

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Hledání agonistů TLR působících synergicky
s ligandy fagocytárních receptorů v nádorové terapii**

Diplomová práce

Bc. Adéla Jačková

Školitel: RNDr. Jan Ženka, CSc.

České Budějovice 2015

Jačková, A., 2015: Hledání agonistů TLR působících synergicky s ligandy fagocytárních receptorů v nádorové terapii. [The searching of TLR agonists working in synergy with ligands of phagocytic receptors in the cancer therapy. Mgr. Thesis, in Czech] – 77 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

ANOTACE

The main goal of this thesis was to optimize the current therapeutic approach using TLR agonists and anchored agonists of phagocytic receptor to treating cancer. The study is focused on searching a suitable agonist of TLR as the replacement of LPS.

PROHLÁŠENÍ

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

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

V Českých Budějovicích, 12. 4. 2015

.....
Bc. Adéla Jačková

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych chtěla poděkovat svému školiteli RNDr. Janu Ženkovi, CSc. za odborné vedení, ochotu kdykoliv pomoci a poradit, ale také za jeho optimismus, který nejenže působí nesmírně nakažlivě, ale i motivačně. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Veronice Caisové za pomoc a podporu při metodickém postupu a za vytvoření příjemného pracovního prostředí. V neposlední řadě patří díky celé mojí rodině a přátelům, kteří mě během studia podporovali.

OBSAH

1 Úvod	1
2 Přehled literatury	2
2.1 Nádorové onemocnění.....	2
2.2 Melanom	2
2.3 Melanom B16F10	3
2.4 Imunitní systém.....	3
2.4.1 Specifická imunita	3
2.4.2. Nespecifická imunita	4
2.4.3 Neutrofily	5
2.4.4 Ostatní buňky nespecifické imunity	7
2.5 Pattern recognition receptors.....	8
2.5.1 MBL.....	8
2.5.2 Manózoový receptor	9
2.5.3 Formylpeptidové receptory	9
2.5.4 NLRs a RIG-like receptory	10
2.5.5 Toll-like receptory	10
2.5.5.1 LPS – agonista TLR4	13
2.6 Imunita a nádory	14
2.7 Imunoterapie posílením vrozené imunity.....	15
2.7.1 Imunoterapie pomocí PRRs.....	15
2.7.2 Imunoterapie kombinací TLRs a fagocytárních receptorů	17
2.7.3 Imunoterapie pomocí mykobakterií.....	17
2.8 ZM241385	19
3 Cíle práce.....	21
4 Materiál a metody.....	22
4.1 Chemikálie	22
4.2 Laboratorní zvířata	23

4.3 Buněčná linie	23
4.4 Příprava buněčné linie pro transplantaci a transplantace	23
4.5 Měření a výpočet velikosti nádorů.....	24
4.6 Počítání plicních metastáz.....	24
4.7 Izolace neutrofilů z kostní dřeně.....	24
4.8 Priming neutrofilů	25
4.9 Sonikace	25
4.10 Analýza dat.....	25
4.11 Příprava terapeutických látek	26
4.12 Pokusy	27
4.12.1 Terapie melanomu pomocí náhrad LPS	27
4.12.2 Potlačení zpětnovazebné inhibice pomocí ZM241385	27
4.12.3 Terapie melanomu pomocí <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	28
4.12.4 Vyhodnocení infiltrace leukocytů v melanomu pomocí průtokové cytometrie po aplikaci <i>Mycobacterium tuberculosis</i> -SMCC	28
4.12.5 Stanovení aktivity MPO v mezibuněčném prostoru nádorové tkáně po aplikaci <i>Mycobacterium tuberculosis</i> -SMCC	30
4.12.5.1 Příprava vzorků.....	30
4.12.5.2 Stanovení aktivity MPO.....	30
4.12.6 Studium cytotoxické schopnosti neutrofilů <i>in vitro</i> s použitím f-MLF-BAM	31
4.12.6.1 Ověření cytotoxicity f-MLF-BAM na nádorové buňky.....	31
4.12.6.2 Ověření cytotoxické schopnosti neutrofilů s použitím f-MLF-BAM	31
4.12.6.3 Ověření cytotoxické schopnosti neutrofilů s použitím f-MLF-BAM (při vyšším poměru neutrofilů k nádorovým buňkám)	32
4.12.6.4 Ověření cytotoxické schopnosti primovaných neutrofilů s použitím f-MLF-BAM	33
4.12.7 Stanovení množství uvolněné MPO po interakci neutrofilů s melanomovými buňkami a fMLF-BAM.....	34
4.12.8 Studium cytotoxické schopnosti neutrofilů <i>in vitro</i> s použitím <i>Mycobacterium tuberculosis</i> -SMCC.....	34

5 Výsledky.....	36
5.1 Terapie melanomu pomocí náhrad LPS	36
5.2 Potlačení zpětnovazebné inhibice pomocí ZM241385	38
5.3 Terapie melanomu pomocí <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	41
5.4 Vyhodnocení infiltrace leukocytů v melanomu pomocí průtokové cytometrie po aplikaci <i>Mycobacterium tuberculosis</i> -SMCC	44
5.5 Stanovení aktivity MPO v mezibuněčném prostoru nádorové tkáně po aplikaci <i>Mycobacterium tuberculosis</i> -SMCC.....	48
5.6 Studium cytotoxické schopnosti neutrofilů <i>in vitro</i> s použitím f-MLF-BAM	49
5.6.1 Ověření cytotoxicity fMLF-BAM na nádorové buňky	49
5.6.2 Ověření cytotoxické schopnosti neutrofilů s použitím f-MLF-BAM	50
5.6.3 Ověření cytotoxické schopnosti neutrofilů s použitím f-MLF-BAM (při vyšším poměru neutrofilů k nádorovým buňkám)	51
5.6.4 Ověření cytotoxické schopnosti primovaných neutrofilů s použitím f-MLF-BAM	52
5.7 Stanovení množství uvolněné MPO po interakci neutrofilů s melanomovými buňkami a f-MLF-BAM.....	53
5.8 Studium cytotoxické schopnosti neutrofilů <i>in vitro</i> s použitím <i>Mycobacterium tuberculosis</i> -SMCC	55
6 Diskuze	57
7 Souhrn	63
8 Seznam zkratk	64
9 Použitá literatura.....	66

1 Úvod

Nádorová onemocnění se za několik posledních desítek let staly strašákem moderní doby a jejich incidence neustále stoupá. Dnes bychom už jen stěží hledali někoho, kdo se nesetkal s rakovinou, ať už jako pacient sám nebo jako příbuzný či známý někoho, kdo rakovinou onemocněl. Ministerstvo zdravotnictví ČR udává, že každých osm minut je u nás diagnostikována tato choroba a každý den vezme život 79 lidem. Podle WHO je rakovina odpovědná za 7,9 milionů úmrtí ročně na celém světě a očekává se, že v roce 2030 počet těchto úmrtí převyší počet úmrtí na kardiovaskulární onemocnění (WHO, 2014). Ačkoliv je rakovina někdy mylně označována jako onemocnění rozvinutých zemí, je to ve skutečnosti globální problém, týkající se i chudých zemí, kde tak jako jinde sledujeme zvyšující se výskyt tohoto onemocnění a kde je navíc přístup k efektivní léčbě značně omezen (Parkin a kol., 2014).

