny mohou být např. **abnormální formy glykoproteinů** nebo **komplexy MHC glykoproteinů s fragmenty proteinů onkogenních virů** (Hořejší a Bartůňková 2009). Antigeny specifické pro nádory jsou prezentovány na povrchu buněk spolu s molekulami MHC I. třídy. V této formě jsou rozpoznány T lymfocyty a eliminovány (Philipps a kol. 1985).

- **Antigeny asociované s nádory (TAA)**

Antigeny asociované s nádory nejsou kvalitativně odlišné od struktury antigenů normálních buněk, ale jsou přítomné v podstatně větším množství. Z toho vyplývá, že nejsou specifické pouze pro nádorové buňky. Odlišnost od normálních zdravých buněk spočívá ve změně exprese (čas, místo a intenzita). Zvýšené hladiny těchto antigenů mohou být použity jako nádorové markery pro diagnostiku rakoviny (Old a Chen 1998), jako např. **karcinoembryonální antigen (CEA)**, **α -fetoprotein**, **prostatický specifický antigen (PSA)**, **některé melanomové antigeny** a nesmíme zapomenout také na **antigen HER2/neu**. Zvýšené hladiny CEA se vyskytují především u osob s nádory gastrointestinálního traktu a také u některých pacientů s karcinomem prsu, plic, vaječníků, slinivky a rakoviny žaludku. Jiným významným onkofetálním antigenem je α -fetoprotein produkovaný hematomy. PSA se používá pro diagnostiku karcinomu prostaty a antigen HER2/neu pro screening a monitorování karcinomu mléčné žlázy (Hořejší a Bartůňková 2009).

2.2.3.2 Vzájemný vztah rakoviny a imunitního systému

Imunitní systém je schopen chránit organismus před rozvojem rakoviny. Boj s tímto typem onemocnění je zajištěn několika obrannými liniemi. Transformací normálních buněk na buňky nádorové dochází ke změně povrchových antigenů, které jsou nádorovými

buňkami částečně uvolňovány do krevního oběhu. Prvními obrannými liniemi, které reagují na uvolněné nádorové antigeny, jsou T lymfocyty, NK buňky a makrofágy. Tyto „hlídkující“ buňky imunitního systému zajišťují neustálou kontrolu, vychytávání a eliminaci buněk, které prošly maligní transformací. Nádor se vyvine až poté, co je imunitní dozor oslaben nebo poškozen (Zitvogel a kol. 2008).

Nádorové antigeny uvolněné v krevním oběhu jsou spolu s MHC II molekulami prezentovány na povrchu antigen prezentujících buněk (APC). Th lymfocyty (CD4+) rozpoznají takto prezentované antigeny, dojde k jejich aktivaci a k následné produkci řady chemických látek, především cytokinů IL-2 a gama interferonu (IFN- γ). IL-2 je důležitý cytokin, který zajišťuje proliferaci a následnou aktivaci cytotoxických T lymfocytů (CD8+) (Dzivenu a kol. 2003). Cytotoxické T lymfocyty rozeznávají některé nádorové buňky a ničí je mechanismy, které jsou postaveny na základě těsného kontaktu mezi Tc lymfocitem a příslušnou buňkou. Prekurzory Tc lymfocytů rozpoznávají komplexy molekul MHC I s nádorovými antigeny na povrchu APC. Takto aktivované prekurzory Tc lymfocytů se následně začnou dělit a diferencovat ve zralé efektorové cytotoxické buňky (CTL). Aktivované CTL používají několik různých mechanismů (cytotoxická granula, Fas-ligandy, LT nebo TNF- β), kterými nádorové buňky usmrtí (Hořejší a Bartůňková 2009).

NK buňky („přirození zabíječi“) jsou buňky, které se významně uplatňují v protinádorové imunitě. Některé nádorové buňky se snaží bránit napadení Tc lymfocytů tím, že na svém povrchu potlačují expresi MHC I. Pokud CTL nejsou schopny rozeznat takto maskované buňky, nastupují do boje NK buňky. Ty totiž rozeznávají buňky, které mají na svém povrchu abnormálně málo molekul MHC I. Hlavními cytotoxickými mechanismy NK buněk jsou cytotoxická granula, která působí na napadené buňky a spouští kaskádu reakcí vedoucí k apoptické smrti zasažených buněk (tj. programovanou buněčnou smrt) (Hořejší a Bartůňková 2009).

Makrofágy hrají významnou roli v imunitě a imunitních odpovědích. Jejich hlavní funkcí je obrana organismu daná schopností fagocytovat parazity, mikroby, ale i buňky abnormální jako jsou právě buňky nádorové. Dále se podílejí na aktivaci T lymfocytů, protože fungují jako antigen prezentující buňky. Makrofágy produkují řadu cytokinů, z nichž je v protinádorové imunitě nejvýznamnější tumor necrosis faktor beta (TNF- β), který se váže na receptory na povrchu buněk a tím může indukovat jejich apoptózu (Elhelu 1983).

Ve vzájemném vztahu rakoviny a imunitního systému je třeba také zmínit roli cytokinů. Cytokiny jsou proteiny sekretované leukocyty a jinými buňkami, které zajišťují

komunikaci mezi buňkami imunitního systému spolu s ostatními tkáněmi organismu pomocí buněčných receptorů. Jedná se o tkáňové hormony, které fungují jako základní regulátory imunitního systému (Hořejší a Bartůňková 2009). Cytokiny se podílejí na destrukci nádorů dvěma základními mechanismy: buď **přímo antinádorovými účinky** nebo **nepřímo zvýšením protinádorové imunitní odpovědi** (Dzivenu a kol. 2003).

- **Přímý účinek:** cytokiny jako tumor necrosis faktor alfa (TNF- α), interferon alfa (INF- α), interferon beta (INF- β), interleukin-4 (IL-4) a interleukin-6 (IL-6) interagují s nádorovými buňkami přímo a způsobují dříve či později jejich apoptózu nebo alespoň zastavují růst nádorů. Jednotlivé cytokiny dobře působí na nádorové buňky, ale bylo prokázáno, že směs cytokinů působící synergicky značí větší společný účinek (Dzivenu a kol. 2003).

- **Nepřímý účinek:** mezi cytokiny, které bojují s nádory prostřednictvím nepřímých účinků, patří například IL-2, faktor stimulující růst granulocyto-makrofágové kolonie (GM-CSF) nebo interferon gama (INF- γ). IL-2 podporuje proliferaci a následnou aktivaci cytotoxických T lymfocytů a růst NK buněk. GM-CSF může působit na antigen prezentující buňky a zvýšit tak produkci významných imunitních molekul jako jsou např. MHC molekuly nebo imunitních ko-stimulátorů jako je B7, který má významnou roli v usnadnění aktivace lymfocytů (Dzivenu a kol. 2003). Dalším významným cytokinem je INF- γ , produkováný Th1 lymfocyty a NK buňkami. Jeho hlavní funkcí je aktivace makrofágů a stimulace exprese MHC glykoproteinů (Hořejší a Bartůňková 2009).

2.2.3.3 Mechanismy odolnosti a úniku nádorových buněk před imunitním systémem

Maligní buňky vznikají komplexními mechanismy z normálních zdravých buněk organismu a sdílí s nimi většinu povrchových antigenů. Jestliže jsou antigeny nádorových buněk imunitním systémem rozpoznány, mohou se boje s nimi účastnit všechny imunitní mechanismy nespecifické (NK buňky, aktivované mikrofégy, neutrofilní granulocyty) i specifické (Th1 a Tc lymfocyty, protilátky aktivující komplement nebo zprostředkující reakci ADCC). Ale ani antigenní abnormalita nádorových buněk ještě neznamena, že imunitní systém nádorové buňky rozpozná a začne je likvidovat. Maligní buňky používají řadu mechanismů, díky kterým se jim daří uniknout imunitnímu dohledu (Hořejší a Bartůňková 2009).

Obecně platí, že nádorové buňky jsou podobné buňkám normálním a imunitní systém je víceméně toleruje jako vlastní zdravé tkáň (Hořejší a Bartůňková 2009). Kromě toho nádory rostoucí v imunitně privilegovaných místech, jako je mozek nebo oko, nejsou

hlídány imunitním systémem. Navíc bylo prokázáno, že stroma nádorových buněk hraje také klíčovou roli v úniku před imunitním dohledem. Stroma totiž může sloužit jako fyzická bariéra mezi nádorem a imunitními buňkami (Igney a Krammer 2002).

Některé maligní buňky exprimují na svém povrchu pouze malé množství antigenů. Nízká hustota exprese antigenů vede k tomu, že imunitní mechanismy tyto antigeny ignorují (APC nejsou dostatečně aktivovány a neprezentují dané antigeny T lymfocytům). Další strategií úniku nádorových buněk před imunitním dohledem je potlačení exprese molekul MHC I na svém povrchu (Igney a Krammer 2002).

Imunosupresivní faktory produkované některými nádory mohou inhibovat funkce nebo životnost některých buněk imunitního systému. Nejvýznamnější z těchto faktorů je transformující růstový faktor beta (TGF- β). TGF- β je cytokin, který ovlivňuje proliferaci, aktivaci a diferenciaci buněk vrozené a získané imunity a tím potlačuje protinádorovou imunitní odpověď. Kromě TGF- β je významný i vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF). VEGF je produkovaný mnoha nádorovými buňkami a vedle jeho angiogenních vlastností zajišťuje diferenciaci progenitorů dendritických buněk ve zralé efektorové buňky. Dalšími imunosupresivními faktory exprimovanými maligními buňkami jsou prostanglandiny, interleukin-10 (IL-10) a faktor stimulující růst kolonie mikrofágů (M-CSF) (Igney a Krammer 2002).

Jinou velice významnou zbraní nádorových buněk je exprese Fas ligandu (FasL) na jejich povrchu. FasL je transmembránový protein přítomný běžně na povrchu Tc lymfocytů. Fas ligand interaguje s Fas receptorem dané cílové buňky a touto interakcí může být indukována apoptóza. Aby byla zajištěna regulace Tc lymfocytů, mají Tc lymfocyty na svém povrchu nejen Fas ligandy, ale i Fas receptory. Některé nádorové buňky exprimují na svém povrchu velké množství FasL a zároveň výrazně potlačují expresi Fas receptoru. Když se nádorový FasL naváže na Fas receptor Tc lymfocytu, dochází k navození programované buněčné smrti daného Tc lymfocytu (Igney a Krammer 2002).

Zdá se, že rozvoji rakoviny napomáhá působení regulačních T lymfocytů. Tyto lymfocyty jsou nezbytnou součástí imunitního systému, jelikož chrání organismus před autoimunitními mechanismy. Stejně jako chrání normální tkáň, tak chrání i nádory. Dalšími mechanismy maskování maligních buněk před mechanismy nespecifické i specifické imunity je sialylace povrchu nádorových buněk. To může vést k zamaskování některých epitopů nádorových antigenů. Navíc nádorové buňky nemají na svém povrchu kostimulační molekuly CD80 a CD86 a tak nefungují jako APC. To znamená, že prekurzory

Tc a Th lymfocytů nádorové antigeny nerozpoznávají a jsou proto tlumeny a nikoli aktivovány (Hořejší a Bartůňková 2009).

2.3 Imunoterapie nádorových onemocnění

Imunoterapie bývá často považována za novou léčebnou metodu v boji s rakovinou. Ale vztah mezi rakovinou a imunitním systémem byl poprvé objeven před více jak sto lety, ještě dlouho před tím, než bylo vysvětleno složité fungování imunitního systému. Na začátku roku 1890 byl americký lékař William B. Coley naprosto fascinován případem jednoho pacienta s maligním nádorem, kterému jako zázrakem nádor zmizel po akutní infekci streptokokem. William B. Coley se začal domnívat, že za regresí maligního nádoru stojí právě bakteriální infekce. Rozhodl se svoji domněnku potvrdit – pacientovi s neoperovatelným nádorem injekčně podal bakteriální suspenzi s živými streptokoky a pozoroval, jestli i u něj dojde k regresi nádoru. A opravdu se tak stalo. Doktor Coley se léta věnoval výzkumu a nakonec objevil směs mrtvých bakterií, po jejichž podání se pacienti s nádorem vyléčili. Tato směs bakterií (*Streptococcus pyogenes* a *Serratia marcescens*) je dnes známá jako Coleyův bakteriální toxin. Coleyův toxin funguje na principu stimulace buněk imunitního systému k zabíjení buněk nádorových přímými i nepřímými imunitními mechanismy. William B. Coley je právě díky tomuto objevu považován za „otce nádorové imunoterapie“ (Dzivenu a kol. 2003).

Imunoterapie je léčebná metoda, která používá k boji s rakovinou buňky imunitního systému. Jinými slovy, je založena na indukci protinádorové imunity. Imunoterapie, mimo jiné, je také schopna využívat imunitní mechanismy k cílenému směřování léčiv do místa nádoru (Hořejší a Bartůňková 2009). Hlavní výhodou této léčebné metody je nepoškození zdravých buněk těla. Nádorová imunoterapie je rozdělena na dva léčebné postupy: **imunoterapie nádorových onemocnění založená na antigenně specifické imunitě** a **imunoterapie nádorových onemocnění založená na nespecifické imunitě** (Dzivenu a kol. 2003).

2.4 Imunoterapie nádorových onemocnění založená na antigenně specifické imunitě

Imunoterapie nádorových onemocnění založená na antigenně specifické imunitě může být prováděna dvojím způsobem: adoptivním transferem nebo vakcinací (očkováním). Při adoptivním transferu jsou pacientovi injekčně podány buňky vlastního imunitního

systému. Na druhou stranu vakcinace je proces, při kterém je pacientovi podán antigen s cílem navodit antigenně specifickou imunitní odpověď (Dzivenu a kol. 2003). Imunoterapie založená na specifické imunitě využívá mechanismů specifické imunity: **specifické protilátky, APC, T lymfocyty a B lymfocyty.**

Imunoterapie pomocí protilátek je založena na využití hlavních funkcí protilátek, tj. protilátky slouží buď jako nosiče léčiv nebo toxinů. Nebo se využívají jejich fyziologické funkce jako je opsonizace, aktivace komplementu či indukce ADCC (Hořejší a Bartůňková 2009). Nejvíce se používají **monoklonální protilátky**, tj. protilátky, které vznikly z klonální populace jedné plazmatické buňky. Monoklonální protilátky jsou navrženy tak, aby rozpoznaly a napadaly specifické proteiny na povrchu buněk. Každá protilátka rozpoznává jeden konkrétní protein. Pracují různými způsoby podle toho, na který protein jsou zacílené (Weiner a kol. 2010). Princip fungování monoklonálních protilátek spočívá v zanesení toxinu do místa nádoru, kde toxin způsobí nekrózu. Toxin je zanesen do místa na základě vazby nádorového antigenu a příslušné protilátky. Velice často se používají monoklonální protilátky, které jsou zaměřené proti nádorovým antigenům (TAA). Vazbou na nádorový antigen, dojde buď k apoptóze nádorových buněk, nebo se opsonizací aktivují efektorové mechanismy imunity (fagocytóza, ADCC) (Hořejší a Bartůňková 2009).

Adoptivní transfer T lymfocytů je další možností imunoterapie. Pacientovi s maligním nádorem se odebere krev, ze které se izolují antigenně specifické T lymfocyty. Tyto lymfocyty se několikanásobně namnoží a následně znovu podají pacientovi, aby zničily nádorové buňky. Nevýhoda tohoto léčebného postupu spočívá v tom, že pacient s maligním nádorem neprodukuje dlouhodobě dostatečné množství důležitých imunitních molekul (např. cytokiny jako je IL- 2), které jsou důležité pro stimulaci funkcí T lymfocytů (Dzivenu a kol. 2003).

Dalším způsobem je **imunoterapie pomocí dendritických buněk (DC)**. Pacientovi se odeberou periferní monocyty, ze kterých se působením vhodných cytokinů (IL-4, GM-CSF) připraví nezralé dendritické buňky (Hořejší a Bartůňková 2009). Zároveň se pacientovi odebere nádorová tkáň, ze které se izolují nádorové antigeny. Nádorové antigeny jsou kultivovány s nezralými DC a následně je celá směs injikována do těla pacienta. Antigeny jsou rozpoznány DC, které je spolu s MHC II molekulami prezentují T lymfocytům (Melief 2008). Tím jsou T lymfocyty stimulovány k protinádorové odpovědi (Hořejší a Bartůňková 2009).

Jiným mechanismem může být také **imunoterapie pomocí produktů imunitního systému** (převážně cytokinů), **imunoterapie založená na zlepšení antigen-prezentující funkce nádorových buněk**. Dále mohou být použity **nádorové vakcíny** (Hořejší a Bartůňková 2009) a nebo **vakcíny obsahující geny konkrétních virů** (Dzivenu a kol. 2003).

2.5 Imunoterapie nádorových onemocnění založená na nespecifické imunitě

Nespecifickou imunoterapií může být například **nespecifická stimulace zánětu**, kdy je do místa nádoru injekčně vpravena suspenze mykobakteriální vakcíny, která nepřímo vyvolá mimo jiné i útok na nádorové buňky (Hořejší a Bartůňková 2009).

Jinou možností je použití **cytokinů**, především TNF- α , INF- α , INF- β a interleukinů IL-4 a IL-6, které vyvolávají apoptózu nádorových buněk anebo alespoň zastavují růst nádorů (Dzivenu a kol. 2003).

Další možností je **stimulace LAK** (lymphokine activated killers) **buněk**. LAK buňky jsou stimulovány ze směsi T lymfocytů a NK buněk *in vitro* například interleukinem 2 (IL-2). Takto stimulované buňky jsou schopny zčásti potlačit růst některých druhů nádorů (Hořejší a Bartůňková 2009).

Imunoterapie založená na nespecifické imunitě je v posledních letech postavena hlavně na rozpoznání **pathogen associated molecular patterns (PAMPs)** a **damage associated molecular patterns (DAMPs)** pomocí pathogen (pattern) recognition receptors (PRRs) (Thomas a Badini 2011).

2.5.1 Pathogen associated molecular patterns (PAMPs)

Každý mnohobuněčný organismus musí být schopen rozeznat, zda jsou jeho buňky živé nebo mrtvé. A musí být schopen rozeznat přítomnost patogenních mikroorganismů, aby byl schopen udržet integritu organismu a jeho správné fungování (Bianchi 2007). Schopnost rozpoznat přítomnost mikroorganismů je jedna z hlavních vlastností buněk vrozené imunity. Patogenní mikroorganismy jsou rozpoznány na základě pathogen associated molecular patterns (PAMPs). PAMPs jsou malé molekuly nebo častěji pouze část molekul vyskytující se na povrchu bakterií, hub, kvasinek, virů a jiných infekčních mikroorganismů. Na povrchu buněk hostitelů nejsou přítomny. PAMPs jsou rozpoznávány celou řadou receptorů nazývaných pathogen recognition receptors (PRRs). Každému PAMP

odpovídá jeden PRR přítomný na jednom či více druhu buněk vrozené imunity. K typickým PAMPs patří například lipopolysacharidy, peptidoglykan, flagelin, manan, formil-methionin, dvouřetězcová DNA a jiné (Thomas a Badini 2011).

PAMPs ale nejsou jediné molekuly, které mohou být použity během imunoterapie založené na nespecifické imunitě. Jinými molekulami jsou DAMPs, tzv. damage associated molecular patterns. Jedná se o endogenní molekuly, většinou jsou to proteiny uvolněné z jádra nebo cytosolu buňky (Ludgate 2012). DAMPs jsou rychle uvolňovány z buněk, které nezemřely klasickou programovanou smrtí (např. z nekrotizujících nádorových buněk, z poškozených normálních epiteliálních buněk), naopak z buněk zaniklých apoptózou uvolňované nejsou. Tyto DAMPs jsou rozpoznány také četnou řadou PRRs. Do skupiny DAMPs patří například high mobility group box 1 (HMGB1), S100 proteiny, kyselina močová, heat shock proteiny a jiné (Bianchi 2007).

2.5.2 Pathogen recognition receptors (PRRs)

Buňky vrozené imunity exprimují celou plejádu PRRs. Tyto receptory můžeme dělit podle toho, zda jsou pevně vázané na buňce nebo volné, popřípadě v jaké části buňky jsou přítomny. Několik tříd PRRs, včetně Toll-like receptorů a cytoplasmatických receptorů, rozpoznávají patogenní molekuly (PAMPs, DAMPs) a přímo aktivují buňky imunitního systému. Přesněji řečeno, dojde k aktivaci intracelulárních signálních drah, které indukují expresi různých překrývajících se genů podílejících se na zánětlivých a imunitních odpovědích (Akira a kol. 2006).

2.5.2.1 PRRs cytoplasmatické

• NOD like receptor (NLR)

NLR jsou cytosolické receptory, které slouží jako druhá vlna obrany při napadení patogeny. Zejména jsou schopné rozpoznávat bakteriální komponenty. Nejvýznamnějšími zástupci třídy NLR jsou NOD1 a NOD2 receptory (Akira a kol. 2006), které rozpoznávají γ -D-glutamyl-meso-diaminopimelovou kyselinu (iE-DAP) a muramyl dipeptid (MDP), jež jsou součástí bakteriálního peptidoglykanu (Giardini a kol. 2003).

• RIG-1-like receptor

RIG-1-like receptory patří stejně jako NOD like receptory k cytosolickým receptorům a slouží také jako druhá vlna v boji při průniku patogenních mikroorganismů. Rozpoznávají hlavně virovou RNA (Akira a kol. 2006).

2.5.2.2 PRRs sekretované

- **C-reaktivní protein**

CRP je protein tvořený v játrech a vylučován do těla při akutních infekcích. Je to jeden z nejdůležitějších reaktantů akutní fáze, který se stanovuje ze séra. Funguje jako opsonin po vazbě k fosforylcholinu na bakteriálním povrchu. Vazbou na C1q může aktivovat klasickou cestu komplementové kaskády (Janeway a Medzhitov 2002).

- **Lektin vázající manózu (MBL)**

MBL je sérový protein, který je taktéž tvořen v játrech (Janeway a Medzhitov 2002). Váže se na sacharidové struktury povrchů mikroorganismů, jako jsou bakterie, viry a plísňe. Hraje významnou roli v přirozené imunitě, jelikož je schopen aktivovat komplementový systém tzv. lektinovou cestou. Aktivace komplementového systému probíhá prostřednictvím sérové proteázy MASP-2 (Turner a Hamvas 2000). MASP-2 se naváže na C4, kterou následně štěpí na dva fragmenty C4a a C4b. Fragment C4b vazbou na bakteriální povrch aktivuje C3-konvertázu, která zahájí kaskádu dalších reakcí vedoucí k opsonizaci a k následné fagocytóze patogenních agens (Ikeda a kol. 1987).

2.5.2.3 PRRs membránové

- **Toll-like receptory (TLRs)**

TLRs jsou nejstudovanějšími PRRs v oblasti imunoterapie. Jsou exprimovány na buňkách imunitního i neimunitního systému, včetně makrofágů, dendritických buněk, neutrofilů, B lymfocytů, T lymfocytů, fibroblastů, endoteliálních buněk a epiteliálních buněk. TLR zahajují imunitní odpověď poté, co rozeznají PAMPs na mikrobiálních površích, a nebo poté, co rozpoznají DAMPs, které byly uvolněné z poškozených buněk (Iwasaki a Medzhitov 2004). Toll-like receptory nejsou exprimovány konstantně, ale v závislosti na přítomnosti infekčních patogenů, nebo různých druhů cytokinů nebo na vlivu vnějšího prostředí. TLR jsou exprimovány jak extracelulárně tak i intracelulárně (Akira a kol. 2006).

Rozlišujeme deset druhů lidských TLRs a dvanáct druhů myších TLRs. Lidské TLRs 1, 2, 4, 5, 6 10 jsou exprimovány na povrchu buněk a rozpoznávají primárně mikrobiální membrány. TLRs 3, 7, 8, 9 jsou součástí membrány endosomů a rozpoznávají nukleové kyseliny (Iwasaki a Medzhitov 2004).

TLRs obsahují dvě rozdílné domény, doménu bohatou na leucin (LRL doména) přítomnou na N-terminálním konci a cytoplasmatickou doménu Toll/IL-1 R (TIR) (Iwasaki a Medzhitov 2004). Toll-like receptory aktivují stejné signalizační molekuly, které jsou

používány pro signalizaci IL-1 R (Akira a Takeda 2004). Stimulací buněk prostřednictvím ligandů TLRs jsou nalákány adaptory proteinů obsahující TIR domény, jako je myeloidní diferenciací faktor 88 (MyD 88), do cytoplasmatické části TLR na základě interakce s jejich TIR doménami. Výsledkem je spuštění signálních kaskád a produkce řady cytokinů a chemokinů (Akira a kol. 2006).

Každý druh Toll-like receptoru rozpoznává a váže specifické PAMPs a DAMPs. Např. TLR 2 rozpoznává peptidoglykany a lipoteichovou kyselinu (LTA) gram pozitivních bakterií, zymosan (obsažen v bakteriích *Saccharomyces cerevisiae*), betaglukany hub, TLR 3 virovou dsRNA, TLR 4 lipopolysacharidy (LPS) gramnegativních bakterií, mannan (obsažen v kvasinkách *Candida albicans*), fibrinogen a heat shock proteiny 60 a 70 (HSP 60, 70), TLR 5 bakteriální flagelin (Akira a kol. 2006).