Léčba nádorových onemocnění zaznamenává v posledních letech velký rozvoj. Onkologové již nemusejí spoléhat pouze na operativní léčbu nebo chemoterapii a radioterapii, které kromě ne vždy dokonalého účinku na nádorové buňky destruuji i buňky zdravé. Velké naděje jsou vkládány do imunoterapie, která je nyní kombinována s chemoterapií, případně používána samostatně. I když je její účinek mnohem specifitější, i zde se setkáváme s četnými vedlejšími účinky (Hansel a kol. 2010). Častým problémem je také její krátkodobý účinek, protože na léčbu může vzniknout rezistence. (Rezvani a Maloney, 2011.) Nejnovějšími bojovníky proti nádorovým onemocněním se pak stávají nanoterapie či genová terapie.

Ve své diplomové práci se budu věnovat imunoterapii, jejímž principem je aktivace vrozené imunity pomocí bakteriálních motivů nainstalovaných na nádorové buňky. Tato aktivace pak vede k destrukci nádorových buněk bez poškození buněk zdravých. Výsledky práce by měly přispět k nalezení vhodné léčby a měly by objasnit i některé mechanismy, jakými k zabíjení nádorových buněk dochází.

2 Přehled literatury

2.1 Nádorové onemocnění

Nádorové onemocnění je obecné označení pro skupinu více než sto chorob. Ačkoliv známe mnoho druhů rakovinného bujení, všechna tato onemocnění začínají stejně - vlastní buňky organismu se vymykají kontrole a dochází k jejich abnormálnímu růstu. Příčinou je mutace DNA, kterou není organismus schopen detekovat a opravit. Abnormální růst buněk pak může vést buď k benignímu tumoru, který nenapadá jiné tkáně a zřídka ohrožuje život nebo k malignímu tumoru, který se infiltruje do okolí a je schopen zakládat vzdálená ložiska, tzv. metastázy. (Weinberg 2013). Maligní nádory bývají těžko léčitelné, obzvláště pokud se onemocnění nepodchytí včas. Hanahan a Weinberg popsali jejich typické vlastnosti. Buňky maligních nádorů se dokážou neomezeně dělit, vyhýbají se apoptóze, neodpovídají na supresorové signály a indukují angiogenezi, čímž pro sebe získávají živiny. Navíc přeprogramovávají celý energetický metabolismus a ovládají četné mechanismy, díky kterým se vyhnou imunitnímu systému (Hanahan a Weinberg, 2011).

Kromě dělení na maligní či benigní nádory se nádory dělí také podle místa vzniku, např. nádory kůže a podkoží, plic, prsu, žaludku apod. či dle původu, kde rozlišujeme mezenchymové nádory, epitelové nádory, neuroektodermové nádory, nádory krevní a lymfatické tkáně a smíšené nádory (Sell, 2004).

2.2 Melanom

Melanom je zhoubný nádor řadící se mezi neuroektodermové nádory. Tento agresivní nádor vychází z melanocytů, objevuje se převážně na kůži, ale také v oku a střevu. Počet nových případů melanomu celosvětově neustále stoupá a některé studie naznačují, že tento trend bude pokračovat minimálně další dvě dekády. Zatímco u africké a asijské populace se melanom téměř nevyskytuje, zásadně ohrožuje zdraví bělošské populace. Mezi rizikové faktory rozvoje tohoto nádoru patří expozice UV záření, světlá pleť, mnohočetné pigmentové névy a přítomnost tohoto onemocnění u členů rodiny (Garbe a Leiter, 2008; Markowitz a kol., 2007).

Melanom metastazuje krevní i lymfatickou cestou a často i mnoho let po odstranění primárního nádoru. Metastázy se rozdělují na lokální (vyskytují se v okolí primárního nádoru), regionální (v regionálních mízních uzlinách) a vzdálené (plíce, játra, CNS, kosti). Každý typ metastáz má odlišné biologické chování, od něhož se odvíjí i různá prognóza (Emmett a kol., 2010).

Ačkoliv incidence tohoto onemocnění v posledních letech stoupá, mortalita se již nezvyšuje, což je dáno hlavně časným záchytem, který je způsoben zvýšenou pozorností, jež se tomuto onemocnění v posledních letech dostává. Terapie je chirurgická, dále se využívá, radioterapie, chemoterapie, imunoterapie a v některých státech také genová terapie (Rigel a Carucci, 2008).

2.3 Melanom B16F10

Melanom B16F10 je nádorová buněčná linie, která byla použita v této práci v *in vivo* i *in vitro* pokusech. Je to jedna ze čtyř buněčných linií myšího melanomu typu B16, který patří mezi syngenní transplantační modely. B16 je odvozen od spontánního melanomu z myší C57BL/6 a je také nejpoužívanějším syngenním modelem vůbec (Becker a kol., 2010). B16F10 proliferuje nejrychleji ze všech buněčných linií B16 a metastazuje do plic. Další buněčné linie B16 jsou B16F0, B16-F1 a B16-BL6 (Danciu a kol., 2013).

2.4 Imunitní systém

Imunitní systém je regulační systém, jehož úkolem je udržovat integritu organismu. Rozlišuje cizí a vlastní struktury a poskytuje organismu ochranu před škodlivinami.

Imunitní systém člověka tvoří nescifická a specifická složka, které úzce spolupracují. Nescifická složka imunitního systému stimuluje specifickou složku a specifická složka na oplátku aktivuje složku nescifickou (Medzhitov, 2007).

2.4.1 Specifická imunita

Specifická imunita, jinak také nazývaná získaná je fylogeneticky novější složkou imunitního systému a je pro ni typická imunologická paměť. Tato imunita je zajišťována dvěma skupinami buněk.

První skupinou jsou tzv. konvenční lymfocyty, kam řadíme T-lymfocyty a B-lymfocyty známé jako B2-lymfocyty. Oba typy konvenčních lymfocytů mají na svém povrchu receptory, které jim umožňují vázat se na specifické antigeny. Organismus disponuje obrovským souborem molekul antigen specifických receptorů a to díky genetické rekombinaci, která je aktivována proteiny RAG1 a RAG2. Při rekombinaci dochází k spojování segmentů genů kódující receptory a pro konvenční lymfocyty je typické, že k tomuto spojování dochází zcela náhodně (McBlane a kol., 1995). Rozmanitost receptorů je

navíc zvyšována dalšími mechanismy jako jsou somatická hypermutace (jen v případě B-lymfocytů), genová konverze a změna izotypové třídy (Medzhitov, 2007).

Ještě předtím než může být antigen konvenčním lymfocitem vůbec rozpoznán, musí být nejprve zachycen APC v tkáních a na jejím povrchu dopraven do lymfatických uzlin nebo sleziny. Sem cirkulují také T- a B-lymfocyty a zde antigeny vážou (Tanaka a kol., 2004). Protože specificita receptoru není přímo spojena s původem antigenu, konvenční lymfocyty se diferencují do několika typů buněk v závislosti na třídě patogenu, který je rozpoznáván. Tato diferenciací se řídí pokyny poskytovanými nespecifickým imunitním systémem ve formě cytokinů a chemokinů.

T-lymfocyty rozpoznávají antigenní peptidy vázané na HLA I, popřípadě HLA II APC buněk. Rozeznáváme T-lymfocyty pomocné, které na svém povrchu exprimují CD4 antigeny a T-lymfocyty cytotoxické s CD8 antigeny.

B-lymfocyty se po vazbě antigenu přeměňují a efektorové, popřípadě plasmatické buňky, které produkují protilátky (Medzhitov, 2007).

Druhou skupinou buněk zajišťujících získanou imunitou jsou lymfocyty, jejichž vlastnosti připomínají vlastnosti buněk vrozené imunity. Patří sem B1-lymfocyty, NK-T-lymfocyty, B-lymfocyty marginální zóny a podmnožina $\gamma\delta$ -T-lymfocytů. Na jejich povrchu také najdeme antigen specifické receptory, ale u tohoto typu buněk je rozmanitost receptorů omezena a rekombinace neprobíhá zcela náhodně (Bendelac a kol., 2001), (Kaer a kol., 2011).

2.4.2. Nespecifická imunita

Nespecifická imunita jinak nazývaná vrozená imunita je fylogeneticky starší složkou imunitního systému. Její efektorové mechanismy jsou na rozdíl od získané imunity aktivovány velmi rychle, a proto mohou okamžitě reagovat na vstup patogenu do organismu. Nespecifická imunita nezajišťuje imunologickou paměť (Medzhitov a Janeway, 2000).

Anatomické a fyziologické bariéry jsou součástí vrozené imunity, která vytváří jakousi první linii obrany proti infekcím. Tyto bariéry zahrnují kůži, řasinky v respiračním epitelu plic, nízké pH v žaludku, lysozym v slinách, slzách a jiných sekretech a produkci antimikrobiálních peptidů a mucinů epitelem sliznice. Důležitost těchto bariér může být doložena u pacientů s těžkými popáleninami nebo primární ciliární dyskinezi, u kterých byla pozorována extrémní náchylnost k infekcím. Ukázalo se, že ačkoliv ostatní součásti vrozené

imunity a získaná imunita pacienta pracují bez problému, nedokážou nahradit selhání základních anatomických a fyziologických bariér (Turvey a kol., 2010).

Humorální stránku nespecifické imunity zajišťují komplement, proteiny akutní fáze a interferony. Komplementový systém je reprezentován rodinou dvaceti pěti sérových proteinů a několika membránovými receptory. Komplementové složky se kaskádovitě aktivují a spouštějí tak aktivaci zánětu, fagocytózu, lýzu buněk a zesilují účinek adaptivní imunity. Tento systém může být aktivován třemi cestami: klasickou, alternativní a lektinovou. Cesty se navzájem překrývají, např. alternativní může amplifikovat klasickou nebo lektinovou cestu. K dalším účinkům komplementu patří jeho posilující efekt na B-lymfocyty a to jak na jejich efektorovou, tak paměťovou funkci. Navíc komplement zvyšuje efektivitu pohlcování antigenu folikulárními dendritickými buňkami, napomáhá retenci antigenů na těchto buňkách a zesiluje i T-buněčnou odpověď (Carroll a Fischer, 1997).

Proteiny akutní fáze jsou sekretovány hepatocyty jako odpověď na prozánětlivé cytokiny IL-13 a IL-6 a jejich sérová koncentrace se výrazně zvyšuje v prvních fázích infekce (Medzhitov, 2007). Interferony jsou rodina cytokinových mediátorů, které jsou zapojeny do obrany proti virům. Kromě antivirových účinků mají také klíčový vliv na kvalitu buněčné imunitní odpovědi a zesilují prezentaci antigenů (Page a kol., 2000).

Buněčnou složku nespecifické imunity reprezentují fagocytující buňky, jako jsou neutrofilové, makrofágy nebo dendritické buňky. Do nespecifické imunity také počítáme NK-buňky, eozinofily, bazofily a žírné buňky.

2.4.3 Neutrofilové

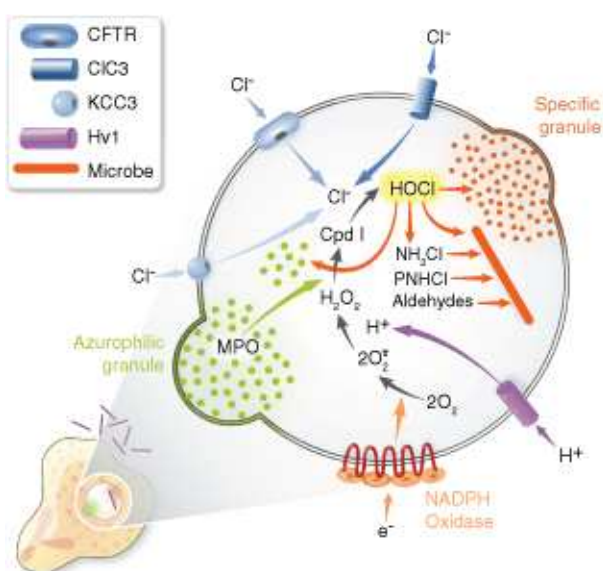
Neutrofilové zrají v kostní dřeni, kde je jejich obrovská zásoba. Menší část z jejich celkového počtu potom najdeme v krvi. Mohou být mobilizovány jako odpověď na infekci nebo zánět a tato mobilizace je velmi rychlá, jelikož neutrofilové se dokážou na místo určení dostat během několika hodin. Při tom vykazují schopnost diapedézy, tzn. prochází cévní stěnou kapilár a vstupují do tkání (Furze a Rankin, 2008).

Na svém povrchu neutrofilové exprimují celou řadu receptorů. Pro fagocytózu jsou nezbytné receptory FcγRIIA a CR3, které rozpoznávají opsonizované bakterie a receptory FcγRIIB a CR2, které usnadňují funkci předchozích (Scribner a Fahrney, 1976). Při fagocytóze se neutrofil dostává do přímého kontaktu s bakterií a poté co dojde k rozpoznání, začne obtékat její povrch, dokud není úplně obklopena a uzavřena do

fagosomu. Tímto postupem se minimalizuje množství extracelulární tekutiny, které vstoupí do fagosomu s bakterií. Za několik sekund po vytvoření fagosomu je do něj vylit obsah granulí neutrofilů, který tvoří významný objem této vakuoly, čímž se docílí vysoké koncentrace látek schopných zabít bakterie.