- **C-tyl lektin receptory (CLRs)**

C-tyl lektin receptory patří do rodiny rozpustných a transmembránových proteinů obsahujících jednu nebo více C-tyl lektin-like domén. Po rozpoznání pathogen associated molecular patterns (PAMPs) dochází k aktivaci intracelulárních signálních drah. Aktivaci signálních drah je přímo regulována genová exprese. CLRs jsou exprimovány převážně na monocytech, makrofázích a dendritických buňkách a rozpoznávají manózu, fukózu a jiné struktury. Nejvýznamnějšími zástupci CLRs jsou Dectin1 a Dectin2 (Figdor a kol 2002).

- **Formyl peptidové receptory (FPRs)**

FPRs patří mezi sedm nejběžnějších transmembránových s G-proteinem spřažených receptorů. Vyskytují se na leukocytech a vzhledem k jejich schopnosti interagovat s bakteriálními chemotaktickými formylmethioninovými peptidy hrají významnou roli v obraně hostitele proti mikrobiální infekci. Prvním objeveným chemotaktickým peptidem byl N-formyl peptid. N-formyl peptid může pocházet, na rozdíl od ostatních leukocytárních atraktantů, buď z endogenního zdroje (např. z mitochondriálních proteinů prasklých hostitelských buněk), nebo z exogenního zdroje (např. proteiny uvolňované napadajícími patogeny). Z toho vyplývá, že formyl peptidový receptor a jeho varianty FPR-like 1 a FPR-like 2 se podílí na obraně hostitele proti bakteriální infekci (Le a kol. 2001).

- **Scavengerové receptory**

Scavengerové receptory jsou membránové receptory vyskytující se především na makrofázích. Primární úlohou těchto receptorů je vychytávání nízkodenzitních lipoproteinů (LDL). Z imunologického hlediska jsou však schopny vázat i jiné látky, např. fosfatidylserin či endotoxiny. Navíc rozpoznávají apoptické buňky a také endogenní

molekuly (např. stresové proteiny). Jsou rozděleny do dvou tříd SR-AI a SR-AII (Suzuki a kol. 1997).

2.5.3 PAMPs a jejich terapeutické využití

Z různých vědeckých studií bylo prokázáno, že pathogen associated molecular patterns (PAMPs) mají příznivý terapeutický vliv na nádorová onemocnění jak z hlediska preventivního, tak i z hlediska terapeutického (Hobohm a kol. 2008). Na tuto myšlenku přišel doktor William B. Coley před více jak stoletím. Jenže tehdy ještě nebyly poznatky z imunologie na takové úrovni, aby se o PAMPs dalo uvažovat (Dzivenu a kol. 2003).

Na podobném principu jako funguje Coleyův bakteriální toxin funguje také BCG vakcína (bacil Calmettův-Guérinův). BCG vakcína je vakcína připravená ze živých oslabených bakterií z kmene *Mycobacterium bovis* a nejvíce se dnes používá při léčbě karcinomu močového měchýře. BCG vakcína je aplikována prostřednictvím katetru, který je zaveden do močového měchýře. Zde dojde ke stimulaci imunitní odpovědi a ničení nádorových buněk močového měchýře (Peterson a Patel 1998).

Dnes se mnohem více používají vakcíny, které namísto celých bakterií nebo virů používají pouze malé bakteriální nebo virové fragmenty. Příkladem hojně používaných bakteriálních fragmentů jsou CpG oligonukleotidy (CpG ODN). CpG oligonukleotidy jsou krátké úseky jednořetězcové bakteriální DNA, jejichž PRRs jsou Toll-like receptory 9 (TLR 9). CpG ODN vykazují poměrně silnou imunostimulační aktivitu vedoucí k aktivaci Th1 lymfocytů. Kromě toho také aktivují buňky vrozené imunity (NK buňky a makrofágy), které mohou přímo zabíjet nádorové buňky (Carpentier a kol. 2006).

CpG oligonukleotidy nejsou jedinými složkami mikroorganismů, které potlačují nádorový růst. Z pokusů prováděných na myších byl zjištěn příznivý účinek kotvené manózy v synergii s LPS nebo kotveného laminarinu rovněž v synergii s LPS (Janotová a kol. 2014). Obě látky vykazovaly příznivé účinky na redukci nádorového růstu. Jinou možností je používání kotvených bakteriálních N-formyl methionylových peptidů (f-MLF), které aktivují Formyl peptidové receptory (FPRs), což vede v synergii s LPS k výraznému potlačení nádorového růstu (Caisová 2013).

Další snahou je nahradit pro člověka nebezpečný LPS jinými agonisty TLR, které by v kombinaci s fagocytárními ligandy byly použitelné v humánní medicíně. Problematikou poslední zmíněné metody se mimo jiné zabývá tato diplomová práce.

2.6 Nádorová terapie založená na kombinaci TLR agonistů a ligandů fagocytárních receptorů

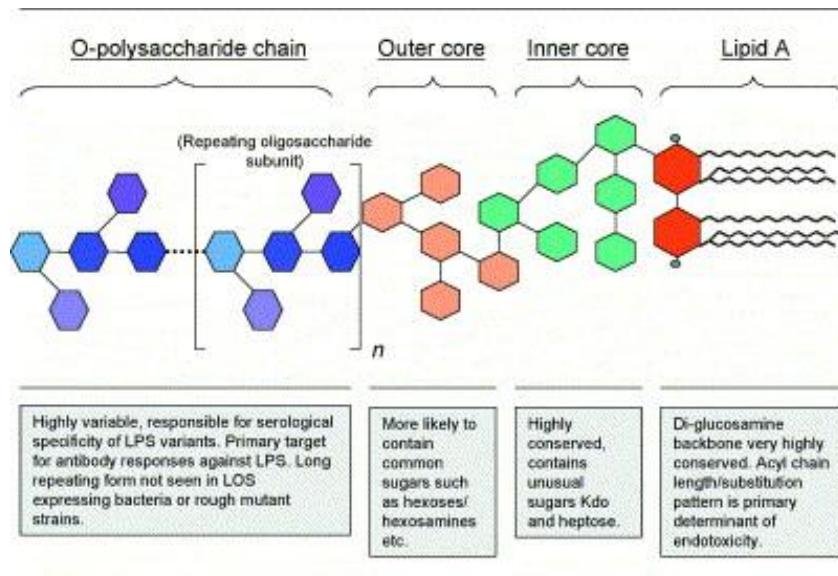
Jak jsme prokázali (Janotová a kol. 2014), je pro dosažení silného protinádorového účinku vhodné kombinovat rozpustné ligandy s převažujícím signalizačním účinkem (TLR4 agonista-LPS) s ukotvením ligandů fagocytárních receptorů (laminarin, manan, f-MLF) na nádorové buňky. Signalizace vede k rozvinutí zánětlivého procesu a mohutné primárně granulocytární infiltraci. Ligandy fagocytárních receptorů pak nasměrují fagocyty na nádorové buňky, což vede k jejich likvidaci. V diplomové práci jsme se snažili převážně o náhradu LPS méně nebezpečnými TLR agonisty, targeting a zesílení terapeutického účinku.

2.6.1 TLR agonisté

2.6.1.1 Lipopolysacharidy (LPS), agonisté TLR4

Lipopolysacharidy (LPS) jsou hlavními konstrukčními prvky buněčné stěny gramnegativních bakterií. Fungují jako tzv. endotoxiny, to znamená toxiny, které jsou uvolněné bakterií do okolí až po zániku buněčné stěny. Imunitní systém reaguje na setkání s LPS silnou imunitní reakcí, v některých případech až patologickou reakcí, jako je např. septický šok. LPS je rozpoznán Toll-like receptorem 4 (TLR4), který interaguje s třemi různými extracelulárními proteiny: LPS vázajícím proteinem (LBP), CD14 (receptorem monocytů a makrofágů), myeloidním diferenciacním proteinem 2 (MD-2). Lipopolysacharid se skládá z hydrofóbní části zvané lipid A, oligosacharidového jádra a O-antigenu. Lipidy a polysacharidy jsou spojeny pevnou kovalentní vazbou (Raetz a Whitfield 2002). Struktura LPS je zřejmá z Obr. 1.

- Lipid A (endotoxin) je díky své hydrofóbní povaze ukotvený na vnější straně bakteriální membrány. Zodpovídá za toxicitu gramnegativních bakterií a je klíčový pro rozběhnutí imunitní reakce.
- Oligosacharidové jádro spojuje lipid A a O-antigen.
- O-antigen se nachází nejzevněji - jedním koncem je připojen k oligosacharidovému jádru a druhým vyčnívá z povrchu bakterie. Jelikož je nositelem největší variability, určuje antigenní specifickou dané bakterie.

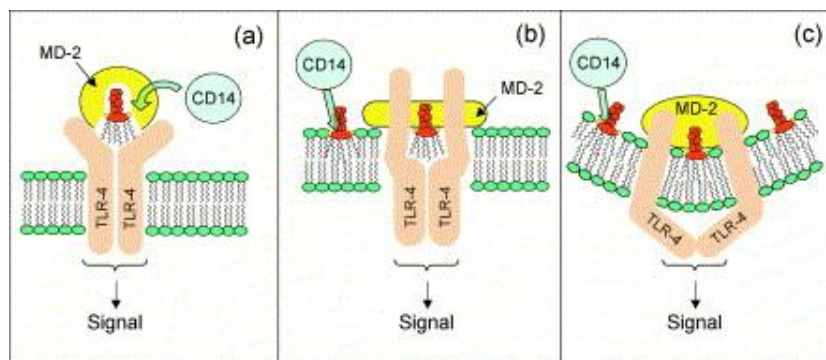


Obr. 1: Struktura lipopolysacharidu gramnegativní bakterie (Erridge a kol. 2002).

V roce 1990 bylo zjištěno, že TLR4 funguje jako receptor pro lipid A (Raetz a Whitfield 2002). Stimulace TLR4 lipopolysacharidem vede k aktivaci monocytů a makrofágů. Monocyty a makrofágy produkují řadu důležitých prozánětlivých cytokinů, které jsou nutné k aktivaci silné imunitní odpovědi (Lu a kol. 2008).

Aktivace dráhy TLR 4 prostřednictvím LPS: enterobakteriální lipopolysacharid je nejprve rozpoznán a navázán na LPB, který jej následně přenesne na membránově vázaný receptor CD14 na monocytech a makrofázích. Vznikne komplex LPS-CD14, který interaguje s TLR4 (Coats a kol. 2005). Tím je TLR4 aktivován a spouští kaskádu reakcí vedoucí k aktivaci signálních drah, včetně aktivace transkripčních faktorů, jako je např. nukleární faktor κ B (NF- κ B). Výsledkem je syntéza a uvolnění řady prozánětlivých mediátorů (IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α) a stimulaci NF- κ B genové exprese (Chow a kol. 1999). Aktivace TLR4 může nastat i bez LPB a CD14, ale vyžaduje přítomnost mnohem většího množství endotoxinů (Coats a kol. 2005).

Aktivace TLR4 probíhá tedy složitým mechanismem tvořeným receptory LPB a CD14. Navíc se aktivace účastní i koreceptor MD-2. Bylo zjištěno, že komplex TLR4/MD-2 je ve skutečnosti zodpovědný za rozpoznání endotoxinu LPS, jelikož reaguje na přítomnost lipidu A. Tvar lipidu A je rozpoznán transmembránovou doménou TLR4 a MD-2 rozpoznává acylové řetězce lipidu A (Erridge a kol. 2002). Interakce lipidu A s komplexem TLR4/MD-2 vede k aktivaci TLR4 signální kaskády (Oblak a Jerala 2011). Probíhající procesy jsou uvedeny na Obr. 2.



Obr. 2: Schéma rozpoznání LPS komplexem TLR4/MD-2. (a) Membránově vázaný receptor CD14 doručí molekuly LPS přímo na komplex TLR4/MD-2. (b) CD14 katalyzuje inzerci molekul LPS do plasmatické membrány, kde hydrofobní doména lipidu A reaguje s transmembránovou doménou TLR4 a acylové řetězce lipidu A reagují s MD-2. (c) Zakomponované molekuly LPS v plasmatické membráně způsobí změny ve stavbě membrány. Komplexem TLR4/MD-2 je citlivý vůči změnám ve stavbě plasmatické membrány a reaguje na ně (Erridge a kol. 2002).

Komplex TLR4/MD-2 je schopný aktivovat dva intracelulární adaptorové proteiny-MyD88/TIRA a TRIF/TRAM, které zajišťují aktivaci dvou paralelních signálních drah a aktivaci transkripce prozánětlivých cytokinů (Oblak a Jerala 2011).

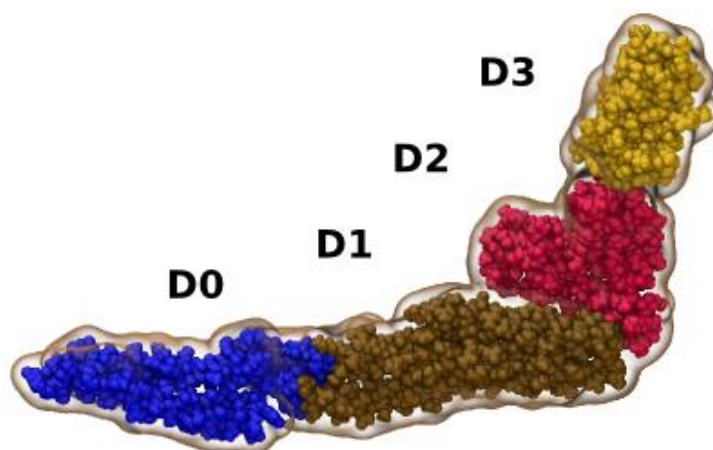
MyD88 (myeloidní diferenační faktor 88) zajišťuje tvorbu prozánětlivých mediátorů, jako je interleukin 1 (IL-1), interleukin 6 (IL-6) a tumor nekrotizující faktor α (TNF- α). Adaptorový protein TRIF zodpovídá za tvorbu interferonu β (INF- β) a oxidu dusičného (Oblak a Jerala 2011). MyD88 je navíc schopen aktivovat receptor IL-1 a cytosolickou doménu TLR4, kde katalyzuje aktivaci serin/treoninové kinázy z rodiny IL-1 receptor-asociovaných kináz (IRAK). Výsledkem je stimulace NF- κ B genové exprese (Erridge a kol. 2002).

Na základě těchto poznatků se zdá, že lipopolysacharidy mohou sloužit jako vhodné terapeutické prostředky v imunoterapii nádorových onemocnění, které účinným způsobem stimulují imunitní systém k příslušnému útoku. Z pokusů prováděných Čechovou (Čechová 2011) a Glaserovou (Glaserová 2012) sice vyplývá, že lipopolysacharidy vykazují určitý protimetastázový efekt a výraznou redukci nádorového růstu, ale tento efekt lze využít jen u myšího modelu. Myši jsou totiž vysoce odolné vůči účinku lipopolysacharidu, kdežto lidé vnímají účinek lipopolysacharidu 1000 – 10 000 krát citlivěji. Hlodavci obecně mají přítomny sérové proteiny, které jsou schopny zablokovat účinky většiny lipopolysacharidů. Kdežto lidé tyto sérové proteiny nemají. Pokud se rozhodneme aplikovat u lidských nádorů imunoterapii prostřednictvím kombinace LPS

a vhodných fagocytárních receptorů, je důležité používat nízké a bezpečné koncentrace LPS. Další možností je náhrada LPS jinými TLR agonisty jako je například flagelin nebo lipoteichoová kyselina (LTA) (Warren a kol. 2010). Proto jsme se v této práci snažili o náhradu LPS jinými, pro člověka neškodnými agonisty TLR, které jsme kombinovali s fagocytárními ligandy.

2.6.1.2 Flagelin - TLR5 agonista

Flagelin, hlavní složka bakteriálních bičků, je virulentní faktor, který je rozpoznáván vrozenou imunitou u širokého spektra organismů jako je hmyz, rostliny nebo savci. Flagelin patří mezi PAMPs a u savců je rozpoznáván pomocí Toll-like receptoru 5 (TLR5) (Hayashi a kol. 2001). Bakteriální bičík je několik mikrometrů dlouhá filamenta, kterou určité druhy bakterií používají pro pohyb. Skládá se z několika opakujících se monomerů flagelinu, které se spirálovitě otáčejí. Samotný flagelin se skládá ze čtyř domén D0, D1, D2, D3, které jsou řazeny v závislosti na vzdálenosti od centra filamenty (Tanner a kol. 2011). Jednotlivé domény jsou zobrazeny na Obr. 3.



Obr. 3: Čtyři domény flagelinu: D0 (modrá), D1 (hnědá), D2 (červená), D3 (zlatá) (Tanner a kol. 2011).

Bakteriální flagelin funguje jako silný antigen pro T lymfocyty, a proto může být považován za potenciální adjuvant. Důvodem je, že má schopnost narozdíl od ostatních TLR agonistů flagelin vyvolat jak Th1, tak i Th2 imunitní odpověď. Kdežto většina agonistů TLR vyvolává pouze Th1 imunitní odpověď (Hayashi a kol. 2001).

TLR5 rozpoznává flagelin gram pozitivních i gram negativních bakterií. Vazbou flagelinu na TLR5 je aktivována signální kaskáda vedoucí k fosforylaci receptoru pro IL-1 prostřednictvím kinázy 1. Následně je pomocí dalších kináz aktivován nukleární faktor κ B (NF- κ B), který stimuluje produkci prozánětlivých cytokinů, jako je TNF- α . Zdá se,

že specifika signální kaskády je různá u různých typů buněk (u epiteliálních buněk, endotelových buněk, makrofágů, dendritických buněk a T-lymfocytů). V případě dendritických buněk a T lymfocytů spojuje flagelin dva mechanismy imunity – vrozenou a získanou (Steiner 2007).

2.6.1.3 Resiquimod (R-848) – TLR7 a TLR8 agonista

R-848 je nízkomolekulární látka, která vykazuje silné protinádorové a protivirové účinky. Jedná se o selektivní ligand pro TLR7 u myši a pro TLR7 a TLR8 u lidí. Bylo zjištěno, že svým chováním a vlastnostmi napodobuje PAMPs. Vazbou resiquimodu na Toll- like receptory je stimulována sekrece protilátek, produkce cytokinů a je regulována produkce INF- γ (Hattermann a kol. 2007).

TLR7 a TLR 8 jsou fylogeneticky a strukturně příbuzné. TLR7 je exprimován převážně v plicích, placentě a slezině, zatímco TLR8 je exprimován v plicích, na leukocytech v periferní krvi a hlavně na makrofázích. Způsob aktivace těchto receptorů je stejný jako u jiných TLR. Tzn. jakmile TLR7 nebo TLR8 rozpozná R-848, dojde k aktivaci adaptéru molekuly MyD88 vedoucí k aktivaci transkripčního faktoru NF- κ B a jiných transkripčních faktorů s následnou produkcí prozánětlivých cytokinů (Cherfils-Vicini a kol. 2010).

Agonisté TLR7 a TLR8 se liší produkcí cytokinů a aktivací cílových buněk. Specifický agonista TLR7 aktivuje plasmacytoidní dendritické buňky a B-lymfocyty a indukuje produkci převážně INF- α . Specifický agonista TLR8 aktivuje myeloidní dendritické buňky a monocyty, které produkují prozánětlivé cytokiny a chemokiny, jako jsou TNF- α , IL-12 a MIP-1 α (Larangé a kol. 2009).

2.6.2 Fagocytární receptory a jejich agonisté

2.6.2.1 Manan, manozu vázající lektin (MBL), lektinová cest aktivace komplementu, manozový receptor

Manan

Manan je hlavní stavební prvek buněčné stěny kvasinek a gramnegativních bakterií. Jedná se o polysacharid, který se skládá z několika podjednotek D-manóz spojených glykosidickou vazbou a může obsahovat malé množství N-acetyl-D-glusaminu stejně jako ostatních cukrů (Cawley a Ballou 1972). Manan je považován za vysoce antigenní látku a proto je řazen mezi PAMPs. Imunitní systém rozpoznává manan pomocí PRRs, kterými

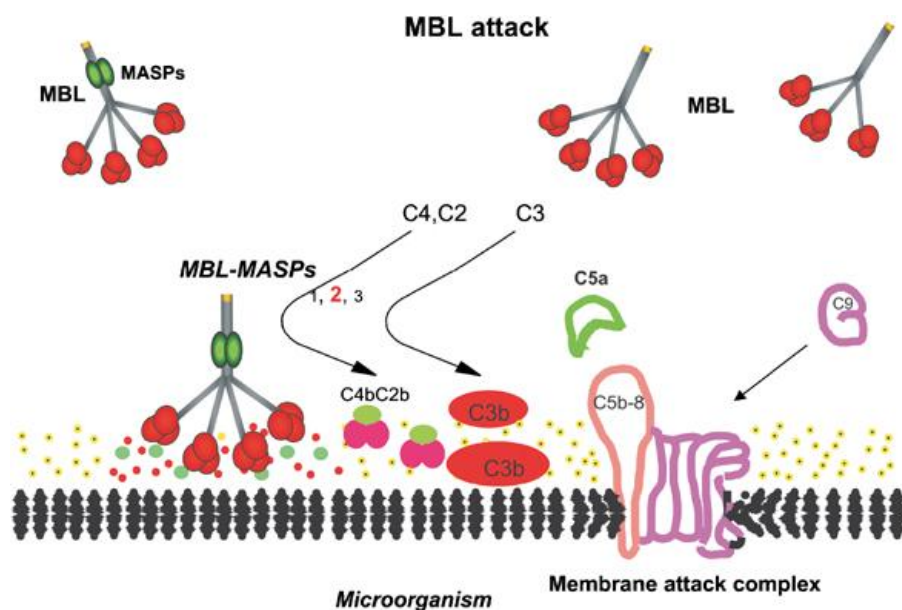
jsou manan vázající lektin (MBL) a nebo manózový receptor (MR) (Janeway a Medzhitov 2002).

Manózu vázající lektin (MBL)

Manózu vázající lektin (také nazývaný jako manózu vázající protein MBP) je sérový protein, který vazbou na sacharidy na povrchu celé řady patogenů (virů, bakterií, hub, prvoků) hraje důležitou úlohu v přirozené imunitní odpovědi. Úloha spočívá v aktivaci komplementu a nebo MBL slouží přímo jako opsonin (Koch a kol. 2001). MBL je řazen do kolektinové rodiny proteinů, které jsou tvořeny v játrech a jsou schopny opsonizovat patogeny. Opsonizace je značení povrchu patogena, které navodí jeho rozpoznání a zneškodnění fagocytujícími buňkami. Proteiny z kolektinové rodiny obsahují dvě domény – lektinovou a kolagenovou. Lektiny jsou proteiny, které vážou molekuly cukru, obvykle na povrchu patogena. Kolagenová doména interaguje s efektorovou částí vrozeného imunitního systému. Gen MBL2 na lidském chromosomu 10 produkuje MBL, oligomer tvořený 248 aminokyselinovými podjednotkami proteinů složených ze tří identických polypeptidových řetězců. Každý řetězec obsahuje na cystein bohatou N-terminální oblast, kolagenní oblast a oblast pro rozpoznání karbohydrátů (Matsushita a kol. 2000).

Lektinová cesta aktivace komplementu

Nedávno objevená lektinová cesta aktivuje komplement prostřednictvím MBL. MBL váže karbohydráty, které se vyskytují na povrchu některých patogenů. Aby byla aktivována lektinová cesta komplementu, musí MBL nejprve vytvořit komplex se serinovými proteázami zvanými MASPs 1 a 2 (MBL asociované serinové proteázy). Jakmile se MBL naváže na svůj cíl (např. na manózu na povrchu bakterie), MASP protein začne fungovat jako konvertáza, která štěpí C3 sérový protein na C3a a C3b fragmenty. C3b se naváže na povrch patogena a rozjede se komplementová kaskáda. Výsledkem je lýza daného patogena. C3b se může také chovat jako opsonin, jestliže se naváže na komplementové receptory fagocytů (Sompayrac 1999). Schéma aktivace komplementu lektinovou cestou je uveden na Obr. 4.



Obr. 4: Aktivace lektinové cesty komplementu pomocí komplexu MBL-MASPs (Garred a kol. 2006).

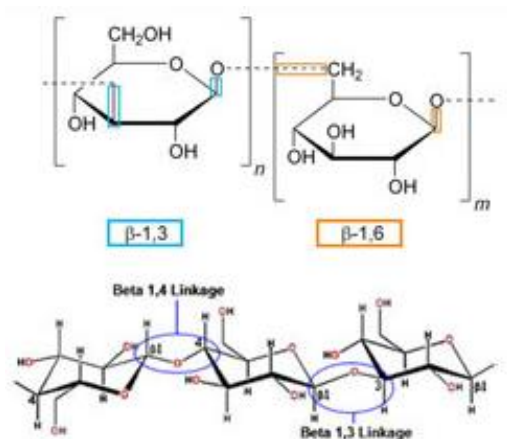
Manóзовý receptor (MR)

Manóзовý receptor je receptor vázající sacharidy, převážně manózu, který je exprimován na vybraných populacích makrofágů, dendritických buňkách a nevasculárním endotelu. Patří do rodiny endocytických receptorů, které se vyznačují podobnou strukturou skládající se z N-terminální CR domény, fibronektinu typu II (FNII) a několika CTLDs (C-type lectine-like domains). CR doména váže cukry, převážně galaktózu. FNII je schopen vázat kolagen a prostřednictvím CTLDs manóзовý receptor váže například manózu nebo fukózu. Kromě toho, že slouží jako receptor pro celou řadu sacharidů, plní několik dalších funkcí jako je odstraňování endogenních molekul a podpora prezentace antigenu (Martinez-Pomarez 2012).