Pro zničení bakterií uvnitř fagosomu jsou využívány dva základní mechanismy (viz Obr. 1). Jedním z nich je generace ROS prostřednictvím aktivace NADPH oxidázy, tzv. oxidativní vzplanutí, druhým je zabíjení prostřednictvím MPO. NADPH je enzymový komplex v membráně fagosomů, který se vyskytuje i v cytoplasmatické membráně a membráně granulí. NADPH membrány fagosomů generuje superoxid sloužící jako přímý ničitel patogenů nebo jako prekurzor peroxidu vodíku. Superoxid zároveň brání reverzibilní inaktivaci MPO. (Hampton a kol, 1998).

MPO je enzym vyskytující se kromě neutrofilů také v lyzozomech a monocytech. Hlavním produktem tohoto enzymu je kyselina chlorná vytvářená z peroxidu vodíku, která je asi tisíckrát silnějším zabíječem než samotný peroxid vodíku. Kyselina chlorná pak ještě může chlorovat bakteriální proteiny za vzniku chloraminů, čímž znemožňuje jejich funkci. MPO je silně bazický protein, což mu umožňuje vazbu na negativně nabitě membrány bakterií. Před MPO neobstojí ani toxiny difterie a tetanu, které enzym neutralizuje. Ačkoliv je MPO velmi významným pomocníkem v likvidaci patogenů, deficit nemusí nutně znamenat vážné problémy. U MPO-deficientních pacientů totiž dochází k větší produkci ROS a tím je funkce MPO částečně nahrazena (Klebanoff, 2005).



Obr. 1: Znárodnění dějů ve fagosomu neutrofilů (převzato z Nauseef, 2014)

Fagocytóza ale není jedinou zbraní neutrofilů, existuje i možnost zabít bakterie extracelulárně. Prvním příkladem extracelulárního zabíjení je likvidace velkých objektů, jako jsou mnohobuněčné organismy, které poměrně malým neutrofilem nemohou být pohlčeny. Pokud se neutrofil adhezuje k cíli, dochází na povrchu k jeho zploštění a vypuštění MPO a produktů MPO do tzv. kapes vytvořených mezi neutrofilem a jeho cílem. Prostředí kapes imituje prostředí fagosomu. MPO a její produkty mohou být uvolněny z buňky také v případě, že se neutrofil neadheruje těsně k cíli, v případě buněčné lýzy, těsně před uzavřením fagosomu nebo pokud je neutrofil vystaven více různým rozpustným stimulům. Produkty MPO jsou vychytávány sérovými proteiny. Někdy ale může dojít k poškození tkáně, které se dnes dává do souvislosti např. s aterosklerózou, roztroušenou sklerózou a jinými onemocněními (Pacheco-Yepey a kol., 2011; Klebanoff, 2005).

Druhým příkladem extracelulárního zabíjení je tvorba NET, které vážou širokou škálu patogenů. NET jsou sestavovány z komponent běžně obsažených v jádře a granulech neutrofilů. Jedná se hlavně o DNA, histamin, chromatin a granulární enzymy a peptidy. Při kontaktu s patogenem DNA vytvoří jakousi páteř poskytující podporu pro proteiny, které působí baktericidně. Tvorba NET je aktivována IL8, PMA nebo LPS (Brinckmann a kol., 2004) a pro jejich vytvoření je důležitá MPO, jelikož u pacientů s deficitem MPO k vzniku NET nedochází (Metzler a kol., 2011). Výhodou tvorby NET je, že zachytí infekci na místě a brání tak jejímu šíření do těla. (Brinckmann a kol., 2004).

2.4.4 Ostatní buňky nespecifické imunity

Makrofágy vznikají z monocytů, které jsou stejně jako neutrofilové schopny diapedézy. Během průchodu monocytu přes endotel krevních cév, prodělává monocyt řadu změn a při vstupu do tkáně se stává makrofágem. Makrofágy se kromě fagocytózy účastní také řízení hemopoézy, hemostázy a hojení ran, a regulace zánětu. Stejně jako dendritické buňky slouží jako APC. Oba typy buněk prezentují antigeny naivním cytotoxickým nebo pomocným T-lymfocytům, čímž je aktivují. U dendritických buněk je tato prezentace poměrně sofistikovaná, protože tyto buňky mohou podle druhu patogenu rozhodovat, jaký druh imunitní obrany bude zvolen. Dendritické buňky zahajují a regulují odpověď adaptivní imunity a tvoří centrum vývoje imunologické paměti a tolerance (Geissmann a kol., 2010).

NK-buňky jsou schopny rozlišit buňky zdravé od buněk abnormálních, tudíž jsou jedinečným pomocníkem v boji proti nádorovým buňkám a buňkám napadených viry. Ačkoliv jsou to buňky vrozené imunity, v mnoha aspektech se podobají T-lymfocytům.

Jejich zabíjení se podobá zabíjení cytotoxickými T-lymfocyty a také sekretují IFN γ . Jejich jedinečnost spočívá v rozpoznávání buněk, které nenesou MHC molekuly a které tedy nemohou být rozpoznány T- ani B-lymfocyty (Lanier, 2005).

2.5 Pattern recognition receptors

Aby mohla vrozená imunita cizorodé organismy rozeznat, disponují buňky vrozené imunity tzv. PRRs. Existuje několik tříd těchto receptorů, které rozpoznávají mikrobiální komponenty zvané PAMPs. Protože PAMPs bývají nezbytné pro přežití mikroorganismu, nedochází k jejich změnám a vrozená imunita tak může po jejich identifikaci bezpečně zabránit množení mikroorganismu.

PRRs jsou exprimovány kontinuálně u všech buněk daného typu a detekují patogen bez ohledu na stadium jeho životního cyklu. Detekce patogenu vede k aktivaci intracelulárních signálních kaskád, které okamžitě indukují expresi různých genů zahrnutých v zánětlivé a imunitní odpovědi (Akira a kol., 2006).

PRRs ale nerozpoznávají jen infekční patogeny, ale mohou detekovat i tzv. DAMPs. Jde o neinfekční molekuly většinou pocházející z jádra či cytosolu buněk. Pokud dojde k poškození buňky, jsou vyplaveny ven nebo exponovány na povrch buněk (Kono a Rock, 2008).

PRRs se mohou rozdělovat podle mnoha kritérií např. podle buněčné lokalizace nebo funkce. Dle funkce se dělí na sekretované fagocytární a signální. Sekretované receptory zahrnují C-reaktivní protein a MBL. Do fagocytárních řadíme formylpeptidové receptory, manózoový receptor a dectin-1. Signální jsou potom reprezentovány RIG-like receptory a NLR (Jeannin a kol., 2008).

2.5.1 MBL

Mannose-binding lectin patří do rodiny kolektinů, které mají svoje lektinové domény asociované s kolageními strukturami. MBL váže svoje lektinové domény k sacharidovým doménám vyskytujícím se na mnoha mikrobiálních površích a pak prostřednictvím MBL-asociované proteázy aktivuje komplement. Nejprve dochází k vytvoření C3-konvertázy C4b2a, která je zodpovědná za štěpení C3 a generuje C3b fragmenty, vážící se na povrch mikroorganismu. Takové fragmenty jsou rozpoznávány CR1 receptorem fagocytů (Ghiran a kol., 2000). Některé C3b jsou konvertovány na iC3b a ty jsou

rozpoznávány CR3 receptorem. MBL může také přímo interagovat s povrchovými receptory a iniciovat tak opsonofagocytózu nezávisle na komplementu (Turner, 2003).