2.6.2.2 Beta-glukan, aktivace komplementového receptoru CR3

Beta-glukan

Beta-glukany jsou heterogenní skupinou přírodních polysacharidů skládajících se z monomerů D-glukózy spojených β -glykosidickou vazbou. Jsou důležitými složkami buněčné stěny některých druhů bakterií a plísní, nebo slouží jako zásobárna energie u bakterií, hub (včetně kvasinek), řas a rostlin. Nejsou přítomné u obratlovců a bezobratlých. Ve většině případů je primární řetězec tvořen z β (1 \rightarrow 3) glykosidicky vázaných D-glukopyranózových jednotek, ke kterým jsou připojeny postranní řetězce vazbou (1 \rightarrow 4) nebo (1 \rightarrow 6) (Stier a kol. 2014). Struktura beta-glukanů je uvedena na Obr. 5.



Obr. 5: Struktura beta-glukanu (Yoon 2013).

O léčivých účincích beta-glukanů u nádorových onemocnění se ví již dlouhá desetiletí. Byly prokázány jejich hojivé a imunostimulační účinky spojené s lepší funkcí makrofágů a NK buněk. Předpokládá se, že imunostimulační účinky jsou vyvolané specifickou interakcí beta-glukanů s několika receptory na povrchu buněk, jako je komplementový receptor 3 (CR3), dectin-1 a TLR2 (Větvička 2014). Avšak ne všechny beta-glukany vykazují imunostimulační účinky. Tyto účinky závisí převážně na primární chemické struktuře beta-glukanů (Stier a kol. 2014). Nedávné studie také ukázaly, že beta-glukany mimo jiné zvyšují i protinádorovou T buněčnou odpověď (Větvička 2014). Jelikož beta-glukany aktivují jak vrozenou, tak i získanou imunitu, můžeme je řadit mezi potenciální adjuvant. Fungují buď jako součást nescifické vakcíny, nebo v kombinaci s anti-nádorovými monoklonálními protilátkami (Hong a kol. 2003). V poslední době jsou beta-glukany hojně používány jako doplňující látky při chemoterapii nebo imunoterapii, jelikož jsou schopné modulovat vhodné nádorové prostředí. Tím je zesílen účinek chemoterapeutických a imunoterapeutických léčiv (Větvička 2014). Navíc beta-glukany zvyšují odolnost organismu proti chemickým karcinogenům, prodlužují dobu přežití při vysokých dávkách ozáření, stimulují produkci buněk kostní dřeně a zvyšují odolnost organismu proti bakteriálním, virovým, parazitárním a plísňovým infekcím. Z toho vyplývá, že beta-glukany patří mezi výrazné imunostimulátory (Yoon 2013).

Komplementový receptor 3 (CR3)

Komplementový receptor 3 je heterodimer skládající se z α (CD11b) a β (CD18) transmembránových glykoproteinů. CR3 je převážně exprimován na monocytech, makrofázích, granulocytech a NK buňkách (Avni a kol. 1998). Funguje jako významný

PRRs pro beta-glukany, zymosan, fibrinogen nebo bakteriální lipopolysacharidy (Stier a kol. 2014, Avni a kol. 1998). Receptor rozpoznává beta-glukany pouze v rozpustné podobě (Stier a kol. 2014) a k jeho aktivaci, dochází v případě, že se na receptor naváže složka komplementu iC3b (Avni a kol. 1998). Výsledkem aktivace CR3 je komplementovým systémem zprostředkovaná imunitní odpověď za podpory specifických protilátek (Stier a kol. 2014).

Toll-like receptor 2 (TLR2)

TLR2 je členem rodiny Toll-like receptorů, které hrají zásadní roli při rozpoznávání patogenů a aktivaci vrozené imunity (Lien a kol. 1999). Podílí na rozpoznávání širokého spektra mikrobiálních molekul u grampozitivních a gramnegativních bakterií, mykoplazem a kvasinek. TLR2 rozpoznává různé buněčné komponenty, mezi které patří převážně peptidoglykany, lipoteichová kyselina, lipoproteiny grampozitivních bakterií, beta-glukany a zymosan z buněčné stěny kvasinek. Na tyto PAMPs reaguje TLR2 produkcí celé řady cytokinů (např. IL-1, IL-6, IL-8, TNF) (Schwandner a kol. 1999).

Nedávný výzkum odhalil, že spolupráce TLR2 (nebo i jiných receptorů z rodiny TLR) a dectinu-1 zlepšuje rozpoznání mikrobiálních patogenů a zvyšuje se tím imunitní odpověď vyvolaná každým receptorem. Například synergie dectinu-1 a TLR u makrofágů a dendritických buněk vyvolává tvorbu cytokinů jako jsou interleukiny nebo interferony. Nebo exprese dectinu-1 zvyšuje TLR-zprostředkovanou aktivaci NF-κB (Gantner a kol. 2003).

2.6.2.3 N-formylmethioninové peptidy a jejich receptoru (FPR)

N-formylmethioninové peptidy

N-formylmethioninové peptidy jsou analogy silných chemotaktických peptidů, které jsou přítomné u různých druhů bakterií. Významnou součástí těchto peptidů je N-formylmethionyl-leucyl-fenylalanin (f-MLF) (Schiffmann a kol. 1975), který vyvolává širokou škálu biologických odpovědí. Patří mezi ně kontrakce hladkých svalů v dýchacích cestách, vaskulární kontrakce a relaxace, chemotaxe leukocytů a makrofágů, sekrece enzymů granulocyty (Giuliani a kol. 1991) a stimulace fagocytózy (Le a kol. 2002, Prossnitz a Ye 1997, Le a kol. 2001).

N-formylmethioninové peptidy produkované některými druhy bakterií působí jako výrazné chemoatraktanty. Změna C-terminální části těchto peptidů, především

methioninovými (Met) nebo fenylalaninovými (Phe) zbytky, může mít za následek charakteristické změny v chemotaktických účincích těchto peptidů nebo mohou být uvolňovány lysozomální enzymy neutrofilními granulocyty. Krátké peptidy s N-formylmethioninovými zbytky se jeví jako nejúčinnější chemoaktraktanty. Například *N-For-Met-Leu-Phe* je jeden z největších chemoaktraktantů pro neutrofilny (Kohidai a kol. 2003). Intenzita chemotaktického signálu se odvíjí od aminokyselinových zbytků v N-formylmethionin peptidovém řetězci. Nejsilnější chemotaktický účinek má fenylalanin, leucin nebo tryptofan (Schiffmann a kol. 1975).

Tato diplomová práce se mimo jiné zabývá snahou kotvit fagocytární motiv f-MLF na povrch nádorových buněk. Nádorové buňky se od normálních buněk liší velkým množstvím fosfatidylserinu (PS) na vnější straně cytoplasmatické membrány (Riedl a kol. 2011). Fagocytární motivy mohou být kotveny na fosfatidylserin vyskytující se na povrchu nádorových buněk. Tímto způsobem jsme se pokusili aktivovat imunitní systém k imunitní odpovědi. N-formylmethioninové peptidy jsme se snažili ukotvit na fosfatidylserin prostřednictvím peptidové sekvence. Tyto peptidové sekvence zkoumal ve své práci Xiong a kol. (2011), který se svým týmem zjistil, že největší afinitu k PS vykazuje sekvence FNFRLKAGAKIRFG.

N-formylmethioninové peptidy jsou rozpoznávány formylmethioninovými receptory (FPRs), které jsou přítomné na fagocytujících leukocytech. Důležitou roli hrají také G-proteiny ze skupiny FPRs, jejichž vazba s f-MLF ovlivňuje vnitrobuněčnou signalizaci a navíc jsou aktivovány některé funkce související s chemotaxí (Kohidai a kol. 2003).

Formylpeptidové receptory (FPRs)

Formylpeptidové receptory jsou hlavní chemotaktické receptory leukocytů, ale vyskytují se i na jiných tělních buňkách (např. dendritické buňky, krevní destičky, hepatocyty, neurony, mikrobiální buňky, sekreční buňky a astrocyty) (Becker a kol. 1998). Funkčně patří do rodiny transmembránových proteinů spázaných s G-proteiny. Vazbou agonistů, jako je N-formyl-Met-Leu-Phe (f-MLF), dochází k aktivaci imunitního systému a k odpovědi na bakteriální infekci (tvorba superoxidů, uvolnění obsahu granulí, regulace genové exprese prostřednictvím aktivace transkripčních faktorů NF- κ B) (Bokoch a Gilman 1984). Díky tomu, že jsou schopné vázat jak umělé, tak i bakteriální N-formylové peptidy a některé neformylové peptidy, jsou považovány za důležité PRRs (Schiffmann a kol. 1975).

Lidský organismus se od organismu myši liší počtem typů FPRs. Na lidských buňkách rozlišujeme 3 typy FPRs, kdežto u myši se vyskytuje devět typů FPRs (He a kol. 2013).

• Lidské FPRs

Lidské FPRs patří mezi sedm transmembránových receptorů spázaných s G-proteinem (rodina GPCRs). Všechny jsou hojně exprimovány na neutrofilech a monocytech a všechny vykazují výraznou afinitu k f-MLF (Formyl-Met-Leu-Phe). Lidská FPR rodina obsahuje tři typy formylmethioninových receptorů: FPR1, FPR2 (také nazývaný jako FPR2/ALX), FPR3 (Le a kol. 2002).

Receptory FPR1 a FPR2/ALX vykazují značnou podobnost (až 69%) v primární sekvenci. Navíc společně sdílí několik agonistů, zahrnujících syntetický hexapeptid WKYMvm (Trp-Lys-Tyr-Met-Val-D-Met-NH₂) a některé nepeptidové molekuly. N-formylové peptidy jsou nejvýraznějším chemoatraktantem pro FPR1, spouštějící fagocytózu, mobilizaci vápníku, degranulaci a uvolňování superoxidových anionů. FPR2/ALX váže jiné formylové peptidy uvolněné z bakterií nebo mitochondrií. Afinita k f-MLF je oproti FPR1 snížena. Za zmínku také stojí napsat, že FPR2/ALX může interagovat s agonisty různých struktur. Mezi ně patří například malé proteiny, peptidy a syntetické molekuly jako je sérový amyloid A. FPR3 reaguje slabě na formylové peptidy, s výjimkou fMMYALF (N-formyl-Met-Met-Tyr-Ala-Leu-Phe). Celkově FPR3 vykazuje jen slabou afinitu k endogenním ligandům, zahrnující např. F2L (terminální peptid odvozený z hem vázajícího proteinu) a jeho fyziologické funkce doposud nejsou zcela známy (He a kol. 2013).

• Myší FPRs

Genová rodina FPRs u myši je mnohem komplexnější a zahrnuje tyto naposledy objevené geny: Fpr1, Fpr2, Fpr-rs1, Fpr-rs3, Fpr-rs4, Fpr-rs5, Fpr-rs6, Fpr-rs7 a Fpr-rs8. První tři geny kódují receptory (mFpr1, mFpr2 a mFpr-rs1), které jsou přítomné na leukocytech. Fpr1, přítomný na neutrofilech, vykazuje náchylnost vůči bakteriím z rodu *Listeria*, z čehož vyplývá, že má důležitou funkci při obraně hostitele při napadení těmito bakteriemi. mFpr2 je méně citlivý na f-MLF, ale slouží jako receptor pro F2L (velmi silný a specifický agonista lidského FPR3). Z toho plyne, že lidské FPRs, hlavně FPR1 a FPR3, mají lépe definované a specializované ligand-vázací vlastnosti než myší FPRs. Navíc ne všichni členové genové rodiny FPRs u myši jsou schopni kódovat formylpeptidové receptory (He a kol. 2013).

Evoluční vztah a vzájemné korelace mezi lidskými formylpeptidovými receptory a jejich myšími protějšky nejsou zatím zcela pochopeny (He a kol. 2013).

2.7 Fosfatidylserin (PS)

Fosfatidylserin nebo-li 1,2-diacyl-*sn*-glycero-3-fosfo-L-serin je kyselý fosfolipid, který je hojně tvořen u širokého spektra organismů jako jsou živočichové, rostliny a mikroorganismy. U živočichů je obecně největší koncentrace fosfatidylserinu obsažena na vnitřní straně plasmatické membrány (tvoří až 20% z celkového množství fosfolipidů), endoplasmatickém retikulu a endosomech. Naopak nízká koncentrace PS byla nalezena v mitochondriích (Buckland a Wilton 2000).

PS má glycerolovou kostru esterifikovanou na *sn*-1 a *sn*-2 uhlíku dvěma mastnými kyselinami s řetězci různé délky a nasycení, a fosfátovou skupinou na *sn*-3 uhlíku. Na fosfátovou skupinu se váže serin. Tato vazba má za následek negativní náboj fosfatidylserinu (Kay a Grinstein 2011).

Kromě základních funkcí jako je složka buněčných membrán a prekurzor jiných fosfolipidů, je PS nezbytným kofaktorem, který váže a aktivuje velké množství proteinů, především takových, které vykazují signalizační aktivitu. Navíc PS je známý díky své důležité roli při srážení krve a při apoptóze (Buckland a Wilton 2000).

U zdravých buněk se PS vyskytuje na vnitřní straně plasmatické membrány v důsledku působení ATP-dependentní aminofosfolipidové flipázy. Ale jakmile buňka vstupuje do apoptózy, PS se objevuje na vnější straně plasmatické membrány a signalizuje tak fagocytujícím buňkám, že buňka umírá a má být fagocytována (Kay a Grinstein 2011). PS funguje tedy u apoptických buněk jako tzv. „eat me“ signál rozpoznávaný fagocytujícími buňkami (převážně makrofágy). V rámci apoptického programu se zároveň stahuje exprese „don't eat me“ signálů CD31 a CD47, které by jinak fagocytoze zabránily. U nádorových buněk je situace poněkud odlišná. Nádorové buňky mají na povrchu plasmatické membrány PS exprimovaný v mnohem větší míře, ale přesto nejsou likvidovány fagocytujícími buňkami. Důvodem je, že jsou chráněny „don't eat me“ signály CD31 a CD47. Jedním z možných postupů, jak zvýraznit fosfatidylserin fagocytům je blokáce CD47 prostřednictvím anti-CD47 protilátky (Tseng a kol. 2013). O to jsme se také snažili v této diplomové práci. Expresi PS můžeme zjišťovat prostřednictvím Annexinu V, který se dobře váže na PS během apoptózy (Lee a kol. 2013).

Annexin V je 35 kD protein vykazující vysokou afinitu k PS. Annexin V, konkrétně jeho fluorescenční konjugát, je hojně používán pro označení buněk vstupujících do apoptózy, tím že se váže na jejich PS. Detekce Annexinu V může být analyzována průtokovým cytometrem a nebo fluorescenčním mikroskopem (Cen a kol. 2008, Martin a kol. 1995).

2.7.1 CD47 a jeho blokace

CD47 (Cluster of Differentiation 47) je transmembránový protein, který je u lidí kódován genem CD47. Jedná se o 50 kDa membránový receptor, který se skládá z extracelulární N-terminální domény IgV, pěti transmembránových domén a krátkého intracelulárního C-terminálního konce. Díky alternativnímu sestřihu jsou rozlišeny čtyři izoformy CD47, které se liší pouze v délce C-terminálního konce. Význam alternativního sestřihu není doposud zcela znám, nicméně izoformy, které díky němu vznikají, jsou vysoce konzervované mezi myší a člověkem (Sick a kol. 2012).

CD47 se účastní řady buněčných procesů, včetně apoptózy, proliferace, adheze a migrace buněk. Kromě toho hraje klíčovou roli v imunitní odpovědi a angiogenezi. Je exprimován na všech lidských buňkách a nadměrně exprimován na mnoha různých nádorových buňkách (Sick a kol. 2012).

CD47 patří do rodiny imunoglobulinů a spolupracuje s membránovými integriny. Váže dva ligandy - trombospondin-1 (TSP-1) a signální regulační protein alfa (SIRP-alfa). Vazbou CD47 a několika membránových integrinů vznikne CD47/integrinový komplex, který ovlivňuje řadu buněčných funkcí jako je adheze a migrace buněk. Navázáním TSP-1 na receptor CD47 je vyvolána migrace, adheze a proliferace buněk nebo apoptóza. Interakce CD47 se SIRP-alfa má za následek inhibici fagocytózy a aktivaci T-lymfocytů (Sick a kol. 2012). Proto se trombospondin-1 a signální regulační protein alfa začaly používat jako anti-CD47 aptamery (Baumgartner a kol. 2008, Tseng a kol. 2013).

CD47 molekula vyskytující se na povrchu mnoha nádorových buněk se chová jako „don't eat me“ signál a tak chrání nádorové buňky před útokem makrofágů. Proto je potřeba tento signál zablokovat a tím umožnit atak fagocytům (Tseng a kol. 2013). Toho lze dosáhnout protilátkami (Tseng a kol. 2013), nebo další možností je blokace pomocí 4N1K dekaeptidu (Lutz 2013).

3 CÍLE PRÁCE

- Studium možnosti náhrady LPS beta-glukanem, flagelinem a R-848 v rámci nádorové imunoterapie.
- Řešení otázky možnosti kotvení ligandů fagocytárních receptorů (f-MLF) kotvením pomocí dvojité hydrofobní kotvy i tumor specifickou interakcí s fosfatidylserinem.
- Ověření možnosti nádorové imunoterapie pomocí blokace CD47.
- Studium otázky exprese fosfatidylserinu na povrchu nádorových buněk.

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Chemikálie

- **anti CD47 aptamer (H-KRFYVVMWKK-OH)** (Schafer-N, Dánsko)
- **BAM₄₀₀₀** – biokompatibilní kotva membrány, Mw 4000 (NOF Corporation, Japonsko)
- **Beta-glukan** – beta 1,3 D glukan ze *Saccharomyces cerevisiae* (Transfer Point, USA)
- **DMSO** – dimetyl sulfoxid (Sigma-Aldrich, USA)
- **DNáza I** (Roche Diagnostic, Německo)
- **Dual Apoptosis Assay with Nucview 488 Caspase-3 Substrate and CF640R Annexin V** (Biotium, USA)
- **EDTA** – kyselina ethylendiamintetraoctová (Sigma-Aldrich, USA)
- **FCS** – fetální bovinní sérum (Sigma-Aldrich, USA)
- **Flagelin** – z bakterie *Bacillus subtilis* (InvivoGen)
- **f-MLF-anti CD47 aptamer (f-MLF-KRFYVVMWKK-OH)**
(Schafer-N, Dánsko)
- **Peptid f-MLFG₅K₈(K(STE))(K(STE))-NH₂** (Schafer-N, Dánsko)
- **Peptid f-MLFKKK14AK (f-MLFKKKFNFRLKAGAKIRFG-OH)** (Schafer-N, Dánsko)
- **H-GKKK14AK (H-GKKKFNFRLKAGAKIRFG-OH)** (Schafer-N, Dánsko)
- **L-glutamin** (PAA-The Cell Culture copany, USA)
- **Liberáza DL** (Roche Diagnostic, Německo)
- **LPS** – lipopolysacharid z bakterie *Eserichia coli* (Sigma-Aldrich, USA)
- **Mannan** – z *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma-Aldrich, USA)
- **Merkaptoetanol** (PAA-The Cell Culture Copany, USA)
- **Penicilin** (PAA-The Cell Culture Copany, USA)
- **Resiquimod (R-848)** (Tocris, Velká Británie)

- **RPMI 1640** (Sigma-Aldrich, USA)
- **Trypanová modř** (Sigma-Aldrich, USA)
- **Trypsin** (Sigma-Aldrich, USA)

4.1.1 Příprava terapeutických látek

Syntéza mannan-BAM₄₀₀₀

Roztok mannanu v prostředí octanu amonného a kyanoborohydridu sodného byl při pH 7,5 a 50 °C redukčně aminován po dobu pěti dnů. Roztok byl následně dialyzován s použitím dialyzační trubice o MWCO 3500 (Serva - Heidelberg, Německo) proti PBS při 4 °C přes noc.

Následně bylo potřeba zkontrolovat pH mannanu-NH₂ (jeho hodnota se musela pohybovat v rozmezí 7,2 – 8,5) a připravit si roztok BAM₄₀₀₀ v DMSO (7,3 mM). K 12 ml mannanu-NH₂ (0,227 mM) přidáno 600 µl BAM₄₀₀₀ a promícháno. Směs se nechala stát 2 hodiny při pokojové teplotě. Po dvou hodinách byla reakce zastavena přidáním 600 µl TRIS/HCL (pH 8,0). Následovala dialýza ve střevě o MWCO 3500 proti PBS při 4 °C přes noc za stálého míchání. Byl získán 0,2 mM roztok mannan-BAM v PBS. Tento roztok a všechny ostatní použité roztoky byly sterilizovány filtrací přes filtry s průměrem pórů 0,22 µm. Suspenze byly sterilizovány UV, jak je uvedeno dále.

Příprava beta-glukanu podávaného perorálně

V kádince bylo smícháno 500 mg práškového beta-glukanu s 8,35 ml vody. Vzniklá směs byla sonikována v sonikátoru HELSCHER VP200S s amplitudou 70 %, 8mm sonda. Sonikace probíhala 10x10 vteřin, mezi jednotlivými sonikacemi bylo zařazeno 20 vteřin chlazení v ledové lázni.

Příprava sterilní suspenze beta-glukanu pro perorální, intraperitoneální, intratumorální a subkutánní podávání.

100 mg beta-glukanu bylo rozsuspendováno v 10 ml PBS. Následoval proces sonikace v sonikátoru HELSCHER VP200S stejně, jako v předešlém bodě. Vzniklá sonikovaná směs byla po dobu 20 minut sterilizována UV zářením.

Příprava směsi beta-glukan/mannan-BAM₄₀₀₀

Bylo smícháno 20 mg beta-glukanu s 2 ml 0,2 mM mannan-BAM₄₀₀₀ v PBS. Opět následoval proces sonikace v sonikátoru HELSCHER VP200S. Vzniklá sonikovaná směs byla po dobu 20 minut sterilizována pod UV zářením.

Příprava roztoků Resiquimodu (Resiquimod HCl)

Resiquimod ve formě báze je ve vodě obtížně rozpustitelný. Proto byl nejprve připraven jeho hydrochlorid. 1,5 mg Resiquimodu bylo smícháno se 4,2 µl 3,5% HCL. Příslušné roztoky byly pak připraveny přidávkem PBS nebo PBS obsahujícím další látky (anti-CD47 aptamer, f-MLF-anti CD 47 aptamer, manan-BAM).

4.2 Laboratorní zvířata

Ve všech *in vivo* pokusech byly použity samice myši C57BL/6N z chovu Charles River Laboratories staré 8 týdnů, váha 18-20g. Všechny myši byly chovány za stejných podmínek ve zvířinci Parazitologického ústavu, BC AVČR. To znamená, že myši byly chovány jednotlivě ve sterilních boxech s neustálým přístupem ke sterilní pitné vodě a ke krmivu ve formě suchých pelet. V místnosti byla nastavena konstantní teplota 22 °C, relativní vlhkost vzduchu 65 % a fotoperioda 12/12 hodin.

4.3 Buňky melanomu B16-F10

V našich experimentech byly používány buňky myšního melanomu B16-F10, které jsme transplantovali myším C57BL/6N. Buňky byly kultivovány v médiu RPMI 1640 s 10% FCS, 1% antibiotiky, 1% glutaminem a 0,1% merkaptoetanolem. Kultivace probíhala v termostatu nastaveného na 37 °C v atmosféře nasycené vodními parami a obsahující 5 % CO₂.

4.4 Příprava buněk B16-F10 pro transplantaci

Narostlá buněčná kolonie byla vyndána z termostatu a zbavena kultivačního media. Následně byla třikrát promyta sterilním pufovaným fyziologickým roztokem (PBS). Po promytí byla provedena trypsinizace adherovaných buněk, tzn. k adherovaným buňkám byla přidána trypsinizační směs (0,02 % trypsinu a 0,02 % EDTA v PBS), která je nutná pro jejich uvolnění. Trypsinizace probíhala v termostatu nastaveného na 37 °C po dobu pěti minut. Po pěti minutách bylo k buňkám přidáno RPMI 1640 medium s 10% FCS a tím byla zastavena trypsinizace. Tímto procesem byly buňky rozvolněny a přelity do centrifugační zkumavky a centrifugovány (10 min/4 °C, 150g). Poté byly buňky naředěny na požadovaný objem přidáním RPMI 1640 a sterilní pipetou opatrně rozvolněny. Následoval proces počítání koncentrace buněk pomocí Bürkerovi komůrky. Aby bylo možné zjistit životnost buněk, bylo odpipetováno malé množství buněk do malé zkumavky a obarveno trypanovou modří (0,5%) v poměru 1:1. Trypanová modř barví mrtvé buňky modře, kdežto živé buňky

zůstávají bílé a tak jsou jednotlivé populace snadno rozeznatelné. Po zjištění koncentrace buněk byla suspenze naředěna na koncentraci 4×10^6 buněk /ml RPMI 1640.

4.5 Transplantace buněk B16-F10

Melanomové buňky B16-F10 byly podkožně transplantované osmitýdenním myším do předem oholeného pravého boku. Transplantovali jsme 4×10^5 buněk v 0,1 ml media RPMI 1640 bez séra na myš.

4.6 Měření velikosti nádorů

Velikost nádorů byla měřena pomocí kaliperu. Pro výpočet objemu nádorové masy byl použit vzorec $V = \pi/6AB^2$, kde A představuje největší rozměr nádoru (délku) a B představuje nejmenší rozměr nádoru (výšku).

Jelikož nádory obecně mají tvar protáhlého rotačního elipsoidu, byl vzorec pro výpočet objemu nádorové masy odvozen ze vzorce pro výpočet objemu právě tohoto typu elipsoidu. Vzorec protáhlého rotačního elipsoidu je $V = 4/3 \pi AB^2$, kde A a B jsou délky poloos, tedy poloměry. My jsme však nepočítali s poloměry, ale s průměry, proto vznikl vzorec $V = \pi/6AB^2$. Tento vzorec, kterým byl stanoven objem nádorů, následuje postup Li a kolektivu (2009).

4.7 Počítání plicních metastáz

Metodika počítání metastáz v plicích spočívá v usmrcení myši a následném vyjmutím plic. Myši byly usmrceny stržením vazy, plíce vyjmuty a konzervovány ve 4% formaldehydu. Následně byly jednotlivé plicní laloky prohlíženy pod binokulární lupou a počítány metastázy. Metastázy byly dobře viditelné (černé tečky různé velikosti), jelikož plicní tkáň ve 4% formaldehydu zesvětlala. Tento postup počítání metastáz následuje postup Větvičky a kolektivu (2007).

4.8 Analýza dat

Výsledná data byla zpracována v programu STATISTICA 12. Statistická významnost byla v případě parametrických metod zjišťována pomocí ANOVY. V případě neparametrických metod byl použit Freidman test. Grafy sledující přežívání myši byly vypracovány na základě testu Kaplan-Meier v programu Sigma plot 13.0.

Průměrná redukce nádorového růstu byla počítána podle postupu Looneyho a kol. (1980). Snížení růstu nádoru (v porovnání s kontrolou) bylo stanoveno takto:

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

Počítali jsme střední hodnotu z hodnot naměřených ve dnech 4, 6, 8, 10, 12 a 14 od začátku terapie (den 0 a 2 se nezapočítává). Výsledek hodnot z těchto dnů je považován za průměrnou redukci nádorového růstu (%).

4.9 Experimenty

4.9.1 Terapie melanomu pomocí f-MLFG₅K₈ (K(STE))(K(STE))-NH₂ a případná synergie s LPS nebo flagelinem

V tomto pokusu bylo použito 30 myší C57BL/6N. Dvanáctý den od transplantace melanomových buněk B16-F10 byly myši rozděleny do šesti skupin (A – K viz. níže) po pěti myších podle režimu aplikace terapeutické látky. Každá myš byla umístěna do samostatného boxu.

Skupiny myší podle podávané terapeutické látky:

- A) 0,5 mM roztok f-MLFG₅K₈ (K(STE))(K(STE))-NH₂ v PBS
- B) flagelin (15 µg/ml PBS)
- C) LPS (0,5 mg/ml PBS)
- D) 0,5 mM roztok f-MLFG₅K₈ (K(STE))(K(STE))-NH₂ v PBS obsahující flagelin (15 µg/ml roztoku)
- E) 0,5 mM roztoku f-MLFG₅K₈ (K(STE))(K(STE))-NH₂ v PBS obsahující LPS (0,5 mg/ml roztoku)
- K) PBS (kontrola)

Léčiva byla intratumorálně aplikována u všech skupin myší celkem šestkrát v množství 50 µl na myš. Terapie byla zahájena v čase 0, tzn. 12. den od transplantace nádorových buněk B16-F10, kdy všem myším byla změřena velikost nádorů. Léčiva byla podávána v pulzech, tzn. ve dnech 0,1,2... 8,9,10. Každý druhý den byla měřena velikost nádorů (vždy těsně před aplikací léčiva). Čtrnáctý den po změření velikosti nádorů byly myši usmrceny stržením vazů, byly jim vyjmuty plíce a spočítány metastázy.

4.9.2 Terapie melanomu pomocí beta-glukanu aplikovaného perorálně a případná synergie s mannan-BAM

V tomto pokusu jsme zkoušeli účinky perorálně podávaného beta-glukanu na růst melanomu. Kromě toho byla zkoušena synergie beta-glukanu s intratumorálně aplikovaným mannan-BAM. V pokuse bylo použito 20 myší C57BL/6N. Dvanáctý den po transplantaci melanomových buněk byly myši rozděleny do čtyř skupin (A – K viz. níže) po pěti myších podle režimu aplikace terapeutické látky. Každá myš byla umístěna do samostatného boxu.

Skupiny myši podle podávané terapeutické látky:

- A)** beta-glukan podávaný perorálně na lačno (suspenze 3 mg v 50 μ l vody)
PBS – aplikováno 50 μ l intratumorálně
- B)** beta-glukan podávaný perorálně na lačno (suspenze 3 mg v 50 μ l vody)
0,2 mM mannan-BAM v PBS, aplikováno 50 μ l intratumorálně
- C)** mannan-BAM podávaný intratumorálně (0,2 mM mannan-BAM v PBS)
- K)** PBS (kontrola) aplikováno 50 μ l intratumorálně

Terapie byla zahájena v čase 0, tzn. 12. den od transplantace nádorových buněk B16-F10, kdy všem myším byla změřena velikost nádorů. Aplikace terapeutické látky se u jednotlivých skupin lišila. Skupině A a skupině B byl podáván beta-glukan denně perorálně na lačno a to ve dnech 0,1,2,3,4,5,6,7,8,9,10 a PBS nebo mannan-BAM byl podáván obden a to ve dnech 0,2,4,6,8,10. Skupinám C a K byla aplikována terapeutická látka opět obden a to ve dnech 0,2,4,6,8,10. Každý druhý den byla měřena velikost nádorů (vždy těsně před aplikací léčiva).

4.9.3 Terapie melanomu pomocí beta-glukanu aplikovaného intraperitoneálně a případná synergie s mannan-BAM

V následujícím pokuse jsme zkoušeli účinky beta-glukanu podávaného intraperitoneálně. Testovali jsme opět, zda funguje synergie beta-glukanu a mannan-BAM. V pokusech bylo použito 20 myši C57BL/6N. Dvanáctý den po transplantaci melanomových buněk byly myši rozděleny do čtyř skupin (A – K viz. níže) po pěti myších podle režimu aplikace terapeutické látky. Každá myš byla umístěna do samostatného boxu.

Skupiny myši podle podávané terapeutické látky:

- A)** beta-glukan podávaný intraperitoneálně (suspenze 0,5 mg v 50 μ l PBS)
PBS - aplikováno 50 μ l intratumorálně
- B)** beta-glukan podávaný intraperitoneálně (suspenze 0,5 mg v 50 μ l PBS)
0,2 mM mannan-BAM v PBS, aplikováno 50 μ l intratumorálně
- C)** 0,2 mM mannan-BAM v PBS, aplikováno 50 μ l intratumorálně
- K)** PBS (kontrola) aplikováno 50 μ l intratumorálně

Terapie byla zahájena v čase 0, tzn. 12. den od transplantace nádorových buněk, kdy všem myším byla změřena velikost nádorů. Všechny látky byly podávány obden,

tzn. ve dnech 0,2,4,6,8,10. Každý druhý den byla měřena velikost nádorů (vždy těsně před aplikací léčiva).

4.9.4 Terapie melanomu pomocí beta-glukanu aplikovaného subkutánně a případná synergie s mannan-BAM

V tomto pokuse jsme zkoušeli třetí způsob aplikace beta-glukanu a to subkutánně. Následně jsme sledovali jeho účinky na nádorovou masu. A opět jsme zkoušeli jeho synergii s mannan-BAM. V pokusech bylo použito 20 myší C57BL/6N. Dvanáctý den po transplantaci melanomových buněk byly myši rozděleny do čtyř skupin (A – K viz. níže) po pěti myších podle režimu aplikace terapeutické látky. Každá myš byla umístěna do samostatného boxu.

Skupiny myší podle podávané terapeutické látky:

A) beta-glukan podávaný subkutánně (suspenze 0,5 mg v 50 µl PBS)

PBS - aplikováno 50 µl intratumorálně

B) beta-glukan podávaný subkutánně (suspenze 0,5 mg v 50 µl PBS)

0,2 mM mannan-BAM v PBS, aplikováno 50 µl intratumorálně

C) 0,2 mM mannan-BAM v PBS, aplikováno 50 µl intratumorálně

K) PBS (kontrola) aplikováno 50 µl intratumorálně

Terapie byla zahájena klasicky v čase 0, tzn. 12. den od transplantace nádorových buněk, kdy všem myším byla změřena velikost nádorů. Všechny terapeutické látky byly podávány obden, tzn. ve dnech 0,2,4,6,8,10. Každý druhý den byla měřena velikost nádorů (vždy těsně před aplikací léčiva).

4.9.5 Terapie melanomu pomocí beta-glukanu aplikovaného intratumorálně a případná synergie s mannan-BAM

Intratumorální aplikace byl čtvrtý způsob použití beta-glukanu, který jsme zkoušeli při léčbě melanomu. A opět jsme zkoušeli jeho synergii s mannan-BAM. V pokusech bylo použito 20 myší C57BL/6N. Dvanáctý den po transplantaci melanomových buněk byly myši rozděleny do čtyř skupin (A – K viz. níže) po pěti myších podle režimu aplikace terapeutické látky. Každá myš byla umístěna do samostatného boxu.

Skupiny myši podle podávané terapeutické látky:

- A) beta-glukan podávaný intratumorálně (suspenze 0,5 mg v 50 μ l PBS)
- B) beta-glukan/mannan-BAM podávané intratumorálně
(suspenze 0,5 mg v 50 μ l 0,2 mM manan-BAM v PBS)
- C) 0,2 mM mannan-BAM v PBS, aplikováno 50 μ l intratumorálně
- K) PBS (kontrola) aplikováno 50 μ l intratumorálně

Terapie byla zahájena stejně jako v předešlých pokusech v čase 0, tzn. 12. den od transplantace nádorových buněk B16-F10, kdy všem myším byla změřena velikost nádorů. Všechny terapeutické látky byly podávány obden, tzn. ve dnech 0,2,4,6,8,10. Každý druhý den byla měřena velikost nádorů (vždy těsně před aplikací léčiva).

4.9.6 Terapie melanomu prostřednictvím f-MLFKKK14AK a případná synergie s LPS

V tomto pokusu bylo použito 36 myši C54BL/6N. Dvanáctý den po transplantaci melanomových buněk byly myši rozděleny do šesti skupin (A – K viz. níže) po šesti myších podle režimu aplikace terapeutické látky. Každá myš byla umístěna do samostatného boxu.

Skupiny myši podle podávané terapeutické látky:

- A) 0,5 mM f-MLFKKK14AK v PBS
- B) 0,5 mM H-GKKK14AK v PBS
- C) 0,5 mM f-MLFKKK14AK + LPS (0,5 mg/ml) v PBS
- D) 0,5 mM H-GKKK14AK + LPS (0,5 mg/ml) v PBS
- E) LPS (0,5 mg/ml PBS)
- K) PBS (kontrola)

Terapeutická látka byla myším aplikována do nádoru v množství 50 μ l na myš. Terapie byla zahájena v čase 0, tzn. 12. den od transplantace nádorových buněk B16-F10, kdy všem myším byla změřena velikost nádorů. Terapeutická látka byla podávána v tomto pokusu v pulzech, tzn. ve dnech 0,1,2...8,9,10...16,17,18...24,25,26. Měření velikosti nádorů probíhalo každý druhý den. Po ukončení terapie byl sledován růst nádorů a doba přežití myši.

4.9.7 Použití anti CD47 aptameru v nádorové terapii

V pokusu s anti CD47 aptamerem bylo použito 42 myší C57BL/6N. Dvanáctý den po transplantaci melanomových buněk byly myši rozděleny do sedmi skupin (A – K viz. níže) po šesti myších podle režimu aplikace terapeutické látky. Každá myš byla umístěna do samostatného boxu.

Skupiny myší podle podávané terapeutické látky:

- A) anti CD47 aptamer (H-KRFYVVMWKK-OH) (0,5 mM roztok v PBS)
- B) f-MLF-anti CD47 aptamer (f-MLF-KRFYVVMWKK-OH) (0,5 mM roztok v PBS)
- C) Resiquimod HCL (0,5 mg/ml PBS)
- D) Resiquimod HCL / anti CD47 aptamer (0,5 mg Resiquimodu/ml 0,5 mM anti CD47 aptameru v PBS)
- E) Resiquimod HCL / f-MLF-anti CD47 aptamer (0,5 mg Resiquimodu/ml 0,5 mM f-MLF-anti-anti CD47 aptameru v PBS)
- F) Resiquimod HCL / anti CD47 aptamer / mannan-BAM (0,5 mg Resiquimodu/ml 0,5 mM anti CD47 aptameru v 0,2 mM mannanu v PBS)
- K) PBS (kontrola)

Léčiva byla myším aplikována u všech skupin celkem šestkrát v množství 50 μ l na myš. Terapie byla zahájena v čase 0, tzn. 12. den od transplantace nádorových buněk B16-F10, kdy všem myším byla změřena velikost nádorů. Léčiva byla podávána ve dvou pulzech, tzn. ve dnech 0,1,2... 8,9,10. Každý druhý den byla měřena velikost nádorů (vždy těsně před aplikací léčiva). Čtrnáctý po změření velikosti nádorů byly myši usmrceny stržením vazů, byly jim vyjmuty plíce a spočítány metastázy.

4.9.8 Studium otázky exprese fosfatidylserinu na povrchu nádorových buněk pomocí průtokové cytometrie

4.9.8.1 Míra exprese fosfatidylserinu na melanomových buňkách B16-F10 z buněčné kultury v závislosti na pH

V následujícím *in vitro* pokusu jsme se snažili zjistit míru exprese fosfatidylserinu (PS) na povrchu B16-F10 nádorových buněk z kultury. Předmětem studia byla zároveň i změna exprese PS v závislosti na pH kultivačního média. Použito bylo médium o pH 7,5 (pH krve 7,35 – 7,45) a médium o pH 6,6 (pH nádorového prostředí 6,6 – 6,8).

Příprava buněk pro in vitro pokus

Namnožené nádorové buňky byly vyndány z termostatu a zbaveny kultivačního media. Následně byly třikrát promyty sterilním pufrovaným fyziologickým roztokem (PBS). Po promytí byla provedena trypsinizace adherovaných buněk, tzn. k adherovaným buňkám byla přidána trypsinizační směs (0,02 % trypsinu a 0,02 % EDTA v PBS), která je nutná pro jejich uvolnění. Proces trypsinizace probíhal v termostatu při 37 °C po dobu dvou minut. Trypsinizace byla zastavena přidáním média RPMI 1640 s 10% FCS o požadovaném pH (pH 6,6 a pH 7,5). Buňky byly s médiem kultivovány šest hodin při 37 °C. Po šesti hodinové kultivaci následoval proces sklizení buněk a jejich spočítání. Buňky v množství 1×10^6 (jak od pH 6,6 tak i od pH 7,5) byly centrifugovány (10 min/4 °C, 150g) a převedeny do 1 ml 1x Binding Bufferu (5x Annexin V Binding Buffer s destilovanou vodou v poměru 1:5).

Analýza na průtokovém cytometru

Z obou připravených buněčných suspenzí (suspenze o pH 6,6 a suspenze o pH 7,5) bylo následně odpipetováno 200 µl do zkumavek určených pro průtokovou cytometrii (pracovali jsme v tripletech + jedna kontrola). Ke kontrole byl přidán 1 µl Caspaze-3 inhibitoru a vše se nechalo kultivovat 15 minut při pokojové teplotě. Po 15 minutách bylo do každé zkumavky (včetně kontroly) přidáno 5 µl NucView 488 Caspase-3 a 5 µl CF640R Annexin V a opět probíhala kultivace, ale tentokrát ve tmě při pokojové teplotě po dobu 30 minut. Po kultivaci bylo do každé zkumavky přidáno 400 µl 1x Binding Bufferu a následovalo měření v průtokovém cytometru.

Po správném nastavení průtokového cytometru (viz Tab. I) byly zkumavky vloženy do přístroje a jednotlivé vzorky změřeny. Bylo zaznamenáno 20 000 událostí. Výsledky byly zpracovány a vyhodnoceny v programu BD FACSDiva verze 6.1.3.

Tab. I: Nastavení průtokového cytometru.

Nastavení laserů	
Window Extension	2,00
FSC Area Scaling	0,50
Laser Delay Blue	0,00
Laser Delay Red	30,69
Area Scaling Blue	0,50
Area Scaling Red	1,32

4.9.8.2 Porovnání exprese fosfatidylserinu na melanomových buňkách B16-F10 z buněčné kultury a z prostředí nádoru

V tomto *in vitro* pokusu jsme se snažili porovnat míru exprese fosfatidylserinu na povrchu nádorových buněk z buněčné kultury (v tomto případě kultivovaných šest hodin s médiem o pH 6,6 při 37 °C viz pokus 4.9.8.1) a nádorových buněk odebraných přímo z prostředí nádoru.

Odebírání a zpracování nádorů

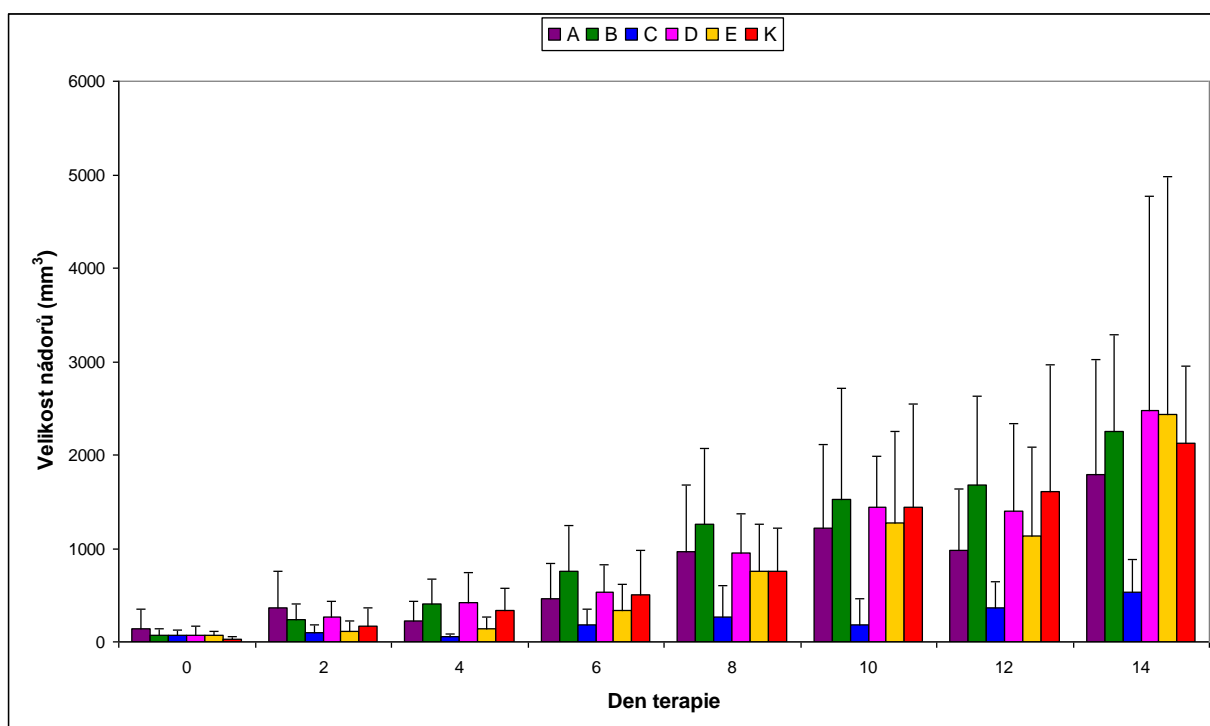
Nádor byl vypitván a zbaven veškerých nečistot opláchnutím v RPMI 1640 bez séra. Poté byl nádor rozstříhán na malé kousky a vložen do 1 ml sterilního RPMI 1640 bez séra s Liberázou DL (0,33 g/ml) a DNázou I (0,2 mg/ml). Vše bylo inkubováno po dobu jedné hodiny při 37 °C s mírným třepáním. Po hodinové inkubaci byly vzorky promyty centrifugací (10min/4 °C/160g) a vzniklý pelet byl naředěn v PBS. Následně byl homogenizován přes sterilní sítko s póry o velikosti 70 µm. Homogenizovaná suspenze byla převedena do 50 ml zkumavky a opět promyta centrifugací ve větším objemu PBS (10min/4 °C/160g). Obsah zkumavky byl slit a k peletu byl přidán 1x Binding Buffer.

Analýza a zpracování vzorků probíhala stejným způsobem, jako v předešlém pokuse (viz kapitola 4.9.8.1). Nastavení průtokového cytometru bylo také stejné jako v předešlém pokuse (viz. Tab. I.)

5 VÝSLEDKY

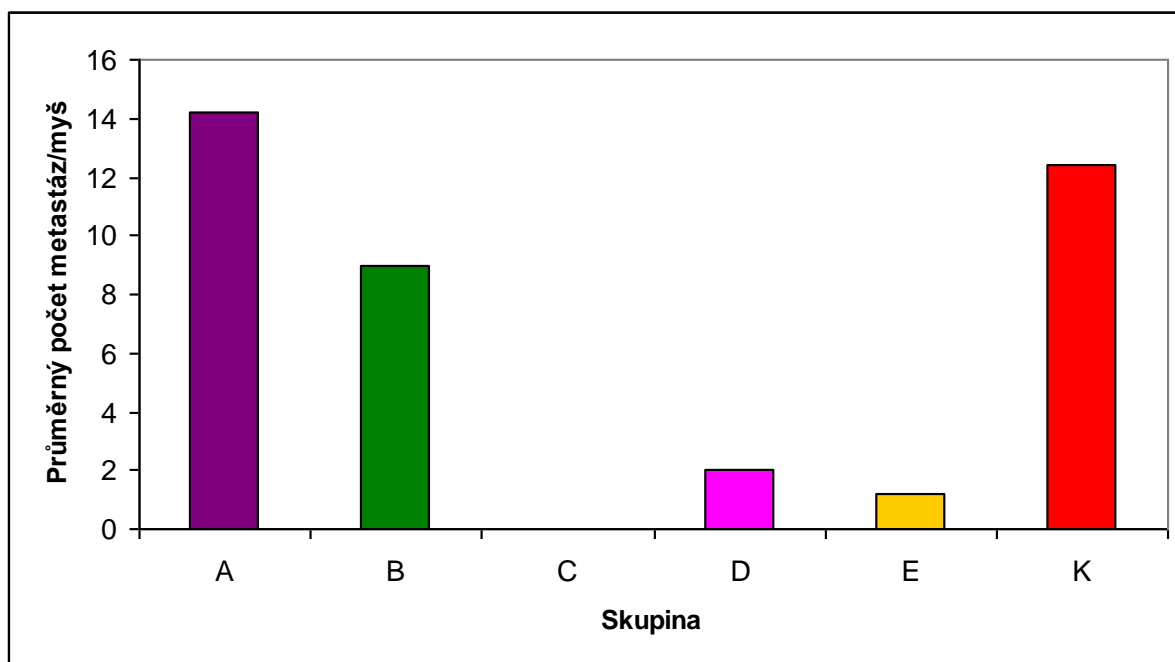
5.1 Terapie melanomu pomocí f-MLFG₅K₈ (K(STE)) (K(STE))-NH₂ a případná synergie s LPS nebo flagelinem

Na Obr. 6 je znázorněn vliv léčby na redukcii růstu melanomu. V tomto pokusu byla použita k léčbě melanomu terapeutická látka f-MLFG₅K₈(K(STE))(K(STE))-NH₂ (skupina A, fialová barva) a flagelin (skupina B, zelená barva) a zároveň se zkoušela jejich vzájemná synergie. Snažili jsme se, jak o otestování pevnějšího kotvení f-MLF motivu pomocí dvojité kotvy, tak o náhradu LPS flagelinem, ovšem z výsledku je zřejmé, že f-MLFG₅K₈(K(STE))(K(STE))-NH₂, flagelin a ani jejich vzájemná synergie nemají žádný vliv na redukcii nádorů. Jediný vliv na redukcii nádorové hmoty měl lipopolysacharid (skupina C, modrá barva).