2.5.2 Manóзовý receptor

Manóзовý receptor je protein o velikosti 180 kDA exprimovaný makrofágy a dendritickými buňkami. Patří do lektinové rodiny typu C, která sestává z transmembránových a solubilních proteinů. Manóзовý receptor na své extracelulární straně obsahuje tři typy domén - na cystein bohatou doménu, doménu obsahující fibronectin typ II zahrnutou ve vazbě kolagenu a sérii osmi lektinových domén zodpovědných za vazbu na hexózy, které mají hydroxylové skupiny na třetím a čtvrtém uhlíku umístěny ekvatoriálně. Manóзовý receptor proto váže N-acetylglukosamin, glukozu, manózu, fukózu, nikoliv však galaktózu. Vazba hexóz na receptor je závislá na vápenatých iontech. Manóзовý receptor rozpoznává celou řadu endogenních i exogenních ligandů, proto se odhaduje, že se účastí nejen identifikace patogenů, ale i homeostatických procesů. Manóзовý receptor je nezbytný pro cytokinovou produkci, a to jak zánětlivých tak protizánětlivých cytokinů. Také zřejmě interaguje s ostatními PRRs, aby zprostředkoval intracelulární signalizaci (Gazi a Martinez-Pomarez, 2009).

2.5.3 Formylpeptidové receptory

Rodina formylpeptidových receptorů se účastní obrany proti patogenům, ale je jí také přisuzován význam v patogenezi amyloidogenních onemocnění. Receptory odpovídají na f-MLF a jiné formylované peptidy odvozené od bakterií a mitochondriálních proteinů. U lidí zahrnuje tato rodina tři podtypy, které byly nalezeny nejprve u fagocytyjících buněk, později také u mnoha dalších typů buněk, kde ovšem skutečná funkce receptorů nebyla objasněna. Lidské monocyty exprimují všechny tři podtypy FPRs – FPR, FPRL1 a FPRL2 a tato exprese je zachována i při maturaci monocytů v makrofágy. Neutrofily mají na svém povrchu jen dva typy receptorů a to FPR a FPRL1 (Fu a kol., 2006). U myší najdeme nejméně 7 typů FPRs, některé z nich jsou analogické těm lidským a liší se hlavně v afinitě k f-MLF. Jedná se o Fpr1, Fpr2, Fprs1, Fprs2, Fprs3, Fprs4, Fprs6 a Fprs7 (Gao a Murphy, 1993).

Interakce ligandu a receptoru aktivuje různé signální kaskády přes G-protein, což vede k imunitní odpovědi. Tato interakce může také působit na různé intracelulární kinázy,

včetně protein kinázy C a MAPK, jejichž aktivace přispívá k obraně proti bakteriím (Selvatici a kol., 2006).

Výsledkem aktivace signální drah je zvýšená schopnost fagocytózy a zvýšená migrace fagocytů do místa infekce. Dochází také k mobilizaci primárních granul neutrofilů a k tvorbě superoxidových aniontů. FPRs se účastní nekrozy a apoptózy, takže mohou být využívány v protinádorovém ataku (Migeote a kol., 2006). Naproti tomu na maligních gliomových buňkách FPR zprostředkovává růst maligních buněk a angiogenezi interakcí s agonisty odvozenými od hostitelských buněk (Zhou a kol., 2005).

Role receptorů není úplně jasná a to i kvůli velké různorodosti ligandů. Mezi agonisty kromě formylovaných peptidů počítáme i neformylované delší peptidy, N-formylované peptidy z mitochondrií poškozených buněk, syntetické hexapeptidy tzv. W-peptidy, části proteinové obálky viru HIV, Annexin I, Cathepsin G, lipoxin A4 a další. Rovněž škála antagonistů je ohromně široká (Migeote a kol., 2006).

2.5.4 NLRs a RIG-like receptory

Jsou to receptory nacházející se v cytosolu buněk. Doposud bylo nalezeno dvacet dva členů NLRs. Jako první byly popsány NLR1 a NLR2, které detekují bakteriální peptidoglykeny a řídí aktivaci MAPK a TNF β (Meylan a kol., 2006). RIG-like receptor rozpoznává virovou dvouřetězcovou RNA. Skupinu RIG-like receptorů reprezentují tři zástupci: RIG1, MDA5 a LGP2, přičemž LGP2 usnadňuje rozpoznávání virové RNA RIG1 a MDA5 (Sato a kol., 2010).

2.5.5 Toll-like receptory

TLRs jsou asi nejlépe charakterizovanými receptory vrozené imunity. Jejich název je odvozen od proteinu Toll, což byl první popsaný receptor embrya *Drosophily melanogaster*. Tento receptor je klíčový pro vývoj embrya a u dospělců má význam v obraně proti houbovým infekcím. U savců byl později nalezen analog proteinu Toll, jehož funkcí je rozpoznání infekce a působení proti infekci (Lemaitre a kol., 1996).

Strukturně jsou TLRs integrální membránové glykoproteiny a řadí se mezi členy rozsáhlé rodiny, která zahrnuje interleukin-1 receptory, protože cytoplasmatická oblast TLRs je homologická s cytoplasmatickým regionem interleukin-1 receptorů. Tato cytoplasmatická oblast je nazývána jako Toll/IL-1 receptor (TIR) doména. Naproti tomu extracelulární regiony obou typů receptorů se liší. TLRs obsahují motivy bohaté na leucinová opakování,

zatímco interleukin-1 receptory obsahují tři imunoglobulin-like domény (Takeuchi a kol., 1999).

U lidí jich najdeme deset TLRs, u myši dvanáct. Odlišné TLRs rozpoznávají nejrůznější vzory, což propůjčuje vrozené imunitě jistý stupeň specifity. TLRs se vykytují buď na povrchu buněk nebo intracelulárně v endosomech, lysosomech a endoplazmatickém retikulu (Kawai a Akira, 2010). Přehled jednotlivých TLRs a jejich ligandů je uveden v Tab. 1.