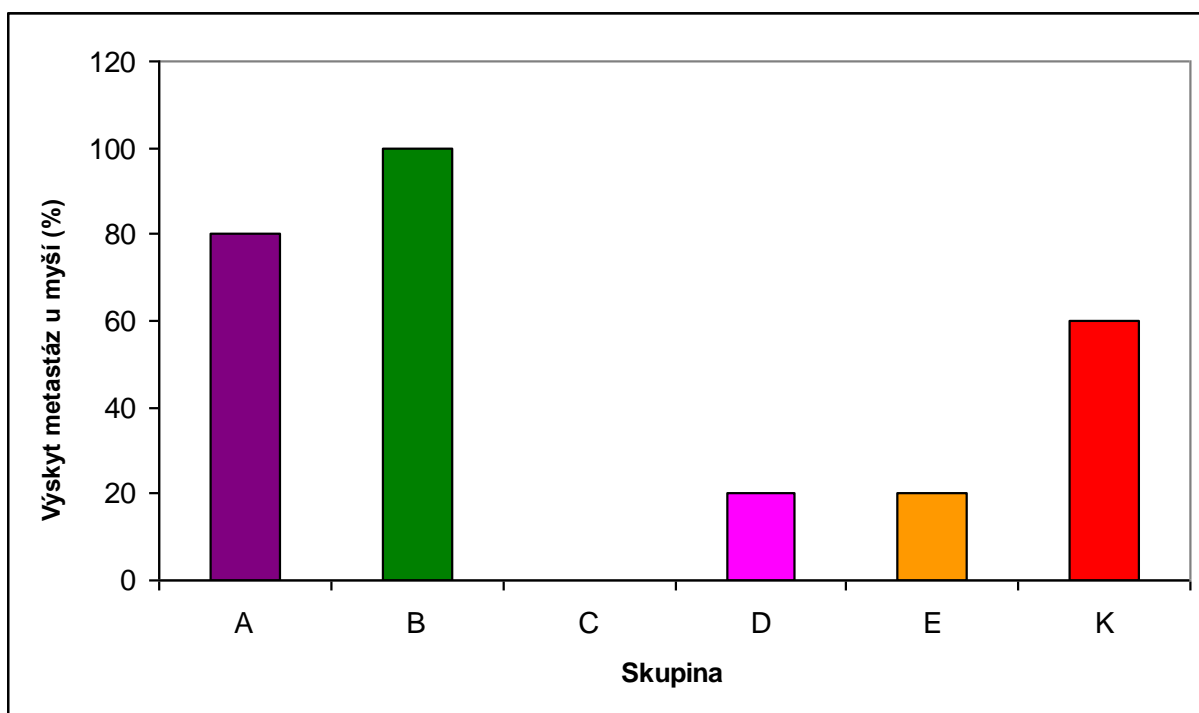
Obr. 6: Vliv léčby na redukcii nádorů. **A)** 0,5 mM f-MLFG₅K₈(K(STE))(K(STE))-NH₂, **B)** flagelin (15 µg/ml PBS), **C)** LPS (0,5 mg/ml), **D)** 0,5 mM f-MLFG₅K₈(K(STE))(K(STE))-NH₂ + flagelin (15 µg/ml PBS), **E)** 0,5 mM f-MLFG₅K₈(K(STE))(K(STE))-NH₂ + LPS (0,5 mg/ml), **K)** PBS.

Na Obr. 7 je uvedena intenzita metastazování, vyjádřena jako průměrný počet metastáz/myš u jednotlivých skupin. Metastázy byly nejvíce potlačeny u skupiny myši, kterým bylo podáváno samotné LPS (skupina C), u skupiny které byla podávána kombinace f-MLFG₅K₈(K(STE))(K(STE))-HN₂ s LPS (skupina E, žlutá barva) a u skupiny, které byla podávána kombinace f-MLFG₅K₈(K(STE))(K(STE))-NH₂ s flagelinem (skupina D, růžová barva).



Obr. 7: Průměrný počet metastáz/myš u jednotlivých skupin. **A)** 0,5 mM f-MLFG₅K₈(K(STE))(K(STE))-NH₂, **B)** flagelin (15 µg/ml PBS), **C)** LPS (0,5 mg/ml), **D)** 0,5 mM f-MLFG₅K₈(K(STE))(K(STE))-NH₂ + flagelin (15 µg/ml PBS), **E)** 0,5 mM f-MLFG₅K₈(K(STE))(K(STE))-NH₂ + LPS (0,5 mg/ml), **K)** PBS.

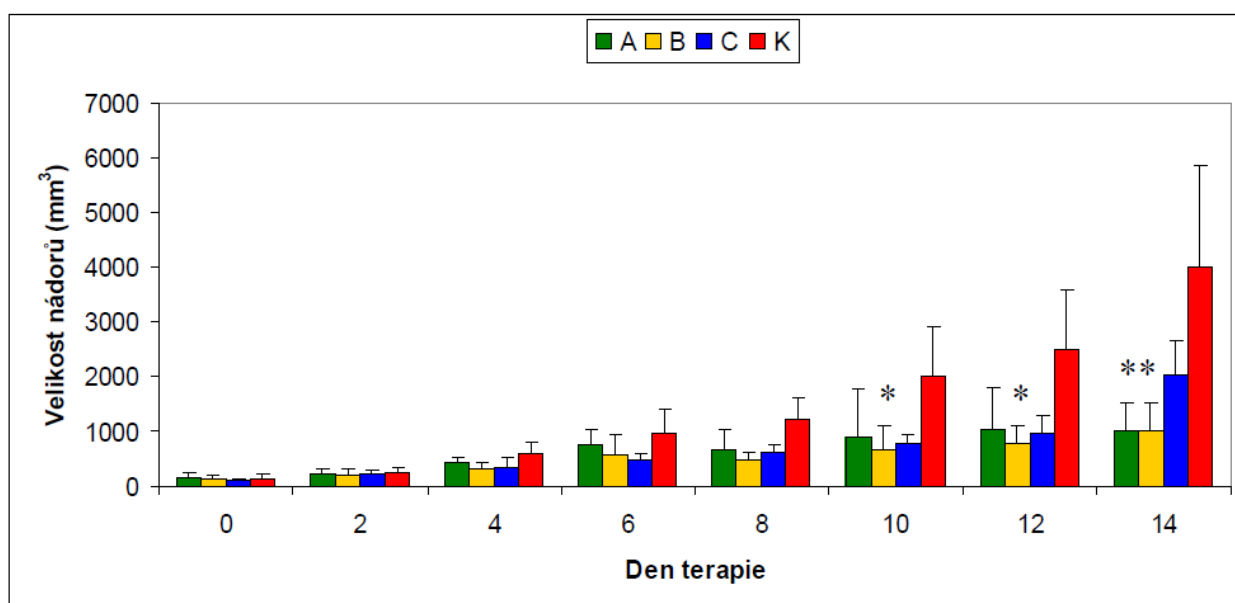
Na Obr. 8 je uvedena prevalence metastáz u myší v jednotlivých skupinách. Z obrázku vyplývá, že skupina myší, kterým byl podáván samotný flagelin (skupina B, zelená barva), dosahovala nejvyšších hodnot, jelikož se metastázy vyskytovaly u všech myší. Použití f-MLFG₅K₈(K(STE))(K(STE))-NH₂ v kombinaci s flagelinem (skupina D, růžová barva) a f-MLFG₅K₈(K(STE))(K(STE))-NH₂ v kombinaci s LPS (skupina E, žlutá barva) vykazovalo lepších výsledků než f-MLFG₅K₈(K(STE))(K(STE))-NH₂ samotné (skupina A, fialová barva). Ve skupině myší léčených samotným LPS (skupina C) se metastázy nevyskytovaly vůbec.



Obr. 8: Prevalence metastáz u myší v jednotlivých skupinách. **A)** 0,5 mM f-MLFG₅K₈(K(STE))(K(STE))-NH₂, **B)** flagelin (15 µg/ml PBS), **C)** LPS (0,5 mg/ml), **D)** 0,5 mM f-MLFG₅K₈(K(STE))(K(STE))-NH₂ + flagelin (15 µg/ml PBS), **E)** 0,5 mM f-MLFG₅K₈(K(STE))(K(STE))-NH₂ + LPS (0,5 mg/ml), **K)** PBS.

5.2 Terapie melanomu pomocí beta-glukanu aplikovaného perorálně a případná synergie s mannan-BAM

V následujících čtyřech pokusech jsme zkoušeli účinky beta-glukanu aplikovaného několika způsoby a mimo jiné jsme zkoušeli i jeho synergii s mannan-BAM. Obr. 9 znázorňuje účinek beta-glukanu aplikovaného perorálně (skupina A, zelená barva), jeho synergie s mannan-BAM (skupina B, žlutá barva) a samotný účinek mannan-BAM (skupina C, modrá barva). Skupina K (červená barva) je kontrolní. Z grafu vyplývá, že největší vliv na redukci nádorů vykazuje především skupina B, kde je tato redukce 10., 12. a 14. den statisticky významná. Perorálně podávaný samotný beta-glukan vykazuje statisticky významný účinek až 14. den.

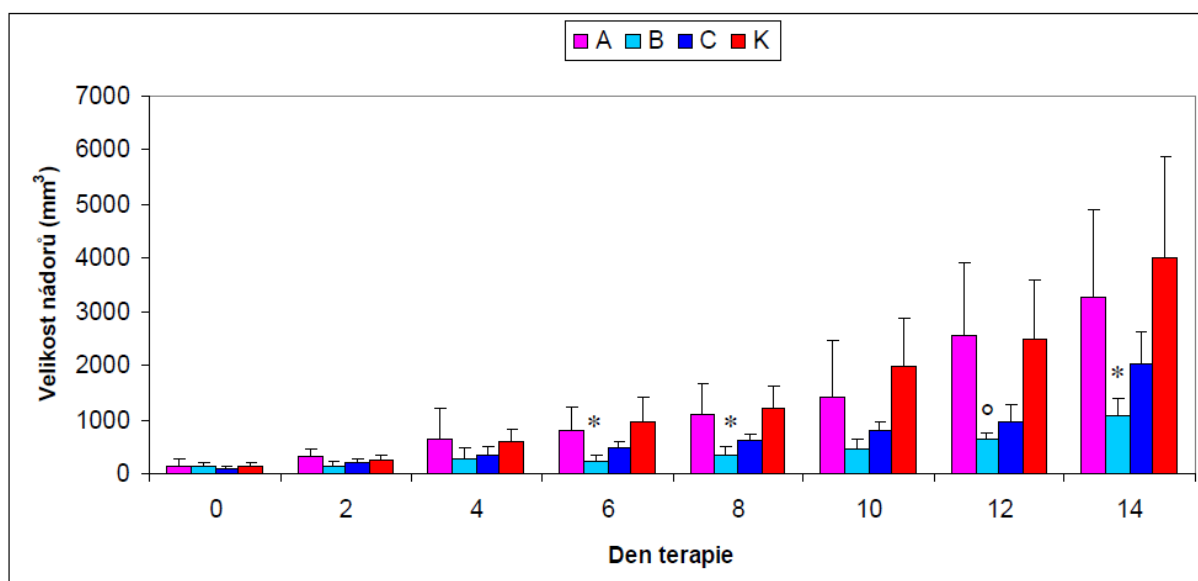


Obr. 9: Vliv léčby na velikost nádorů pomocí perorálně aplikovaného beta-glukanu a studium jeho synergie s intratumorálně aplikovaným mannan-BAM. **A)** beta-glukan podávaný perorálně na lačno (suspenze 3 mg v 50 µl vody). PBS – aplikováno 50 µl intratumorálně, **B)** beta-glukan podávaný perorálně na lačno (suspenze 3 mg v 50 µl vody). 0,2 mM mannan-BAM v PBS, aplikováno 50 µl intratumorálně, **C)** mannan-BAM podávaný intratumorálně (0,2 mM mannan-BAM v PBS), **K)** PBS (kontrola) aplikováno 50 µl intratumorálně.

* $P \leq 0,05$ vztaženo ke skupině K (PBS).

5.3 Terapie melanomu pomocí beta-glukanu aplikovaného intraperitoneálně a případná synergie s mannan-BAM

Na Obr. 10 je zaznamenaná intraperitoneální aplikace beta-glukanu (skupina A, růžová barva), jeho synergie s mannan-BAM (skupina B, světle modrá barva) a intratumorální aplikace mannan-BAM (skupina C, tmavě modrá barva). Skupina K je kontrolní. Z grafu je zřejmé, že největší účinek vykazuje skupina B, tedy intraperitoneálně podávaný beta-glukan v synergii s mannan-BAM.

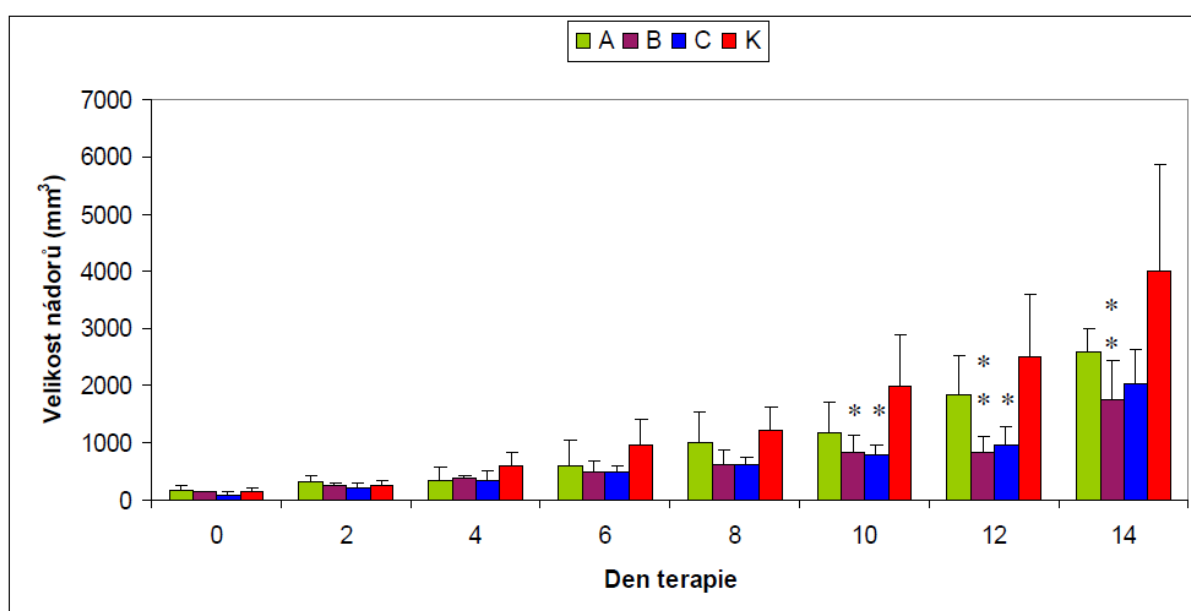


Obr. 10: Vliv léčby na velikost nádorů pomocí intraperitoneálně aplikovaného beta-glukanu a studium jeho synergie s intratumorálně aplikovaným mannan-BAM. **A)** beta-glukan podávaný intraperitoneálně (suspenze 0,5 mg v 50 μ l PBS). PBS - aplikováno 50 μ l intratumorálně, **B)** beta-glukan podávaný intraperitoneálně (suspenze 0,5 mg v 50 μ l PBS). 0,2 mM mannan-BAM v PBS, aplikováno 50 μ l intratumorálně, **C)** 0,2 mM mannan-BAM v PBS, aplikováno 50 μ l intratumorálně, **K)** PBS (kontrola) aplikováno 50 μ l intratumorálně.

* $P \leq 0,05$ vztaženo ke skupině K (PBS), ° $P \leq 0,05$ vztaženo ke skupině A (beta-glukan i.p.)

5.4 Terapie melanomu pomocí beta-glukanu aplikovaného subkutánně a případná synergie s mannan-BAM

Obr. 11 vyjadřuje výsledky experimentu se subkutánně podávaným beta-glukanem (skupina A, zelená barva), jeho synergií s mannan-BAM (skupina B, fialová barva) a výsledek intratumorální aplikace mannan-BAM (skupina C, modrá barva). Skupina K je kontrolní. Zde vidíme, že největší redukci nádorové masy vykazuje terapeutická kombinace podávaná skupině B, kde tato redukce byla opakovaně statisticky výrazně signifikantní. Skupina C léčená intratumorálně podávaným mannan-BAM vykazovala redukci nádorového růstu pouze 10. a 12. den terapie.

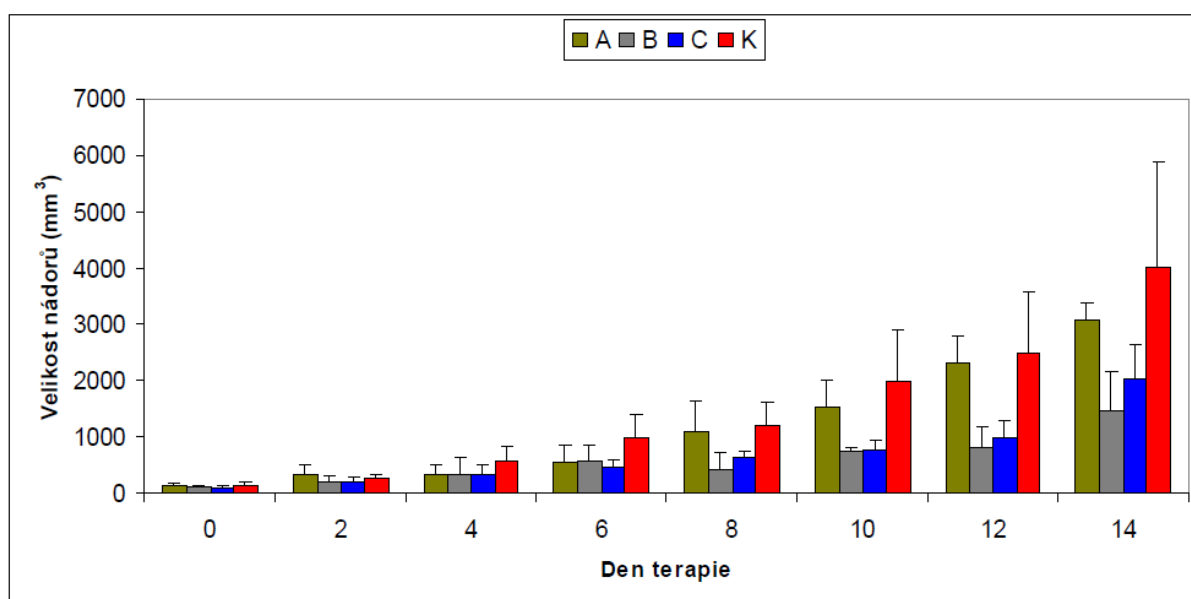


Obr. 11: Vliv léčby na velikost nádorů pomocí subkutánně aplikovaného beta-glukanu a studium jeho synergie s intratumorálně aplikovaným mannan-BAM. **A)** beta-glukan podávaný subkutánně (suspenze 0,5 mg v 50 µl PBS). PBS - aplikováno 50 µl intratumorálně, **B)** beta-glukan podávaný subkutánně (suspenze 0,5 mg v 50 µl PBS). 0,2 mM mannan-BAM v PBS, aplikováno 50 µl intratumorálně, **C)** 0,2 mM mannan-BAM v PBS. aplikováno 50 µl intratumorálně, **K)** PBS (kontrola) aplikováno 50 µl intratumorálně.

* $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$ vztaženo ke skupině K (PBS)

5.5 Terapie melanomu pomocí beta-glukanu aplikovaného intratumorálně a případná synergie s mannan-BAM

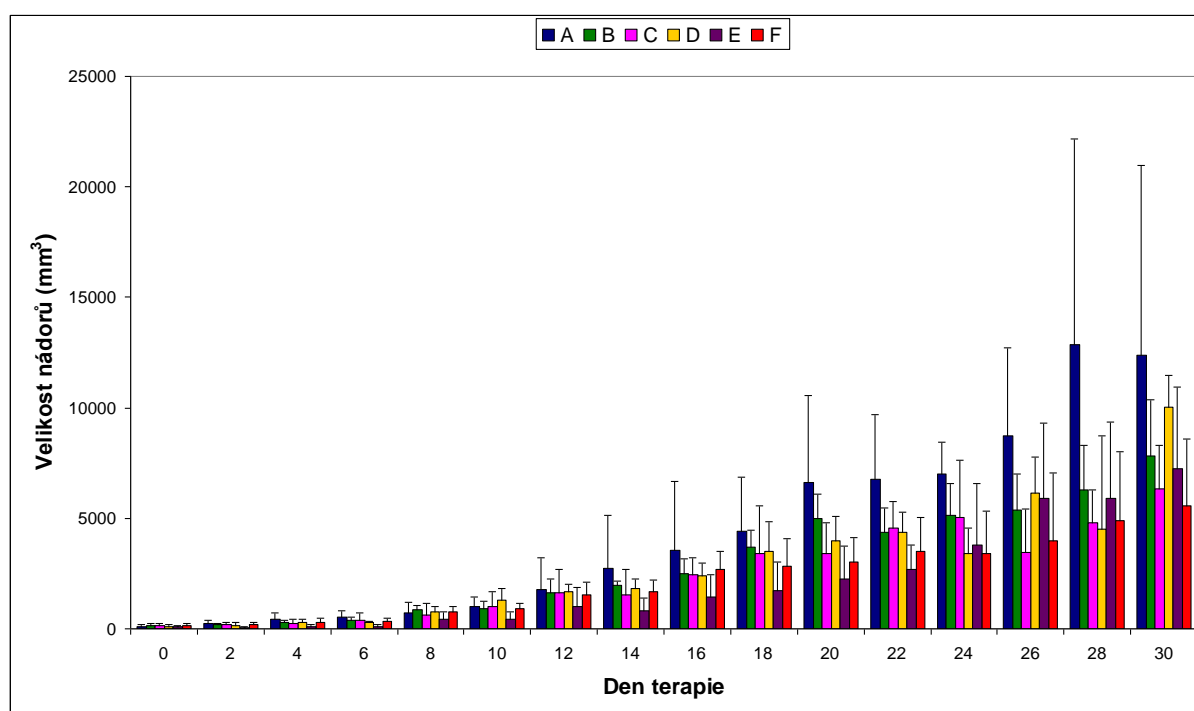
Obr. 12 ukazuje výsledky protinádorového působení intratumorálně podávaného beta-glukanu (skupina A, zelená barva), jeho synergie s mannan-BAM (skupina B, šedivá barva) a intratumorální aplikace mannan-BAM (skupina C, modrá barva). Skupina K je kontrolní. Z grafu je zřejmé, že ve skupině B a C došlo k určité redukci růstu nádorů, ale ani jedna skupina nevykazovala statistickou významnost.



Obr. 12: Vliv léčby na velikost nádorů pomocí intratumorálně aplikovaného beta-glukanu a studium jeho synergie s intratumorálně aplikovaným mannan-BAM. **A)** beta-glukan podávaný intratumorálně (suspenze 0,5 mg v 50 μ l PBS), **B)** beta-glukan/mannan-BAM podávané intratumorálně (suspenze 0,5 mg v 50 μ l 0,2 mM manan-BAM v PBS), **C)** 0,2 mM mannan-BAM v PBS, aplikováno 50 μ l intratumorálně, **K)** PBS (kontrola) aplikováno 50 μ l intratumorálně.

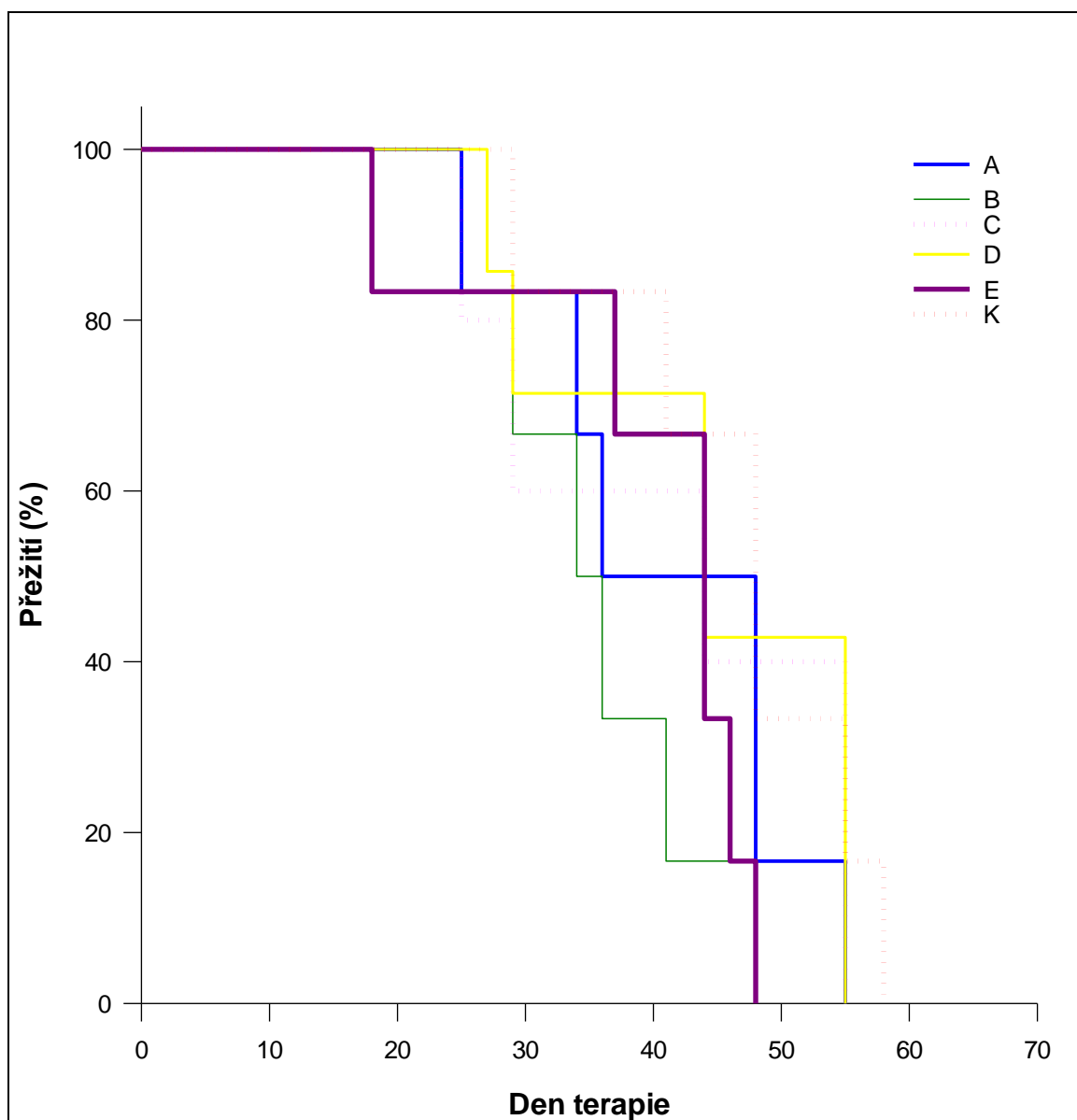
5.6 Terapie melanomu prostřednictvím f-MLFKKK14AK a případná synergie s LPS

Graf na Obr. 13 vyjadřuje vliv intratumorální aplikace uvedených látek na redukci nádorového růstu. Hlavní terapeutickou látkou byl f-MLFKKK14AK (skupina A, modrá barva) a byla studována jeho synergie s LPS (skupina C, růžová barva). Zkoušeli jsme i samotné LPS (skupina E, fialová barva). Mimo jiné jsme zkoušeli i působení samotného vazebného motivu na nádorové buňky (14AK sekvence s inertním glycinem) a to jak samotného, tak v synergii s LPS (skupina B, zelená barva, skupina D, žlutá barva). Skupina K byla opět kontrolní.



Obr. 13: Vliv léčby na redukci nádorů. Nádorová terapie prostřednictvím intratumorálně aplikovaného f-MLFKKK14AK, LPS a kombinace obou látek. **A)** 0,5 mM f-MLFKKK14AK v PBS, **B)** 0,5 mM H-GKKK14AK v PBS, **C)** 0,5 mM f-MLFKKK14AK + LPS (0,5 mg/ml) v PBS, **D)** 0,5 mM H-GKKK14AK + LPS (0,5 mg/ml) v PBS, **E)** LPS (0,5 mg/ml PBS), **K)** PBS i.t.

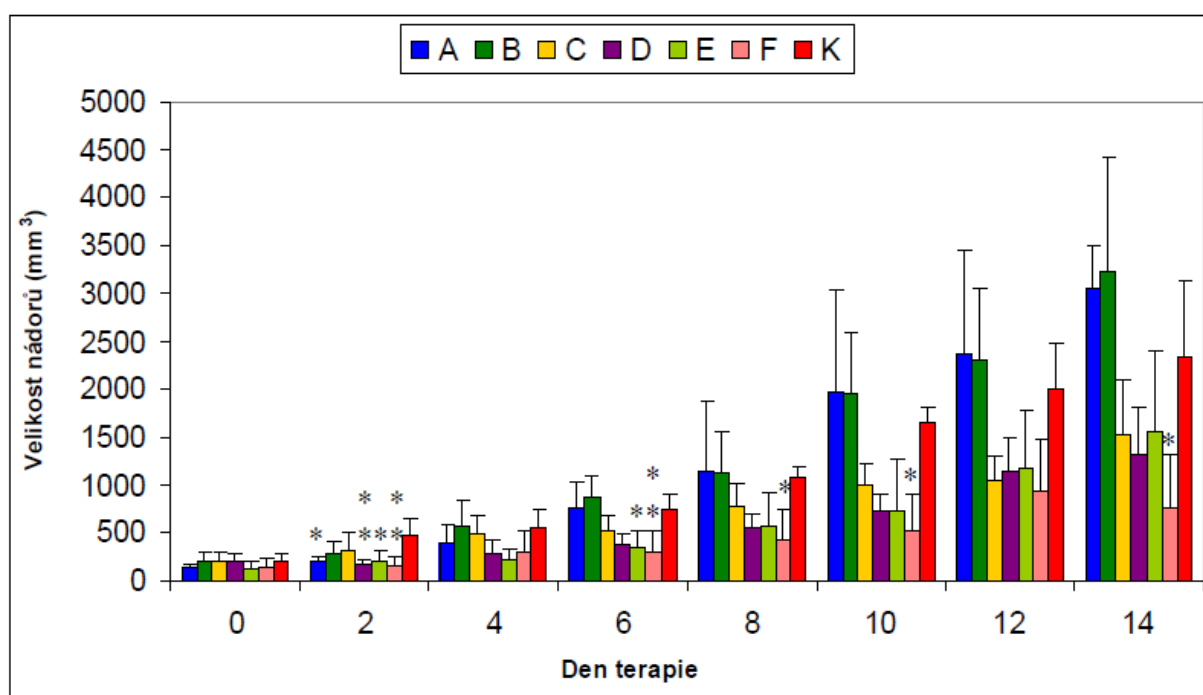
U tohoto experimentu byla sledována délka přežití. Žádný z uvedených terapeutických přístupů nevedl k jeho prodloužení.



Obr. 14: Vliv terapeutických látky aplikovaných intratumorálně na délku přežití myši. **A)** 0,5 mM f-MLFKKK14AK v PBS, **B)** 0,5 mM H-GKKK14AK v PBS, **C)** 0,5 mM f-MLFKKK14AK + LPS (0,5 mg/ml) v PBS, **D)** 0,5 mM H-GKKK14AK + LPS (0,5 mg/ml) v PBS, **E)** LPS (0,5 mg/ml PBS), **K)** PBS.

5.7 Použití anti CD47 aptameru v nádorové terapii

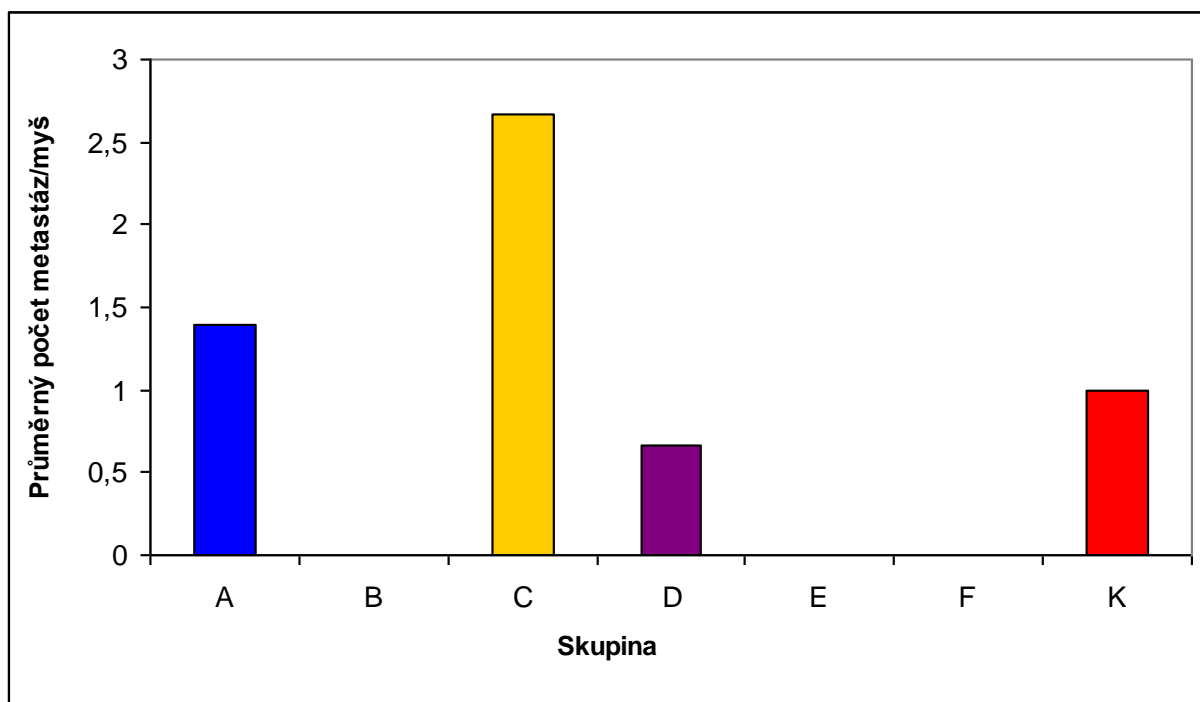
Obr. 15 ukazuje výsledky experimentu s Resiquimodem (skupina C, žlutá barva) a anti CD47 aptamerem (skupina A, modrá barva), jejich vzájemnou synergii (skupina D, fialová barva). Mimo jiné jsme zkoušeli kombinaci R-848 s f-MLF (skupina B, zelená barva), kombinaci R-848 s f-MLF-anti CD47 aptamerem (skupina E, světle zelená barva) a kombinaci R-848 s anti CD47 aptamerem a mannan-BAM (skupina F, růžová barva). Skupina K byla kontrolní. Z grafu je zřejmé, že blokáce anti CD47 aptamerem nefungovala a veškeré terapeutické výsledky jsou dány samotným R-848 a jeho kombinací s mannan-BAM.



Obr. 15: Nádorová terapie s použitím anti CD47 aptameru. **A)** 0,5 mM anti CD47 aptamer v PBS, **B)** 0,5 mM f-MLF-anti CD47 aptamer v PBS, **C)** Resiquimod HCL, **D)** Resiquimod HCL / anti CD47 aptamer, **E)** Resiquimod HCL / f-MLF-anti CD47 aptamer, **F)** Resiquimod HCL / anti CD47 aptamer / mannan-BAM, **K)** PBS (kontrola).

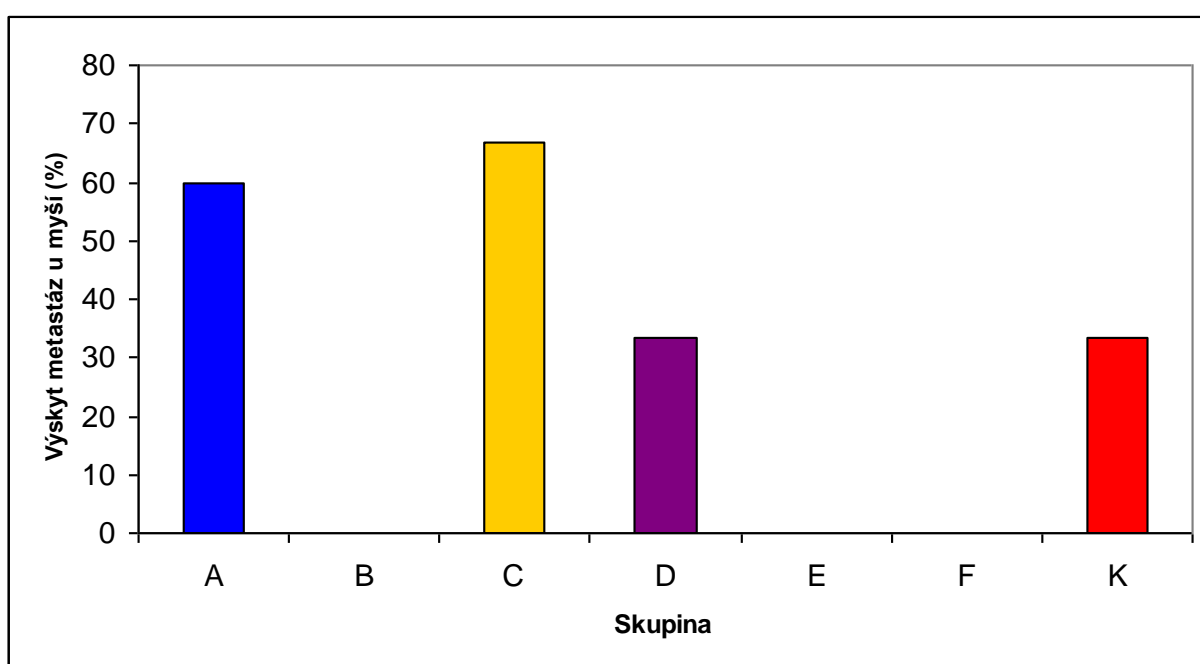
* $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$ vztaženo ke skupině K (PBS).

Na Obr. 16 je uvedena intenzita metastazování, vyjádřena jako průměrný počet metastáz/myš u jednotlivých skupin. Metastázy byly nejvíce potlačeny u skupiny myši, kterým byl podáván f-MLF-anti CD47 aptamer (skupina B), u skupiny, které byla podávána kombinace Resiquimod HCL s f-MLF-anti CD47 aptamerem (skupina E) a u skupiny, které byla podávána kombinace Resiquimod HCL s anti CD47 aptamerem a mannan-BAM (skupina F).



Obr. 16: Průměrný počet metastáz/myš u jednotlivých skupin. **A)** 0,5 mM anti CD47 aptamer v PBS, **B)** 0,5 mM f-MLF-anti CD47 aptamer v PBS, **C)** Resiquimod HCL, **D)** Resiquimod HCL / anti CD47 aptamer, **E)** Resiquimod HCL / f-MLF-anti CD47 aptamer, **F)** Resiquimod HCL / anti CD47 aptamer / mannan-BAM, **K)** PBS (kontrola).

Na Obr. 17 je uvedena prevalence metastáz u myši v jednotlivých skupinách. Z obrázku vyplývá, že skupiny myši, kterým byl podáván buď samotný anti CD 47 aptamer (skupina A, modrá barva) nebo samotný Resiquimod HCL (skupina C, žlutá barva) dosahovaly nejvyšších hodnot, jelikož se metastázy vyskytovaly ve více jak 60%. Použití Resiquimod HCL v kombinaci s anti CD 47 (skupina D, fialová barva) vykazovalo lepší výsledky než účinek těchto terapeutických látek samotných. Ve skupině myši léčených f-MLF-anti CD47 aptamerem (skupina B), nebo ve skupině myši léčených kombinací Resiquimod HCL s f-MLF-anti CD47 aptamerem (skupina E) či kombinací Resiquimod HCL s anti CD47 aptamerem a mannan-BAM (skupina F) se metastázy nevyskytovaly vůbec.

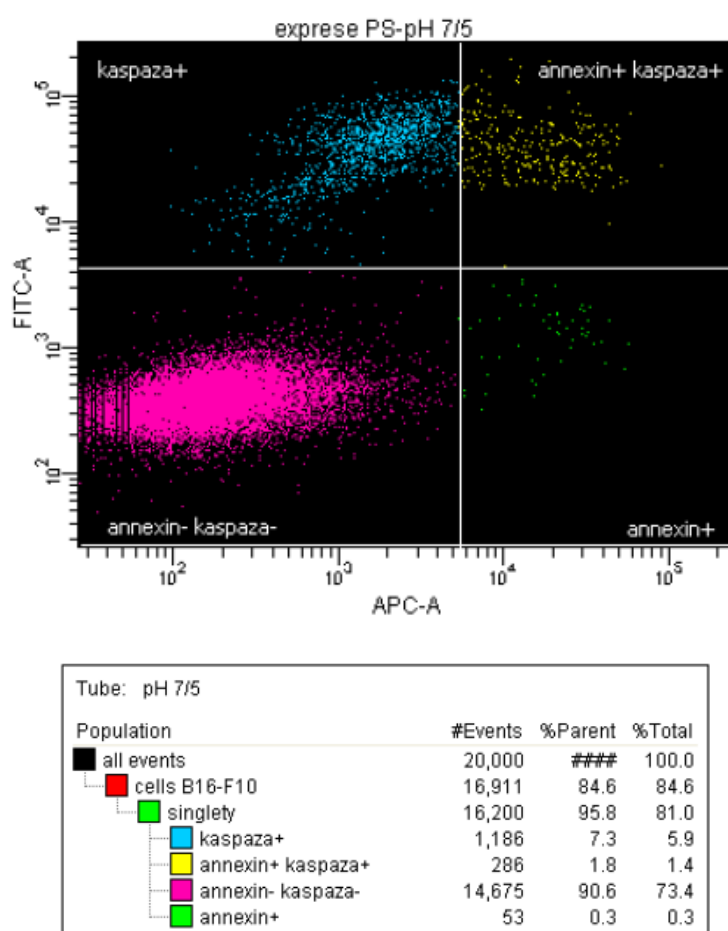


Obr. 17: Prevalence metastáz u myši v jednotlivých skupinách. **A)** 0,5 mM anti CD47 aptamer v PBS, **B)** 0,5 mM f-MLF-anti CD47 aptamer v PBS, **C)** Resiquimod HCL, **D)** Resiquimod HCL / anti CD47 aptamer, **E)** Resiquimod HCL / f-MLF-anti CD47 aptamer, **F)** Resiquimod HCL / anti CD47 aptamer / mannan-BAM, **K)** PBS (kontrola).

5.8 Studium otázky exprese fosfatidylserinu na povrchu nádorových buněk pomocí průtokové cytometrie

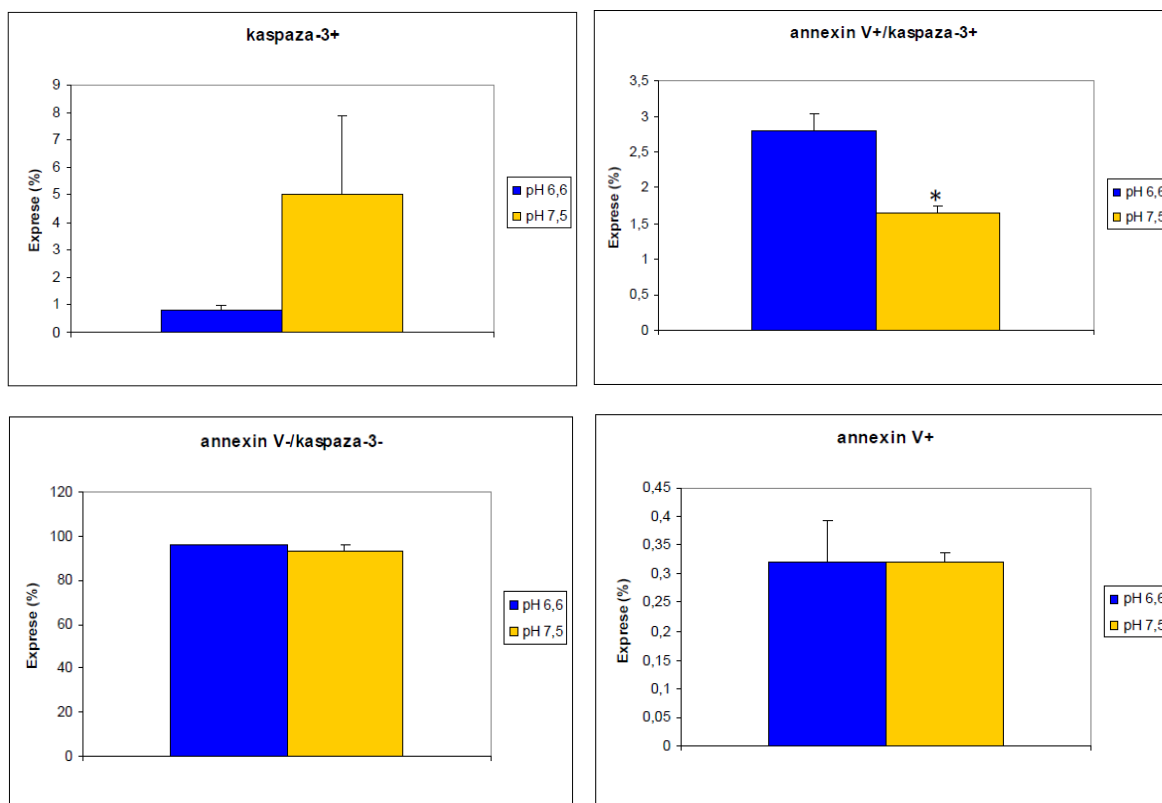
5.8.1 Míra exprese fosfatidylserinu na melanomových buňkách B16-F10 z buněčné kultury v závislosti na pH

Výstupem z průtokového cytometru byla dvoubarevná FACS analýza. Použitý kit (Dual Apoptosis Assay with Nucview 488 Caspase-3 Substrate and CF640R Annexin V) nám umožnil od sebe oddělit buňky neexprimující ani PS ani kaspázu-3 (annexin V-/kaspáza-3-), buňky exprimující pouze PS (annexin V+), buňky exprimující jak PS, tak i kaspázu-3 (annexin V+/kaspáza-3+) a buňky exprimující pouze kaspázu-3 (kaspáza-3+). Na Obr. 18 je uveden jako příklad výstup z analýzy exprese PS na melanomových buňkách B16-F10 z buněčné kultury, kde bylo udržováno pH 7,5.



Obr. 18: Obrázek FACS analýzy exprese fosfatidylserinu na nádorových buňkách B16-F10 se současnou detekcí kaspázy.

Na Obr. 19. jsou zobrazeny grafy vyjadřující míru exprese PS (annexin V+) a kaspázy-3 na melanomových buňkách B16-F10 z buněčné kultury v závislosti na pH (pH 6,6 a pH 7,5). Modře jsou značeny hodnoty při pH 6,6 a žlutě hodnoty při pH 7,5. Z grafu vyplývá, že změna pH nemá žádný vliv na míru exprese fosfatidylserinu na melanomových buňkách B16-F10. Přesné hodnoty počtu buněk i procentuálního zastoupení jsou uvedeny v Tab. II.



Obr. 19: Studium otázky exprese fosfatidylserinu na povrchu nádorových buněk kultivovaných v rozdílném pH (pH 6,6 modrá barva, pH 7,5 žlutá barva) uváděno v procentech.

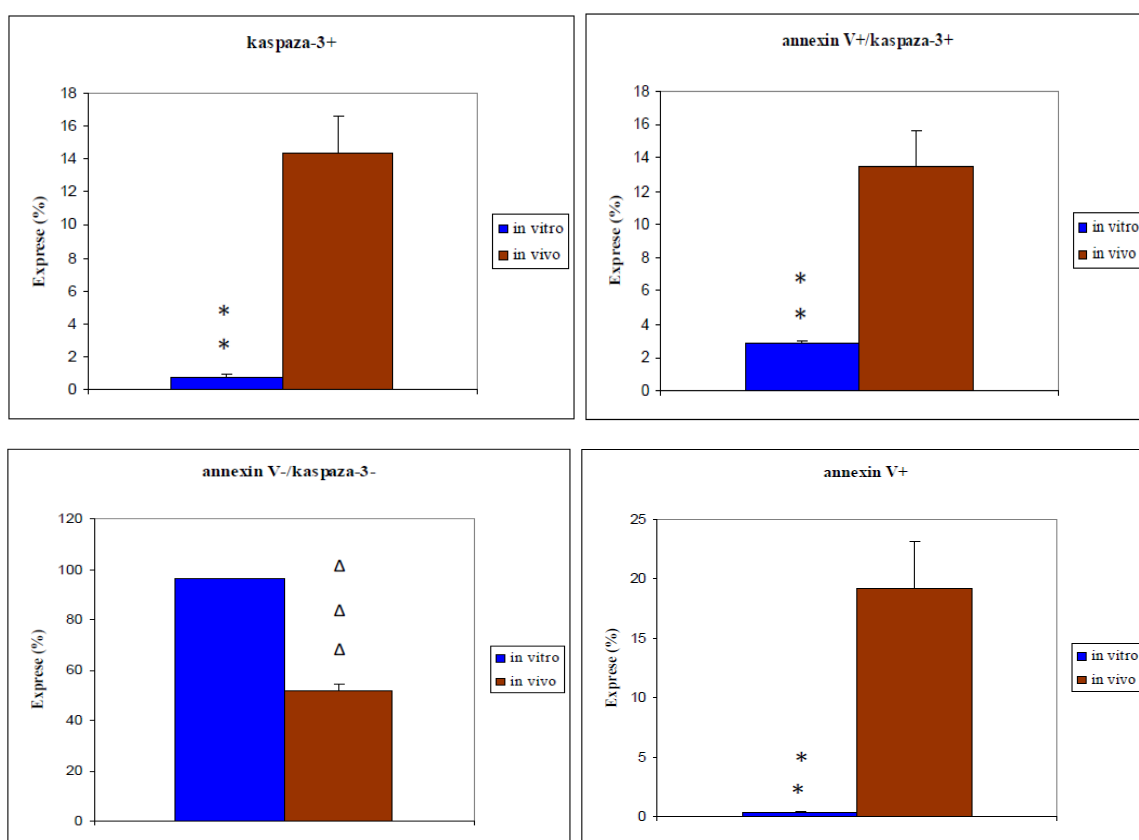
* $P \leq 0,05$ vztaženo k pH 7,5

Tab. II: : Studium otázky exprese fosfatidylserinu na povrchu nádorových buněk kultivovaných v rozdílném pH – absolutní počty + procentuální vyjádření (množství exprimovaných buněk převedeno na společný základ 15 000 singletů).

	pH 6,6 počet buněk na 15 000 singletů (průměr ze 3 vzorků)	(%)	pH 7,5 počet buněk na 15 000 singletů (průměr ze 3 vzorků)	(%)
annexin V+	47	0,31	48	0,32
annexin V+/kaspaza-3+	420	2,8	246	1,65
annexin V-/kaspaza-3-	14409	96,06	13956	93,03
kaspaza-3+	124	0,83	750	5

5.8.2 Porovnání exprese fosfatidylserinu na melanomových buňkách B16-F10 odebraných z buněčné kultury a z prostředí nádoru

Obr. 20 srovnává výsledky exprese fosfatidylserinu na nádorových buňkách odebraných z buněčné kultury a buňkách odebraných z nádoru. Z obrázku vyplývá, že exprese fosfatidylserinu je několikanásobně vyšší u buněk odebraných z nádoru (annexin V+, hnědá barva), než-li u buněk z buněčné kultury (annexin V+, modrá barva). Počet buněk, které exprimovaly kaspazu-3+ byl u buněk z nádoru také výrazně zvýšen oproti buňkám z buněčné kultury. Přesné hodnoty počtu buněk i procentuálního zastoupení jsou uvedeny v Tab. III.