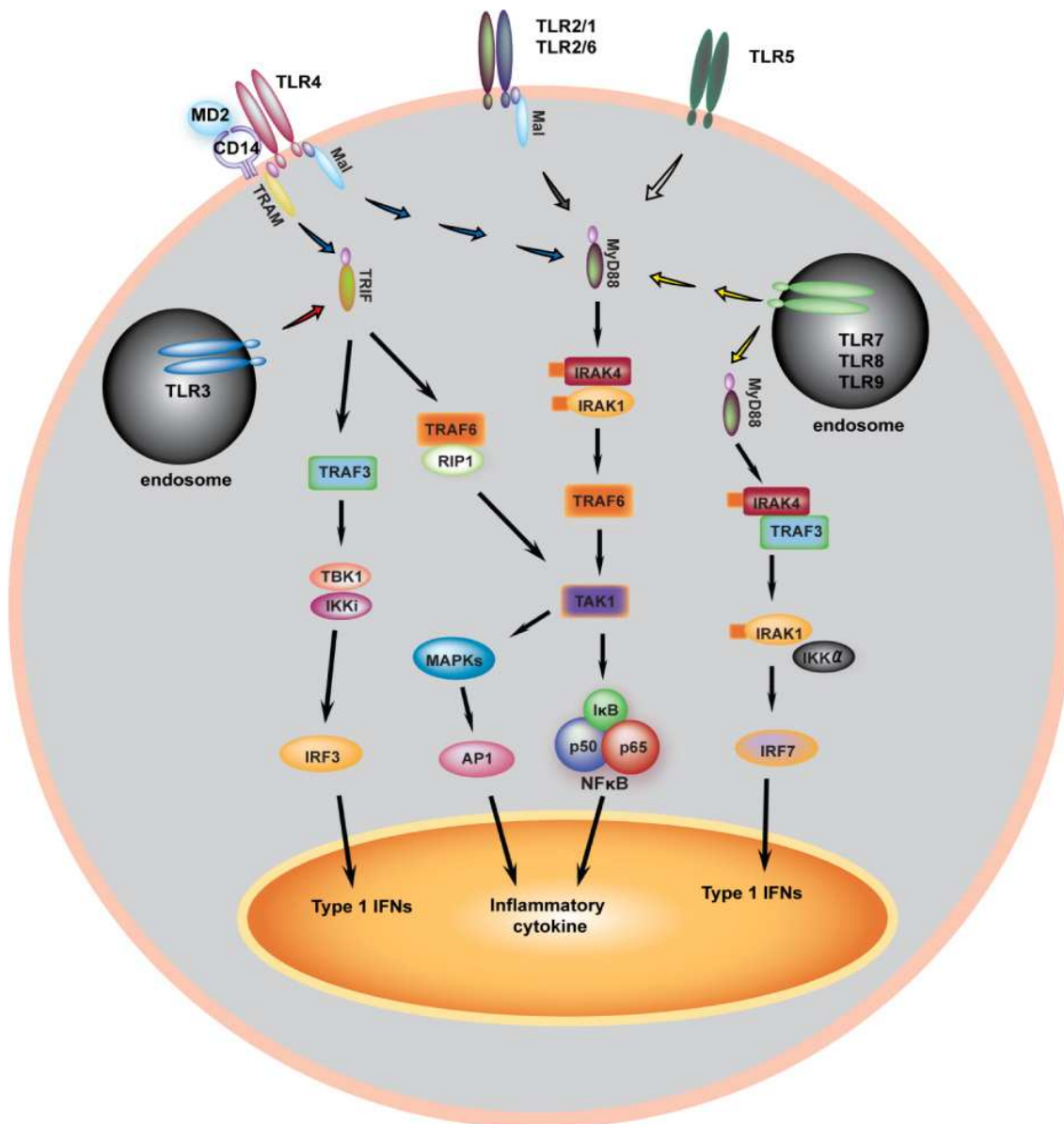
TLR	Výskyt	Umístění	Ligandy
TLR1	člověk, myš	membrána	triacylované lipoproteiny, peptidoglykany, lipopolysacharidy
TLR2	člověk, myš	membrána	triacylované lipoproteiny, peptidoglykany, lipopolysacharidy, Heat shock proteiny, HMGB1, zymosan, poriny
TLR3	člověk, myš	endosomy	virové NK, poly I:C
TLR4	člověk, myš	Membrána, endosomy	Lipopolisacharidy, heat shock proteiny, HMGB1, proteoglykany, taxol
TLR5	člověk, myš	membrána	flagelin
TLR6	člověk, myš	membrána	Heat shock proteiny, HMGB1, proteoglykany, zymosan, lipoteichoová kyselina
TLR7	člověk, myš	endosomy	Virové NK, R848
TLR8	člověk, myš	endosomy	Virové NK, R848
TLR9	člověk, myš	endosomy	Virové NK, CpG DNA
TLR10	člověk	Membrána, endosomy	Profilin-like proteiny
TLR11	myš	Cytoplasmatická membrána	Ligandy uropatogenních bakterií

Tab. 1: Přehled TLRs a jejich ligandů. (Lauw a kol., 2005; Jurk a kol., 2002; Anders a Patole, 2005; Takeda a kol., 2003)

Repertoár specifity TLRs je rozšířen schopností vzájemně heterodimerizovat. Dimery vytváří například TLR2 a TLR6 a rozpoznávají takto diacylované lipoproteiny. Vzájemně interagují i TLR1 a TLR2, které identifikují triacylované lipoproteiny (Ozinsky a kol., 2000). Specifita TLR je také ovlivněna různými adaptorovými a doplňkovými molekulami, jako jsou např. MD-2 a CD14, které vytváří komplex s TLR4 (Miyake, 2003).

Pokud jsou TLRs stimulovány ligandem, dochází k aktivaci různých signálních drah. S výjimkou TLR3 všechny TLR využívají adaptorovou molekulu MyD88. Funkcí MyD88 je interagovat s komplexem kinázy IRAK a TRAF6, což vede k aktivaci TAK1, které následně indukuje translokaci NF- κ B a AP-1 do jádra a to prostřednictvím degradace I κ B proteinu nebo prostřednictvím aktivace MAPK. Celá tato signální dráha vede k expresi genů kódujících prozánětlivé cytokiny (Takeda a Akira, 2004; Yamamoto a kol., 2002).

MyD88 signální cesta může být aktivována také TLR2/1, TLR2/6 a TLR4 a to přes protein Mal. TLR3 a TLR4 využívají adaptorovou molekulu TRIF, která interaguje s molekulami TRAF3, TBK1 a IKKi. Výsledkem je fosforylace IRF3. Aktivovaný IRF3 dimerizuje a je translokován do jádra, kde indukuje expresi IFN typu I. TRIF také interaguje s TRAF6-RIP1 komplexem a aktivuje tak NF- κ B. TRAM je molekula zodpovědná za aktivaci TRIF-dependentní signální dráhy u TLR4. Stimulace TLR7, TLR8 a TLR9 ligandem vede k formování komplexu sestávajícího z MyD88, IRAK4, TRAF6, TRAF3, a IRAK1. TRAF6 TRAF3 jsou zodpovědné za aktivaci NF- κ B (tvorba prozánětlivých cytokinů) a IRF7 (tvorba INF typu I) (Kopp a Medzhitov, 2003; Yamamoto a kol., 2002; Yuk a Jo, 2011). Jednotlivé signální dráhy jsou znázorněny na Obr. 2.



Obr. 2: Umístění TLRs a jejich signální dráhy (převzato z Yuk a Jo, 2011)

Schopnost TLRs indukovat složité signální kaskády je klíčové pro utváření celkové odpovědi, pro produkci cytokinů a chemokinů, zabíjení mikrobů, maturaci APC a zapojení adaptivní imunitní odpovědi (Manavalan a kol., 2011).