Obr. 20: Porovnání exprese fosfatidylserinu na melanomových buňkách B16-F10 odebraných z buněčné kultury a z prostředí nádoru. *In vitro* (modrá barva), *in vivo* (hnědá barva).

* $P \leq 0,05$ vztaženo k *in vivo*, ** $P \leq 0,01$ vztaženo k *in vivo*, $\Delta \Delta \Delta P \leq$ vztaženo k *in vitro*.

Tab III: Porovnání exprese fosfatidylserinu na melanomových buňkách B16-F10 odebraných z buněčné kultury a z prostředí nádoru - absolutní počty + procentuální vyjádření (množství exprimovaných buněk převedeno na společný základ 15 000 singletů).

	<i>in vitro</i> počet buněk na 15 000 singletů (průměr ze 3 vzorků)	(%)	<i>in vivo</i> počet buněk na 15 000 singletů (průměr ze 3 vzorků)	(%)
annexin V+	47	0,31	2876	19
annexin V+/kaspaza-3+	420	2,8	2015	13
annexin V-/kaspaza-3-	14409	96,06	7953	53
kaspaza-3+	124	0,83	2156	15

6 DISKUZE

Imunoterapie je na rozdíl od chemoterapie či radioterapie šetrnější léčebná metoda, která je založená na aktivaci imunitních systémů těla vlastních. Využívá imunitních mechanismů, které cíleně směřují léčivo do nádorových buněk a tím nejsou zdravé buňky poškozovány. Vzhledem k těmto vlastnostem se můžeme domnívat, že imunoterapie představuje budoucnost v léčbě nádorových onemocnění. V této diplomové práci jsme se zabývali snahou o redukci nádorového růstu prostřednictvím mechanismů vrozené imunity, sloužících k rozpoznání a likvidaci infekčních agens. Naší snahou bylo zacílit fagocytární imunitní atak instalací ligandů fagocytárních receptorů (f-MLF, manan) na nádorové buňky (nespecificky i specificky – na PS) a podpořit tento atak stimulací nádorové infiltrace (LPS, flagelin, R-848), podporou účinnosti vrozené imunity (beta-glukan) a potlačením fagocytární inhibice (anti-CD47). Tato práce navazuje na 31 předešlých diplomových prací, které se rovněž zabývaly nádorovou imunoterapií založenou na využití mechanismů vrozené imunity a řeší otázky, které v těchto pracech zůstaly nezodpovězeny.

V prvním pokuse jsme vycházeli z výsledků předchozích třech projektů prováděných Čunátovou (Čunátová 2012), Vácovou (Vácová 2013) a Caisovou (Caisová 2013) a shrnutých do publikace (Janotová a kol. 2014). Všechny uvedené práce se shodují v tom, že pouze vázané motivy f-MLF na nádorové buňky vyvolávají imunitní odpověď, vedoucí k likvidaci nádorových buněk. K dosažení mohutného účinku bylo nicméně vždy potřeba přidat volný LPS. Toto tvrzení se shoduje se závěry Underhilla a Gantnera (2004) o synergii ligandů a vhodnosti jejich forem. V našem projektu byl f-MLF (ligand fagocytárních FPR receptorů) kotven jiným způsobem, než ve výše uvedených pracích. Byla použita sloučenina f-MLFG5K8 (K(STE))(K(STE))-NH₂. Vlastní ligand (f-MLF) je tedy kotven do cytoplasmatické membrány buněk pomocí dvou řetězců kyseliny stearové. Dosud jsme používali buď kotvení pomocí jednoho řetězce kyseliny olejové, která obsahuje BAM, tedy sloučenina umožňující kotvení látek k membránám, nebo dvou řetězců kyseliny olejové (kotva DOPE), případně pomocí jednoho řetězce kyseliny stearové (Janotová a kol. 2014). Domnívali jsme se, že kotvení pomocí alifatických řetězců dvou stearových kyselin bude pevné (obecně je kotvení pomocí dvou řetězců považováno za stabilnější, než jedním řetězcem). Výsledkem bylo, že takto kotvený f-MLF nefungoval vůbec. Vysvětlením může být, že molekuly použité látky nabyly nevhodné prostorové konfigurace, znemožňující buď

přístup FPR receptorů, nebo kotvení do membrány. Je rovněž možné, že došlo k dimerizaci těchto molekul interakcí alifatických řetězců. Tato otázka však zůstává otevřená.

V tomto pokusu jsme se snažili i o případnou synergii f-MLFG5K8 (K(STE))(K(STE))-NH₂ s flagelinem nebo LPS. Ukázalo se, že flagelin na rozdíl od LPS nevykazoval žádné protinádorové efekty, stejně jako jeho kombinace s f-MLF sloučeninou. Kombinace f-MLF motivu s LPS také nefungovala. Domníváme se, že peptid f-MLFG5K8 (K(STE))(K(STE))-NH₂ vyblokoval terapeutický efekt LPS. Lipopolysacharidy obecně mají šest řetězců mastných kyselin a ty jsou zodpovědné za jejich prozánětlivou aktivitu. Myslíme si, že aktivní část LPS (šest řetězců mastných kyselin) mohla interagovat s alifatickými řetězci kyseliny stearové a tato interakce mohla způsobit nefunkčnost kombinace f-MLF sloučeniny s LPS.

Ve druhém pokusu jsme se snažili o srovnání aplikací beta-glukanu, který jsme aplikovali čtyřmi různými způsoby - perorálně, intraperitoneálně, subkutánně a intratumorálně. Po vypočtení průměrné redukce nádorového růstu jsme zjistili, že nejlépe fungoval perorálně aplikovaný beta-glukan (47,25 %), následně subkutánně aplikovaný beta-glukan (34,09 %), intratumorálně aplikovaný beta-glukan (24,78 %) a nejméně intraperitoneálně aplikovaný beta-glukan (9,69 %). Beta-glukany řadíme mezi výrazné PAMPs, které jsou rozpoznávány specifickými PRRs přítomnými na neutrofilech, makrofázích a NK buňkách. Beta-glukan je rozpoznáván nejen receptory TLR2 a Dectin-1, ale jako nejdůležitější se jeví aktivace komplementového receptoru 3 (CR3) (Větvicka 2014). Xia a kol. (1999) ve své práci zjistili, že systém aktivace CR3 je stejný jak u myši tak i u lidí. Receptor rozpoznává beta-glukany pouze v rozpustné podobě (Stier a kol. 2014) a k jeho aktivaci, dochází v případě, že se na receptor naváže složka komplementu iC3b (Avni a kol. 1998). Mechanismus aktivace CR3 vysvětlil ve své práci Ross a kol. (1999), který tvrdí, že nejdůležitějším efektorovým mechanismem komplementu je opsonizace mikrobiálních patogenů prostřednictvím sérového proteinu C3. Vazbou proteinu C3 jsou do místa výskytu patogena přilákány fagocytující buňky. Patogeny, které aktivují komplement, mají v první fázi na svém povrchu navázány malé fragmenty C3, tzv. C3b fragmenty, které jsou rychle proteolyzovány sérovým faktorem I na iC3b fragmenty. Vazbou iC3b na CR3 jsou aktivovány fagocytující buňky a NK buňky k fagocytóze nebo k cytotoxické degradaci (Ross a kol. 1999). Tento systém degradace funguje nejen u patogenů, ale i u nádorových buněk. Z našich výsledků je zřejmé, že největší vliv na redukci nádorového růstu vykazoval perorálně a subkutánně aplikovaný beta-glukan.

Mechanismus působení beta-glukanů je ten, že beta-glukan je nejprve štěpen makrofágy na rozpustné nízkomolekulární fragmenty. Ty se váží na lektinovou doménu CR3. Jedině takto aktivovaný receptor je schopen vyvolat fagocytózu a likvidaci iC3b opsonizovaných buněk (Větvíčka a kol. 1999).

V tomto pokusu jsme navíc zkoušeli, jaký je účinek beta-glukanu v kombinaci s mannan-BAM. Opět jsme zkoušeli čtyři způsoby aplikace a po vypočtení průměrné redukce nádorového růstu jsme zjistili, že nejlépe fungoval intraperitoneálně aplikovaný beta-glukan v kombinaci s 0,2 mM mannan-BAM (70,94 %), následně perorálně aplikovaný beta-glukan v kombinaci s 0,2 mM mannan-BAM (60,56 %), intratumorálně aplikovaný beta-glukan v kombinaci s 0,2 mM mannan-BAM (56,8 %) a nejméně subkutánně aplikovaný beta-glukan v kombinaci s 0,2 mM mannan-BAM (52,55 %). Z výsledků vyplývá, že obě dvě terapeutické látky fungují, ale jejich kombinace nepůsobí v synergii. Dohromady dávají pouze aditivitu. Tyto výsledky před nás postavily dvě důležité otázky – Proč funguje dobře samotný beta-glukan? Proč funguje dobře samotný mannan-BAM? Na otázku, proč beta-glukan působí sám, nám odpověděla práce Yana a kol. (1999). Z jeho pokusu vyplývá, že normální myši sérum obsahuje nízké hladiny protilátek reaktivních se syngenní nebo alogenní nádorovou linií. Tyto protilátky aktivují komplement klasickou cestou, což vede k opsonizaci povrchu nádorových buněk iC3b fragmenty. Z jeho experimentů vyplývá, že podávání rozpustného beta-glukanu s vysokou afinitou k CR3 vykazovalo u myši 57- 90% redukci nádorového růstu (Yan a kol. 1999). Námí podávaný beta-glukan po rozštěpení aktivoval CR3 neutrofilů, makrofágů i NK buněk. Tyto buňky pak prostřednictvím aktivovaného CR3 byly schopny atakovat iC3b opsonizované nádorové buňky.

Na otázku proč vůbec funguje samotný mannan-BAM odpověděla práce Janotové a kol. (2014). Manóza funguje jako agonista fagocytárních receptorů. Terminální manóza mananu je rozpoznána nejen prostřednictvím manózového receptoru vyskytujícího se převážně na makrofázích, ale především dochází k vazbě manan binding lektinu (MBL) a tím k aktivaci komplementu lektinovou cestou (Janotová a kol. 2014). Výsledkem je opsonizace na úrovni iC3b. Beta-glukan je vždy alespoň z malé části přítomen v potravě a tak se přirozenou cestou dostává do těla. Jeho fragmenty (po působení makrofágů) aktivují CR3 buňky vrozené imunity a ty pak napadají iC3b opsonizované nádorové buňky.

Je tedy zřejmé, že beta-glukan i mannan-BAM jsou schopny fungovat samostatně a zesílit účinek, kterým buňky vrozené imunity atakují nádorové buňky. Jejich kombinací se nám podařilo dosáhnout aditivního efektu a to ještě ne ve všech případech. Na rozdíl od velmi účinné synergie kombinace TLR stimulace (LPS) s aplikací mannan-BAM

(Janotová a kol. 2014) zde společné působení nebylo tak účinné. Důvod spatřujeme v tom, že působením beta-glukanu došlo jen k zlepšení vazebných schopností buněk na základě zvýšení aktivity CR3 a že nebylo nic učiněno pro navození mohutné nádorové infiltrace, ke které působením LPS dochází.

V rámci třetího pokusu jsme se snažili specificky kotvit fagocytární motiv f-MLFKKK14AK na nádorové buňky a zkoumat jeho vliv na redukci nádorů. Jako specifickou kotvu jsme použili vazebnou sekvenci FNFRLKAGAKIRFG s velkou afinitou k fosfatidylserinu. Z našich výsledků vyplývá, že intratumorální aplikací f-MLFKKK14AK nebyla dosažena statisticky významná redukce nádorů. Dále jsme zjistili, že ani kombinace f-MLFKKK14AK s LPS nevykazuje žádnou statisticky významnou redukci nádorů. Naši snahou bylo navázat na projekty, které dělali Pačes (2013) a Folkmanová (2014), pouze jsme zaměnili spacer. Pačes a Folkmanová ve svých projektech používali peptid f-MLF-G₅-14AK, který sám o sobě vykazoval redukci nádorů, a v kombinaci s LPS byla tato redukce statisticky významná. Pravděpodobným vysvětlením proč peptid f-MLFKKK14AK nefungoval, je spacer KKK (lysin), který jsme v našem pokusu používali. Tímto spacerem byl nahrazen spacer (G₅), který ve svých projektech používal jak Pačes, tak i Folkmanová. Ukázalo se, že i samotný spacer, který spojuje fagocytární motiv (f-MLF) s vazebným motivem (14 aminokyselinová sekvence), může mít vliv na výslednou použitelnost terapeutika. Zda pozměněná konformace se projevila znesnadněním vazby FPR receptorů, či vazby na fosfatidylserin zůstává otevřené pro další výzkum.

V posledním *in vivo* pokusu jsme se snažili použít anti CD47 aptamer v nádorové terapii. Navíc jsme zkoušeli jeho kombinaci s R-848, f-MLF a mannan-BAM. Z výsledků je zřejmé, že blokace anti CD47 aptamerem nefungovala a veškeré terapeutické výsledky byly dány samotným R-848 a jeho kombinací s mannan-BAM. Tyto výsledky odpovídají výsledkům ostatních studentů (Ženka, ústní sdělení). Navíc byla zkoušena terapie prostřednictvím protilátky anti CD47, jejíž účinek také nefungoval (Uher, ústní sdělení). Naše snaha o blokaci molekuly CD47, která funguje u nádorových buněk jako „don't eat me“ signál, a která tak chrání nádorové buňky před útokem fagocytů, nefungovala. Výsledky pokusu jsou v rozporu s výsledky Chaa a kol. (2012). Chao a kol. tvrdí, že makrofágy a ostatní fagocytující buňky hrají klíčovou roli v regulaci nádorového růstu. Ve své práci vysvětlili, že fagocytóza nádorových buněk může být vyvolána prostřednictvím blokace dráhy CD47-SIRPα pomocí anti CD47 protilátek. Výsledkem experimentů bylo zjištění,

že CD47 protilátky dokáží odstranit nádorové buňky prostřednictvím několika mechanismů: (1) CD47 protilátky umožňují fagocytózu nádorových buněk tím, že se naváží na molekuly CD47 na nádorových buňkách. Touto blokadou je zamezena ligace SIRP α exprimovaného fagocyty. (2) CD47 protilátky jsou schopné eliminovat nádorové buňky prostřednictvím Fc-dependentních mechanismů, které zahrnují ADCC (na protilátkách závislá buněčná cytotoxicita) a CDC (na komplementu závislá cytotoxicita). (3) CD47 protilátky mohou eliminovat nádorové buňky prostřednictvím přímé indukce apoptózy. Toto zjištění potvrdily jak *in vivo*, tak *in vitro* pokusy. (4) CD47 protilátky aktivují nejen makrofágy, ale i endritické buňky, které následně prezentují nádorové antigeny T lymfocytům a tím je aktivována specifická imunitní odpověď (Chao a kol. 2012). V našich experimentech jsme jako laboratorní zvířata používali myši C57BL/6N, kdežto Chao a kol. pracovali s imunodeficientními kmeny myší. Je však obtížné si představit, jak tento fakt mohl výsledky pokusu ovlivnit. Možným vysvětlením je, že námi používaný aptamer má ve srovnání s protilátkami jen poloviční účinnost (Chao a kol. 2012). Rovněž protilátka byla aplikována jen třikrát (Uher, ústní sdělení). Jako nejpravděpodobnější vysvětlení slabého působení však uvažujeme fakt, že pracujeme s vysoce agresivním a velmi rychle rostoucím melanomem B16-F10, kde blokace CD47 zřejmě nepřináší dostatečný efekt.

V následujících *in vitro* pokusech jsme se snažili prostřednictvím průtokové cytometrie zjistit množství exprese fosfatidylserinu na povrchu nádorových buněk. Hlavními důvody, proč jsme se zaměřili na PS, jsou: 1) Výskyt PS u nádorové buňky na vnější straně plasmatické membrány přímo vybízí k navázání léčiva. 2) Absence PS na vnější straně plasmatické membrány u zdravých buněk, jeho zvýšená exprese souvisí především s apoptózou, což z hlediska terapeutického nepřináší žádné problémy. 3) PS se na vnější straně plasmatické membrány vyskytuje ve vysokém množství (až 3×10^6 PS/buňku) (Ran a Thorpe 2002). Z experimentů prováděných Riedlem a kol. (2011) vyplývá, že PS může sloužit jako jednotný marker nádorových buněk a metastáz.

Detekci PS nám umožňuje Annexin V, který je hojně používán pro označení buněk vstupujících do apoptózy (Cen a kol. 2008). PS se totiž během apoptózy objevuje na vnější straně plasmatické membrány a signalizuje tak fagocytujícím buňkám, že buňka umírá a má být fagocytována (Kay a Grisntein 2011). Samotný mechanismus apoptózy je velmi složitý a sofistikovaný proces. Z výsledků experimentu Igney a Krammera (2002) plyne, že existují dvě hlavní dráhy aktivace apoptické kaskády – vnější dráha a vnitřní dráha

aktivace. A je zřejmé, že obě tyto dráhy jsou navzájem propojené. Poté co je aktivována vnitřní a vnější dráha apoptózy, dochází k aktivaci kaspáz, které mají hlavní roli v apoptické kaskádě. Kaspázy patří do rodiny proteáz, které mají cystein v aktivním místě a které štěpí peptidovou vazbu specificky za aspartátem. Kaspázy mají hned několik funkcí – aktivují cytoplazmatické endonukleázy, které degradují jaderný materiál, a proteázy, které rozkládají jaderné a cytoskeletární proteiny. Kaspáza-3, kaspáza-6 a kaspáza-7 štěpí různé substráty včetně cytokeratinů, PARP, plazmatické membrány cytoskeletu, jaderného proteinu NuMA a jiné, což v konečném důsledku způsobuje morfologické a biochemické změny pozorované u apoptotických buněk (Slee a kol. 2001). Kaspáza-3 je považována za nejdůležitější ze všech kaspáz. Její aktivaci zajišťují jiné druhy kaspáz (kaspáza-8, kaspáza-9 nebo kaspáza-10) (Sakahira a kol. 1998). Z výzkumu prováděného Mandalem a kol. (2005) je zřejmé, že kaspáza-3 a kaspáza-8 jsou zahrnuty v regulaci externalizace PS na normálních zdravých buňkách. Mechanismu externalizace PS na nádorových buňkách není doposud zcela pochopen (Mandal a kol. 2005).

Používaný kit obsahoval dva základní markery apoptózy (Nucview 488 Caspase-3 Substrate a CF640R Annexin V). Oba dva markery nám pomohly profilovat apoptické buňky a studovat vztah mezi dvěma důležitými ději při apoptóze – aktivaci kaspázy-3+ a translokaci PS. Nejsme si však jisti, zda populaci nádorových buněk s aktivovanou kaspázou a translokovaným PS lze označit za buňky apoptotické, když k základním vlastnostem nádorových buněk patří mutace v apoptotické kaskádě a tím i neschopnost přechodu do apoptózy (Hanahan a Weinberg 2011). Obecně platí, že apoptické buňky externalizují PS na povrchu plazmatické membrány, který je následně rozpoznán makrofágy nebo dendritickými buňkami. Nicméně nádorové buňky, přestože exprimují na svém povrchu PS ve vysoké míře, používají takové mechanismy, kterými obcházejí apoptózu a jsou před fagocytujícími buňkami maskovány (Riedl a kol. 2011).

In vitro pokus nesoucí název "Míra exprese fosfatidylserinu na melanomových buňkách B16-F10 z buněčné kultury v závislosti na pH" byl prováděn na základě výsledků Rana a Thorpeho (2002), kteří se ve svém projektu snažili zjistit, zda externalizace PS může být indukována na zdravých endoteliálních buňkách v tkáňové kultuře podmínkami přítomnými v mikroprostředí nádoru. Z jejich výsledků vyplývá, že podmínkami, která charakterizují mikroprostředí nádoru, byli schopni vyvolat externalizaci PS na endoteliálních buňkách (Ran a Thorpe 2002). U nádorových buněk je situace odlišná. To nám ukazují výsledky na Obr. 19, ze kterých je zřejmé, že změna pH nemá žádný vliv na míru exprese fosfatidylserinu na melanomových buňkách B16-F10. Navíc si můžeme

všimnout, že míra exprese fosfatidylserinu na nádorových buňkách byla téměř minimální (0,31 % u pH 6,6 a 0,32 % u pH 7,5). Stejných výsledků dosahovaly pokusy Jalovecké (Ženka, ústní sdělení) a Sawady a kol. (2004).

Z druhého *in vitro* pokusu vyplývá, že exprese fosfatidylserinu je několikanásobně vyšší u buněk odebraných z nádoru, než-li u buněk z buněčné kultury. Domníváme se, že na vyšší expresi PS může mít vliv imunitní systém, nebo se zde uplatňuje vliv mikroprostředí nádoru. Mikroprostředí v nádorech se fyziologicky liší od normálních tkání. Je charakterizováno nízkým (hypoxie) až nedostatečným (anoxie) zásobením tkání kyslíkem, deprivací živin a energie, vysokou hladinou laktátu a extracelulární acidózou (Vapuel 2004). Dalším důvodem může být i vliv stresu působícího na buňky při zpracování nádoru. Jak uvádí ve své práci Riedl a kol. (2011) stres působící na nádorové buňky vyvolává zvýšenou exprese PS, stejně tak nevratné poškození membrány buňky má za následek zvýšení exprese PS. Působení stresového faktoru se budeme snažit vyloučit v plánovaných pokusech.

7 ZÁVĚR

- Fagocytární motiv f-MLFG5K8 (K(STE))(K(STE))-NH₂ nevykazoval žádné protinádorové efekty a ani současná TLR signalizace pomocí LPS respektive flagelinu nevyústila v protinádorový efekt. Tyto výsledky ukázaly na význam volby vhodného membránového kotvení ligandů.
- Při podávání samotného beta-glukanu má největší vliv na redukci nádorového růstu jeho perorální a subkutánní aplikace. Kombinace beta-glukanu s i.t. aplikovaným mannan-BAM vykazovala největších protinádorových efektů, když byl beta-glukan aplikován intraperitoneálně. Snaha o synergii beta-glukanu s mannan-BAM nebyla dosažena. Jediným pozorovaným jevem byla aditivita.
- Fagocytárním motivem f-MLFKKK14AK a ani jeho kombinací s LPS nebyla dosažena žádná statisticky významná redukce nádorového růstu. Ukázalo se, že samotný spacer může negativně ovlivnit prezentaci fagocytárního motivu.
- Blokace molekuly CD47 na nádorových buňkách B16-F10 prostřednictvím anti CD47 aptameru neměla žádný vliv na nádorový růst ani na terapii založenou na instalaci ligandů fagocytárních receptorů na nádorové buňky.
- Změna pH nemá žádný vliv na míru exprese fosfatidylserinu na melanomových buňkách B16-F10.
- Míra exprese fosfatidylserinu na buňkách melanomu B16-F10 v kultuře není nijak vysoká.
- Exprese fosfatidylserinu je několikanásobně vyšší u buněk odebraných z nádoru, než-li u buněk z buněčné kultury.