2.5.5.1 LPS – agonista TLR4

LPS představuje endotoxin, na nějž imunitní systém reaguje velmi silnou reakcí. LPS je obsažen ve vnější membráně G- bakterií a skládá se ze tří částí: O-antigenního polysacharidu, oligosacharidového jádra a Lipidu A, přičemž každá ze tří částí zastává vlastní funkci a lipid A je odpovědný za biologickou aktivitu celé molekuly. (Erridge a kol.,

2002). LPS se váže především na TLR4 a výsledkem tohoto působení je produkce cytokinů IL-1, IL-6, IL-8 a TNF α (Erridge a kol., 2002; Schromm a kol., 2001).

2.6 Imunita a nádory

Imunitní systém disponuje velkým potenciálem ničit nádory a přitom nezpůsobit poškození normální tkáně. Zároveň má v záloze dlouhodobou paměť, pomocí které může předejít opětovnému výskytu nádoru.

Jedním z významných objevů na poli nádorové imunity bylo zjištění, že nespecifická imunita má schopnost najít a zlikvidovat nádorové buňky. Profesor Cui totiž objevil u jedné z myší ve svých pokusech mutaci, která způsobila, že myš, jíž byl implantován sarkom S-180 se vyléčila. Mutace zapříčinila, že vrozená imunita byla schopna lépe rozpoznat a zlikvidovat nádorové buňky (Cui a kol., 2003).

Tumorová specifická imunitního systému tedy začíná v rozpoznávání tumorových antigenů. Virové proteiny u nádorů způsobených viry, mutované proteiny onkogenů a nemutované ale abnormálně exprimované proteiny nalezené na tumorech jsou dobrými antigeny a výborným cílem imunosurveillance - protinádorového dohledu. A jak k rozpoznávání nádorových buněk dochází? Tumorového rozpoznávání a následného zabíjení se mohou účastnit efekторы vrozené i získané imunity. První transformované buňky jsou identifikovány NK-buňkami, což vede k destrukci některých transformovaných buněk a pohlcení jejich fragmentů makrofágy a dendritickými buňkami (Dranoff, 2004). Tyto makrofágy a dendritické buňky sekretují mnoho prozánětlivých cytokinů a prezentují molekuly nádoru T- a B-lymfocytům. Aktivace T- a B-lymfocytů vede k produkci dalších cytokinů, které podporují aktivitu vrozené imunity a zároveň podporují produkci tumor-specifických T-lymfocytů a protilátek. Pomocí adaptivního systému pak dojde k eliminaci zbylých tumorových buněk a k vytvoření imunitní paměti vůči specifickým tumorovým komponentám (Shankaran a kol., 2001), (Finn, 2012).

Tento mechanismus ale selhává u méně imunokompetentních jedinců nebo u nádorů méně imunogenních. Nádory totiž prodělávají řadu změn ve vlastních buňkách, kterými dokážou imunitní systém obelhat. V první řadě ztrácí antigeny, HLA-antigeny, senzitivitu ke komplementu, k T-lymfocytům a NK-buňkám (Kim a kol., 1975). Navíc ještě rozvrací imunitní regulaci způsobem, který jim přináší četné výhody. Tumorové mikroprostředí dokáže bránit expanzi pomocných a cytotoxických T-lymfocytů a namísto toho podporuje produkci prozánětlivých cytokinů a jiných faktorů, které vedou k akumulaci supresivní

buněčné populace, která inhibuje imunitu (Hussain a Harris, 2007). Nejlépe popsané jsou např. T regulační lymfocyty, které inhibují funkci ostatních T-lymfocytů (Woo a kol., 2002).

2.7 Imunoterapie posílením vrozené imunity

První imunoterapie byla provedena v podstatě už v 19. století a to chirurgem W. B. Coleym, který injikoval bakterii *Streptococcus pyogenes* pacientovi s neoperabilním sarkomem. Coleyho napadlo, že by infekce mohla mít vedlejší efekt a způsobit zmenšení nádoru a nemýlil se. Léčba byla úspěšná a Coley pokračoval v injikaci bakterií a bakteriálních toxinů dalších čtyřicet let. Protože živý *Streptococcus pyogenes* je nebezpečný, začal Coley používat teplem inaktivované bakterie ještě v kombinaci s bakterií *Serratia marcescens*. Tato kombinace se dnes označuje jako Coleyho toxin. S rozvojem radioterapie a chemoterapie se ale od používání Coleyho toxinů upustilo a až v posledních desítkách let dochází k návratu k myšlence, že infekce může být účinným pomocníkem v boji proti nádorům (McCarthy, 2006; Coley, 1910).

Například kolektiv Kölmela zjistil, že počet infekčních onemocnění koreluje s nižším rizikem melanomu. Zkoumali vliv plicní formy tuberkulózy, bakterie *Staphylococcus aureus*, chřivky a pneumonie. U jedinců, kteří alespoň třikrát za život prodělali infekci s horečkou, se riziko vzniku melanomu snížilo o 40% (Kölmel a kol., 1999). Podobně se přišlo na to, že očkování proti tuberkulóze a pravým neštovicím také snižuje výskyt melanomu (Pfahlberg a kol., 2002). Podrobnější vysvětlení významu imunitního systému v redukci incidence melanomu ale zatím není k dispozici.

2.7.1 Imunoterapie pomocí PRRs

Když byly v 90. letech objeveny PRRs, zájem vědců se zaměřil na jejich aktivaci. V dnešní době je k dispozici široká škála syntetických peptidů, které tvoří ligandy pro PRRs. Příkladem je W-peptid, který byl použit k stimulaci FPRL-1 receptoru. Tato stimulace zvyšuje expresi TRAIL u lidských monocytů, neutrofilů a myších leukocytů a u myší bylo prokázáno, že vede k indukci apoptózy buněk transplantovaného jaterního nádoru a k celkové redukci nádorové hmoty (Lin a kol., 2007).

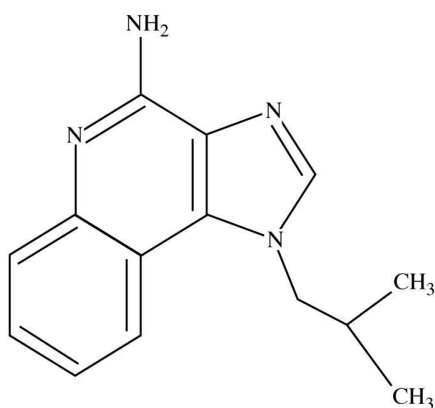
Aktivovány mohou být i TLRs. Jednou z významných látek je Imiquimod z imidazochinolinové rodiny nukleosidových analogů, který má dobrou účinnost proti tumorům různého původu. Je agonistou TLR7 a u lidí i TLR8 (Flutter a Nestle, 2013). Aktivuje transkripci NF- κ B, což stimuluje produkci prozánětlivých cytokinů, chemokinů

a jiných mediátorů, které vedou k zahájení prezentace antigenu a TH1 antitumorové odpovědi. Navíc vykazuje množství sekundárních efektů na molekulární a buněčné úrovni, které mohou být vysvětleny aktivací NF- κ B. Ve vyšších koncentracích působí proapoptoticky proti nádorovým buňkám. Indukce apoptózy se zdá být závislá na Bcl-2 proteinu a zahrnuje aktivaci kaspáz. Kombinace mnohých synergických antitumorálních funkcí jedinou sloučeninou reprezentuje zajímavý způsob antineoplastické léčby (Schön a Schön, 2007).