8 POUŽITÁ LITERATURA

- Akira, S., Uematsu, S. & Takeuchi, O. (2006). Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell Press*, 124, 783-801p.
- Akira, S. & Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nature reviews. Immunology*, 4, 499-511p.
- Avni, O., Pur, Z., Yefenof, E. & Baniyash, M. (1998). Complement Receptor 3 of Macrophages Is Associated with Galectin-1-Like Protein. *The Journal of Immunology*, 160, 6151-6158p.
- Baba, A. I. & Cătoi, C. (2007). Comparative oncology. *Publishing House of the Romanian Academy*, 787p.
- Bandarchi, B., Ma, L., Navab, R., Seth, A. & Rasty, G. (2010). From melanocyte to metastatic malignant melanom. *Dermatology Research and Practise*, 7, 1-8p.
- Baumgartner, J. M., Palmer, B. E., Banerjee, A. & McCarter, M. D. (2008). Role of Melanoma Secreted Thrombospondin-1 on Induction of Immunosuppressive Regulatory T Cells through CD47. *Journal of Cancer Molecules*, 4, 145-152p.
- Becker, E. L., Farouhar, F. A., Grunnet, M. L., Boulay, F., Tardif, M., Bormann, B. J., Sodja, D., Ye, R. D. & Woska, J. R. Jr. (1998). Broad immunocytochemical localization of the formylpeptide receptor in human organs, tissues, and cells. *Cell and Tissue Research*, 292, 129-135p.
- Bianchi, M. E. (2007). DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *Journal of Leukocyte Biology*, 81, 1-5p.
- Bokoch, G. M. & Gilman, A. G. (1984). Inhibition of receptor-mediated release of arachidonic acid by pertussis toxin. *Cell*, 39, 301-308p.
- Brash, D. E., Rudolph, J. A., Simon, J. A., Lin, A., McKenna, G. J., Baden, H. P., Halperin, A. J. & Ponten, J. (1991). A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Science*, 88, 10124-10128p.
- Bronson, S. R. (1967). Hypophysectomy as Palliative Treatment. *Jama*, 200, 974-975p.
- Buckland, A. G. & Wilton, D. C. (2000). Anionic phospholipids, interfacial binding and the regulation of cell functions. *Biochimica et biophysica acta*, 1483, 199-216p.
- Caisová, V. (2013). Použití agonistů FPR receptorů pro terapii nádorových onemocnění. Diplomová práce, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, České Budějovice.
- Carpentier, A., Laigle-Donadey, F., Zohar, S., Capelle, L., Behin, A., Tibi, A., Martin-Duverneuil, N., Sanson, M., Lacomblez, L., Taillibert, S., Puybasset, L., Van Effenterre, R., Dellattre, J. Y. & Carpentier, A. F. (2006). Phase 1 trial of a CpG oligodeoxynucleotide for patients with recurrent glioblastoma. *Neuro-Oncology*, 8, 60-66p.

- Cawley, T. N. & Ballou, C. E. (1972). Identification of Two *Saccharomyces cerevisiae* Cell Wall Mannan Chemotypes. *Journal of Bacteriology*, 111, 690-695p.
- Cen, H., Mao, F., Aronchik, I., Fuentes, R. J. & Firestone, G. L. (2008). DEVD-NucView488: a novel class of enzyme substrates for real-time detection of caspase-3 activity in live cells. *FASEB journal*, 22, 2243-2252p.
- Chao, M. P., Weissman, I. L. & Majeti, R. (2012). The CD47-SIRP α Pathway in Cancer Immune Evasion and Potential Therapeutic Implications. *Current Opinion in Immunology*, 24, 225-232p.
- Coats, S. R., Pham, T. T., Bainbridge, B. W., Reife, R. A. & Darveau, R. P. (2005). MD-2 Mediates the Ability of Tetra-Acylated and Penta-Acylated Lipopolysaccharides to Antagonize *Escherichia coli* Lipopolysaccharide at the TLR4 Signaling Complex1. *The Journal of Immunology*, 175, 4490-4498p.
- Čechová, M. (2011). Studium možnosti ovlivnění metastázování pomocí proenzymoterapie. Diplomová práce, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, České Budějovice.
- Čunátová, Š. (2012). Ověření možnosti terapie nádorových onemocnění pomocí kotvení formylmethioninových derivátů na povrch nádorových buněk. Bakalářská práce, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, České Budějovice.
- Damsky, W. E. Jr. & Bosenberg, M. (2010). Mouse melanoma models and cell lines. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 23, 853-859p.
- Dzivenu, O. K., Phil, D. & O'Donnell-Tormey, J. (2003). Cancer and the immune system: The Vital Connection. *Cancer Research Institute*, 1-45p.
- Eedy, D. J. (2003). Surgical treatment of melanoma. *British Journal of Dermatology*, 149, 2-12p.
- Elhelu, M. A. (1983). The Role of Macrophages in Immunology. *Journal of the National Medical Association*, 75, 314-317p.
- Erridge, C., Bennett-Guerrero, E. & Poxton, I. R. (2002). Structure and function of lipopolysaccharides. *Microbes and Infection*, 4, 837-851p.
- Figdor, C. G., van Kooyk, Y. & Adema, G. J. (2002). C-type lectin receptors on dendritic cells and langerhans cells. *Nature Reviews Immunology*, 2, 77-84p.
- Folkmanová, M. (2014). Targetovaná terapie melanomu B16-F10. Bakalářská práce, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, České Budějovice.
- Frei, E. (1985). Curative cancer chemotherapy. *Cancer Research*, 45, 6523-6537p.
- Gantner, B. N., Simmons, R. M., Canavera, S. J., Akira, S. & Underhill, D. M. (2003). Collaborative Induction of Inflammatory Responses by Dectin-1 and Toll-like Receptor 2. *The Journal of Experimental Medicine*, 197, 1107-1117p.
- Garred, P., Larsen, F., Seyfarth, J., Fujita, R. & Madsen, H. O. (2006). Mannose-binding lectin and its genetic variants. *Genes and Immunity*, 7, 85-94p.

Giardini, S. E., Boneca, I. G., Carneiro, L. A., Antignac, A., Jéhanno, M., Viala, J., Tedin, K., Taha, M. K., Labigne, A., Zähringer, U., Coyle, A. J., DiStefano, P. S., Bertin, J., Sansonetti, P. J. & Philpott, D. J. (2003). Nod1 Detects a Unique Muropeptide from Gram-Negative Bacterial Peptidoglycan. *Science*, 300, 1584-1587p.

Giuliani, S., Santicioli, P., Tramontana, M., Geppetti, P. & Maggi, C. A. (1991). Peptide N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (FMLP) activates capsaicin-sensitive primary afferent nerves in guinea-pig atria and urinary bladder. *British Journal of Pharmacology*, 102, 730-734p.

Glaserová, S. (2012). Studium terapie melanomu B16-F10 pomocí aplikace LPS. Diplomová práce, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, České Budějovice.

Hanahan, D. & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Elsevier Inc.*, 144, 646-674p.

Hattermann, K., Picard, S., Borgeat, M., Leclerc, P., Pouliot, M. & Borgeat, P. (2007). The Toll-like receptor 7/8-ligand resiquimod (R-848) primes human neutrophils for leukotriene B₄, prostaglandin E₂ and platelet-activating factor biosynthesis. *FASEB journal*, 21, 1575-1585p.

Hayashi, F., Smith, K. D., Ozinsky, A., Hawna, T. R., Yi, E. C., Goodlett, D. R., Eng, J. K., Akira, S., Underhill, D. M. & Aderem, A. (2001) The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*, 410, 1099-1103p.

He, H. Q., Liao, D., Wang, Z. G., Wang, Z. L., Zhou, H. Ch., Wang, M. W. & Richard, D. Y. (2013). Functional Characterization of Three Mouse Formyl Peptide Receptors. *Molecular Pharmacology*, 83, 389-398p.

Hemminki, K. (1993). DNA adducts, mutations and cancer. *Carcinogenesis*, 14, 2007-2012p.

Hobohm, U., Stanford, J. L. & Grange, J. M. (2008). Pathogen-Associated Molecular Pattern in Cancer Immunotherapy. *Critical Reviews in Immunology*, 28, 95-107p.

Hong, F., Hansen, R. D., Yan, J., Allendorf, D. J., Baran, J. T., Ostroff, G. R. & Ross, G. D. (2003). Beta-glucan functions as an adjuvant for monoclonal antibody immunotherapy by recruiting tumoricidal granulocytes as killer cells. *Cancer research*, 63, 9023-9031p.

Hořejší, V. & Bartůňková, J. (2009). Základy imunologie, 4. vydání. Triton, Praha. 316p.

Cherfils-Vicini, J., Platonova, S., Gillard, M., Laurans, L., Validire, P., Caliandro, R., Magdeleinat, P., Mami-Chouaib, F., Dieu-Nosjean, M. C., Fridman, W. H., Damotte, D., Sautès-Fridman, C. & Cremer, I. (2010). Triggering of TLR7 and TLR8 expressed by human lung cancer cells induces cell survival and chemoresistance. *The Journal of Clinical Investigation*, 120, 1285-1297p.

Chow, J. C., Young, D. W., Golenbock, D. T., Christ, W. J. & Gusovsky, F. (1999). Toll-like Receptor-4 Mediates Lipopolysaccharide-induced Signal Transduction. *The Journal of Biological Chemistry*, 274, 10689-10692p.

- Igney, F. H. & Krammer, P. H. (2002). Immune escape of tumors: apoptosis resistance and tumor counterattack. *Journal of Leukocyte Biology*, 71, 907-920p.
- Igney, F. H. & Krammer, P. H. (2002). Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nature reviews. Cancer*, 2, 77-88p.
- Ikeda, K., Sannoh, T., Kawasaki, N., Kawasaki, N. & Yamashina, I. (1987). Serum lectin with known structure activates complement through the classical pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 262, 7451-7454p.
- Iwasaki, A. & Medzhitov, R. (2004). Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nature Immunology*, 5, 987-995p.
- Janeway, Ch. A. Jr. & Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annual Review of Immunology*, 20, 197-216p.
- Janotová, T., Jalovecká, M., Auerová, M., Švecová, I., Bruzlová, P., Maierová, V., Kumžáková, Z., Čunátová, Š., Vlčková, Z., Caisová, V., Rozsypalová, P., Lukáčová, K., Vácová, N., Wachtlová, M., Salát, J., Lieskovská, J., Kopecký, J. & Ženka, J. (2014). The Use of Anchored Agonists of Phagocytic Receptors for Cancer Immunotherapy: B16-F10 Murine Melanoma Model. *PLoS ONE*, 9.
- Kay, J. G. & Grinstein, S. (2011). Sensing Phosphatidylserine in Cellular Membranes. *Sensors*, 11, 1744-1755p.
- Kohidai, L., Török, K., Illyés, E., Tamási, J., Sebestyén, F., Láng, O., Csaba, G. & Hudecz, F. (2003). Characterization of chemotactic ability of peptides containing N-formyl-methionyl residues in Tetrahymena fMLP as a targeting ligand. *Cell Biology International*, 23, 695-700p.
- Koch, A., Melbye, M., Sørensen, P., Homøe, P., Madsen, H. O., Mølbak, K., Hansen, Ch., Andersen, L. H., Hahn, G. W. & Garred, P. (2001). Acute respiratory tract infections and mannose-binding lectin insufficiency during early childhood. *JAMA*, 285, 1316-1321p.
- Larangé, A., Antoios, D., Pallardy, M. & Kerdine-Römer, S. (2009). TLR7 and TLR8 agonists trigger different signaling pathways for human dendritic cell maturation. *Journal of leukocyte biology*, 85, 673-683p.
- Le, Y., Li, B., Gong, W., Shen, W., Hu, J., Dunlop, N. M., Oppenheim, J. J. & Wang, J. M. (2000). Novel pathophysiological role of classical chemotactic peptide receptors and their communications with chemokine receptors. *Immunological Reviews*, 177, 185-194p.
- Le, Y., Murphy, P. M. & Wang, J. M. (2002). Formyl-peptide receptors revisited. *Trends in Immunology*, 23, 541-548p.
- Le, Y., Oppenheim, J. J. & Wang, J. M. (2001). Pleiotropic roles of formyl peptide receptors. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 12, 91-105p.
- LeBien, T. W. & Tedder, T. F. (2008). B lymphocytes: how they develop and function. *Blood*, 112, 1570-1580p.

- Lee, S. H., Weng, X. W., Flatten, K. S., Loegering, D. A. & Kaufmann, S. H. (2013). Phosphatidylserine exposure during apoptosis reflects bidirectional trafficking between plasma membrane and cytoplasm. *Cell Death and Differentiation*, 20, 64-76p.
- Li, J., Piao, Y. F., Juang, Z. & Chen, L. (2009). Silencing of signal transducer and activator of transcription 3 expression by RNA interference suppresses growth of human hepatocellular carcinoma in tumor-bearing nude mice. *World Journal of Gastroenterology*, 15, 2602-2608p.
- Lien, E., Sellati, T. S., Yoshimura, A., Flo, T. H., Rawadi, G., Finberg, R. W., Carroll, J. D., Espevik, T., Ingalls, R. R., Radolf, J. D. & Golenbock, D. T. (1999). Toll-like Receptor 2 Functions as a Pattern Recognition Receptor for Diverse Bacterial Products. *The Journal of Biological Chemistry*, 274, 33419-33425p.
- Looney, W. B., Ritenour, E. R. & Hopkins, H. A. (1980). Changes in Growth Rate of an Experimental Solid Tumor Following Increasing Doses of Cyclophosphamide. *The Journal of Cancer Research (1916 – 1930)*, 40, 2179-2183p.
- Lu, Y. C., WC, Y. & PS, O. (2008). LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*, 42, 145-151p.
- Ludgate, Ch. M. (2012). Optimizing Cancer Treatments to Induce an Acute Immune Response: Radiation Abscopal Effects, PAMPs, and DAMPs. *Clinical Cancer Research*, 18, 4522p.
- Lutz, H. U. (2013). Comment concerning the role of CD47 and signal regulatory protein alpha regulating the clearance of aged red blood cells. *Transfusion Medicine and Chemotherapy*, 40, 140-141p.
- Mandal, D., Mazumder, A., Das, P., Kundu, M. & Basu, J. (2005). Fas-, caspase-8-, and caspase-3-dependent signaling regulates the activity of the aminophospholipid translocase and phosphatidylserine externalization in human erythrocytes. *The Journal of biological chemistry*, 280, 39460–39467p.
- Martin, S. J., Reutelingsperger, C. P., McGahon, A. J., Rader, J. A., van Schie, R. C., LaFace, D. M., & Green, D. R. (1995). Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *The Journal of experimental medicine*, 182, 1545-1556p.
- Martinez-Pomares, L. (2012). The mannose receptor. *Journal of Leukocyte Biology*, 92, 1177-1186p.
- Matsushita, M., Thiel, S., Jensenius, J. C., Terai, I. & Fujita, T. (2000). Proteolytic activities of two types of mannose-binding lectin-associated serine protease. *Journal of Immunology*, 165, 2637-2642p.
- McLaughlin, M. E. & Munger K. (2009). Virus Associated with Human Cancer. *National Institutes of Health Public Access*, 1782, 127-150p.
- Medzhitov, R. & Janeway, Ch. A. Jr. (2002). Decoding the Patterns of Self and Nonself by the Innate Immune System. *Science*, 296, 298-300p.

- Melief, C. J. (2008). Cancer immunotherapy by dendritic cells. *Immunity*, 29, 372-383p.
- Nakamura, K., Yoshikawa, N., Yamauchi, Y., Kagota, S., Shinozuka, K. & Kunitomo, M. (2002). Characterization of mouse melanoma cell lines by their mortal malignancy using an experimental metastatic model. *Life Science*, 70, 791-798p.
- Oblak, A. & Jerala, R. (2011). Toll-Like Receptor 4 Activation in Cancer Progression and Therapy. *Clinical and Developmental Immunology*, 2011, 1-12p.
- Old, L. J. & Chen, Y. T. (1998). New Paths in Human Cancer Serology. *The Journal of Experimental Medicine*, 187, 1163-1167p.
- Pačes, J. (2013). Nádorová imunoterapie založená na použití ligandů fagocytárních receptorů vázajících se specificky na nádory. Bakalářská práce, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, České Budějovice.
- Paterson, D. L. & Patel, A. (1998). Bacillus Calmette-Guerin (BCG) immunotherapy for bladder cancer: review of complications and their treatment. *The Australian and New Zealand journal of surgery*, 68, 340-344p.
- Philipps, C., McMillan, M., Flood, P. M., Murphy, D. B., Forman, J., Lancki, D., Womack, J. E., Goodenow, R. S. & Schreiber, H. (1985). Identification of a unique tumor-specific antigen as a novel class I major histocompatibility molecule. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82, 5140-5144p.
- Prossnitz, E. R. & Ye, R. D. (1997). The N-formyl peptide receptor: A model for the study of chemoattractant receptor structure and function. *Pharmacology & Therapeutics*, 74, 73-102p.
- Raetz, Ch. R. H. & Whitfield, Ch. (2002). Lipopolysaccharide Endotoxins. *Annual Review of Biochemistry*, 71, 635-700p.
- Ran, S. & Thorpe, P. E. (2002). Phosphatidylserine is a marker of tumor vasculature and a potential target for cancer imaging and therapy. *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 54, 1479-1484p.
- Riedl, S., Rinner, B., Asslaber, M., Schaidler, H., Walter, S., Novak, A., Lohner, K. & Zwegg, D. (2011). In search of a novel target — Phosphatidylserine exposed by non-apoptotic tumor cells and metastases of malignancies with poor treatment efficacy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1808, 2638-2645p.
- Ringer, D. P. & Schniper, L. E. (2001). Principles of Cancer Biology. *Clinical Oncology*, 25-30p.
- Ross, G. D., Větvička, V., Yan, J., Xia, Y. & Větvičková, J. (1999). Therapeutic intervention with complement and beta-glucan in cancer. *Immunopharmacology*, 42, 61-74p.
- Sakahira, H., Enari, M. & Nagata, S. (1998). Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature*, 391, 96-99p.

Sawada, N., Kataoka, K., Kondo, K., Arimochi, H., Fujino, H., Takahashi, Y., Miyoshi, T., Kuwahara, T., Monden, Y. & Ohnishi, Y. (2004). Betulinic acid augments the inhibitory effects of vincristine on growth and lung metastasis of B16F10 melanoma cells in mice. *British Journal of Cancer*, 90, 1672-1678p.

Sebag-Montefiore, D., Stephens, R. J., Monson, J., Grieve, R., Khanna, S., Quirke, P., Couture, J., de Metz, C., Myint, A. S., Bessell, E., Griffiths, G., Thompson, L. C. & Parmar, M. (2009). Preoperative radiotherapy versus selective postoperative chemoradiotherapy in patients with rectal cancer (MRC CR07 and NCIC-CTG C016): a multicentre, randomised trial. *The Lancet*, 373, 811-820p.

Schiffmann, E., Corcoran, B. A. & Wahl, S. M. (1975). N-Formylmethionyl Peptides as Chemoattractants for Leucocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72, 1059-1062p.

Schwandner, R., Dziarski, R., Wesche, H., Rothe, M. & Kirschning, C. J. (1999). Peptidoglycan- and Lipoteichoic Acid-induced Cell Activation Is Mediated by Toll-like Receptor 2. *The Journal of Biological Chemistry*, 274, 17406-17409p.

Sick, E., Jeanne, A., Schneider, C., Dedieu, S., Takeda, K. & Martiny, L. (2012). CD47 update: a multifaceted actor in the tumour microenvironment of potential therapeutic interest. *British journal of pharmacology*, 167, 1415-1430p.

Slee, E. A., Adrian, C. & Martin, S. J. (2001). Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *The Journal of biological chemistry*, 276, 7320-7326p.

Smallbone, K., Gatenby, R. A., Gillies, R. J., Mainia, P. K. & Gavaghan, D. J. (2007). Metabolic changes during carcinogenesis: Potential impact on invasiveness. *Journal of Theoretical Biology*, 244, 703-713p.

Sompayrac, L. (1999). *How the Immune System Works*, 4th edition. Blackwell Science, 152p.

Springer, T. A. (1990). Adhesion receptors of the immune system. *Nature*, 346, 425-434p.

Steiner, T. S. (2007). How Flagellin and Toll-Like Receptor 5 Contribute to Enteric Infection. *Infection and Immunity*, 75, 545-552p.

Stier, H., Ebbeskotte, V. & Gruenwald, J. (2014). Immune-modulatory effects of dietary Yeast Beta-1,3/1,6-D-glucan. *Nutrition Journal*, 13, 38p.

Strojan, P. (2010). Role of radiotherapy in melanoma management. *Radiology and Oncology*, 44, 1-12p.

Suzuki, H., Kurihara, Y., Takeya, M., Kamada, N., Kataoka, M., Jishage, K., Ueda, O., Sakaguchi, H., Higashi, T., Suzuki, T., Takashima, Y., Kawabe, Y., Cynshi, O., Wada, Y., Honda, M., Kurihara, H., Aburatani, A., Doi, T., Matsumoto, A., Azuma, S., Noda, T., Toyoda, Y., Itakura, H., Yazaki, Y., Horiuchi, S., Takahashi, K., Kruijt, J. K., van Berkel, T. J. C., Steinbrecher, U. P., Ishibashi, S., Maeda, N., Gordon, S. & Kodama, T. (1997). A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. *Nature*, 386, 292 - 296p.

Tanner, D. E., Ma, W., Chen, Z. & Schulten, K. (2011). Theoretical and Computational Investigation of Flagellin Translocation and Bacterial Flagellum Growth. *Biophysical Journal*, 100, 2548-2556p.

Thomas, J. A. & Badini, M. (2011). The role of innate immunity in spontaneous regression of cancer. *Indian Journal of Cancer*, 48, 246-251p.

Trail, P. A., King, D. H. & Dubowchik, G. M. (2003). Monoclonal antibody drug immunoconjugates for targeted treatment of cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 52, 328-337p.

Tseng, D., Volkmer, J. P., Willingham, S. B., Contreras-Trujillo, H., Fathman, J. W., Fernhoff, N. B., Seita, J., Inlay, M. A., Weiskopf, K., Miyanishi, M. & Weissman, I. L. (2013). Anti-CD47 antibody-mediated phagocytosis of cancer by macrophages primes an effective antitumor T-cell response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110, 11103-11108p.

Tuong, W., Cheng, L. S. & Amstrong, A. W. (2012). Melanoma: Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Outcomes. *Dermatologic clinics*, 30, 113-124p.

Turner, M. W. & Hamvas, R. M. (2000). Mannose-binding lectin: structure, function, genetics and disease associations. *Reviews in Immunogenetics*, 2, 305-322p.

Underhill, D. M. & Gantner, B. (2004). Integration of Toll-like receptor and phagocytic signaling for tailored immunity. *Microbes and infections*, 6, 1368-1373p.

Vapuel, P. (2004). Tumor microenvironmental physiology and its implications for radiation oncology. *Seminars in Radiation Oncology*, 14, 198-206p.

Váčová, N. (2013). Studium možnosti použití formylmethioninových peptidů v protinádorové terapii. Bakalářská práce, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, České Budějovice.

Větvička, V. (2014). Effects of β -glucan on some environmental toxins: An overview. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacký*, 158, 1-4p.

Větvička, V., Hanikýřová, M., Větvičková, J. & Ross, G. D. (1999). Regulation of CR3 (CD11b/CD18)-dependent natural killer (NK) cell cytotoxicity by tumour target cell MHC class I molecules.

Větvička, V. & Větvičková, J. (2007). An evaluation of the immunological activities of commercially available β 1,3-glucans. *Journal of the American Nutraceutical Association*, 10, 25-31p.

Virgil, S. L. Jr. & Huang, A. T. (1982). Chemotherapy of melanoma. *Development in Oncology*, 5, 381-404p.

Vorlíček, J., Abrahámová, J., Vorlíčková, H. & kolektiv (2012). Klinická onkologie pro sestry, 2. přepracované a doplněné vydání. Grada, 450p.

Warren, T. S., Fitting, C., Hoff, E., Adib-Conquy, M., Beasley-Topliffe, L., Tesini, B., Liang, X., Valentine, C., Hellman, J., Hayden, D. & Cavaillon, J. M. (2010) Resilience to

bacterial infection: difference between species could be due to proteins in serum. *The Journal of Infectious Diseases*, 201, 223-232p.

Weiner, L. M., Surana, R. & Wang, S. (2010). Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. *Nature Reviews Immunology*, 10, 317-327p.

Williams, M. L. & Sagebiel, R. W. (1994). Melanoma risk factors and atypical moles. *Western journal of medicine*, 160, 343-350p.

Wood, R. D., Mitchell, M., Sgouros, J. & Lindahl, T. (2001). Human DNA repair genes. *Science*, 291, 1284-1289p.

Xia, Y., Větvička, V., Yan, J., Hanikýřová, M., Mayadas, T. & Ross, G. D. (1999). The beta-glucan-binding lectin site of mouse CR3 (CD11b/CD18) and its function in generating a primed state of the receptor that mediates cytotoxic activation in response to iC3b-opsonized target cells. *Journal of immunology*, 162, 2281-2290p.

Xiong, C., Brewer, K., Song, S., Zhang, R., Lu, W., Wen, X. & Li, C. (2011). Peptide-based imaging agents targeting phosphatidylserine for the detection of apoptosis. *Journal of medicinal chemistry*, 54, 1825-1835p.

Yan, J., Větvička, V., Xia, Y., Coxon, A., Carroll, M. C., Mayadas, T. N. & Ross, G. D. (1999). Beta-glucan, a "specific" biologic response modifier that uses antibodies to target tumors for cytotoxic recognition by leukocyte complement receptor type 3 (CD11b/CD18). *Journal of immunology*, 163, 3045-3052p.

Yoon, T. J., Koppula, S. & Lee, K. H. (2013). The effects of β -glucans on cancer metastasis. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*, 13, 699-708p.

Zitvogel, L., Apetoh, L., Ghiringhelli, F., André, F., Tesniere, A. & Kroemer, G. (2008). The anticancer immune response: indispensable for therapeutic success? *The Journal of Clinical Investigation*, 118, 1991-2001p.

Zvolský, M. (2013). Zhoubné nádory v roce 2010. Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR 2013, 5, 1-11p.