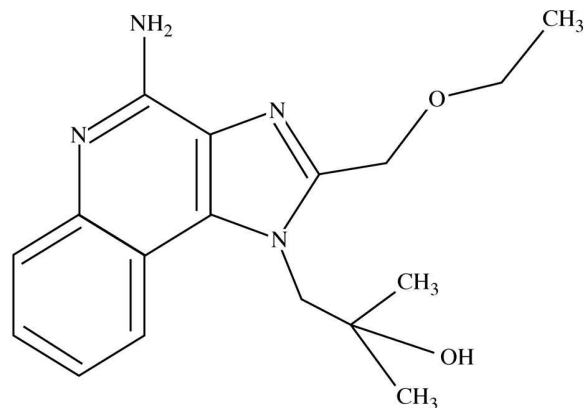
Agonistou TLR7 a TLR8 je také Resiquimod. Resiquimod je jako Imiquimod sloučenina nízkomolekulární váhy pocházející z imidazochinolinové rodiny a tyto dvě látky spolu sdílí podobné vlastnosti. Obě mají antivirovou a antitumorovou aktivitu, které jsou zajišťovány hlavně produkcí cytokinů z makrofágů, monocytů a dendritických buněk. Resiquimod je účinnější v indukcii cytokinové exprese než Imiquimod. Imiquimod indukuje tvorbu IL-6 a IL-8 *in vitro*, zatímco Resiquimod indukuje tvorbu IL-1 α , IL-8, TNF- α a přechodně IFN- α (Dockrell a Kinghorn, 2001). Resiquimod vyvolává maturaci plazmocytoidních dendritických buněk a expresi CD83, D80, CD86, CD40, a HLA-DR. Poslední čtyři molekuly jsou důležité pro iniciaci T-buněčné aktivity (Ahonen a kol, 1999).

Imiquimod je používán u lidí v léčbě basocelulárních karcinomů, onemocnění condylomata acuminata a aktinické keratózy. Obě látky jsou účinné v léčbě genitálního herpes simplex viru, i když pro resiquimod přinesly některé klinické studie rozporuplné výsledky. Resiquimod vykazuje dobrou efektivitu v léčbě kožních nádorů a v dohledné době může být také použit jako lék bazocelulárních karcinomů (Meyer a kol., 2013). Struktura obou látek je znázorněna na Obr. 3.

Imiquimod (Aldara, R-837, S-26308)



Resiquimod (R-848, S-28463)



Obr. 3: Struktura imiquimodu a resiquimodu (Převzato z Dockrell a Kinghorn, 2001)

Dalším receptorem, který může být stimulován je TLR3, který je exprimován na membráně B-lymfocytů, makrofágů a dendritických buněk. TLR3 interaguje s PolyI:C. Poly I:C je strukturně podobný dvouřetězcové RNA vyskytující se u virů a některých přirozených stimulantů TLR3. Poly I:C prostřednictvím TLR3 indukuje apoptózu buněk rakoviny prostaty a to prostřednictvím proteinového komplexu STAT₁ (Palchetti a kol., 2015). Také zprostředkovává expresi IFN β přes RIG1 receptor. PolyI:C se nyní používá jako adjuvans v terapii různých druhů nádorů (Salaun a kol., 2006). Byla popsána synergie Poly I:C s resiquimodem, která aktivuje dendritické buňky a tato aktivace vede posléze k Th1 odpovědi (Napolitani a kol., 2005).

2.7.2 Imunoterapie kombinací TLRs a fagocytárních receptorů

Myšlenkou kombinace TLRs a fagocytárních receptorů se zabývali Underhill a Gantner, kteří vyšli z objevů, že signální dráhy TLRs a fagocytárních receptorů se vzájemně ovlivňují. TLR signální dráhy modulují účinnost formace fagosomu nebo mohou ovlivnit maturaci nově formovaných fagosómů. TLR zprostředkovaná transkripční odpověď může také ovlivnit geny zahrnuté v různých fázích fagocytózy. (Underhill a Gantner, 2004). Vhodná stimulace jednotlivých receptorů vykazuje protinádorové účinky, které vedou k redukci nádorové masy, ale většinou nepostačí k úplnému vyléčení nádoru. Současná aktivace TLRs a fagocytárních receptorů se tedy jeví jako velmi výhodná alternativa v nádorové terapii, protože tato dvojnásobná aktivace může vyústit v synergii receptorů a může tak být základem velmi silného imunitního útoku.

Synergie TLRs a fagocytárních receptorů byla prokázána Janotovou a kol., kteří dosáhli významné nádorové redukce např. kombinací rozpustného LPS a manan-BAM nebo LPS a f-MLFKK-BAM (Janotová a kol., 2014). LPS je dobře použitelné u myší, ale bohužel ne u lidí, kteří jsou na tuto látku 1000x-10000x citlivější, protože jim chybí sérový protein, který LPS inhibuje (Warren a kol., 2010). Pro humánní použití tedy LPS není vhodný a je třeba hledat jeho agonistu TLRs (Janotová a kol., 2014).

2.7.3 Imunoterapie pomocí mykobakterií

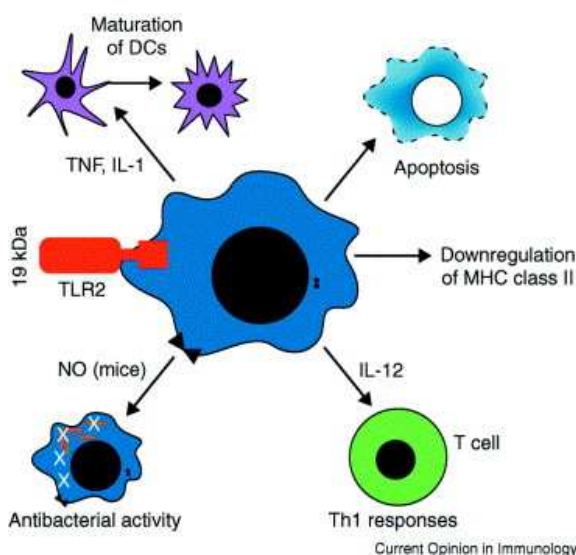
Myšlenka imunoterapie pomocí mykobakterií plynule navázala na výzkumy chirurga Coleyho, který používal v léčbě proti nádorům inaktivované bakterie a jehož následovatelé se rozhodli vyzkoušet *Mycobacterium bovis*, původce onemocnění tuberkulózy u skotu, ve formě živé atenuované vakcíny tzv. bacillus Calmette–Guérin (BCG). Terapie touto

vakcínou byla velmi účinná hlavně v léčbě neinvazivní rakoviny močového měchýře nebo v kombinaci s chemoterapií proti lymfoblastické leukemii a i když nejsou známy přesné mechanismy účinku, je používána dodnes. (Chakrabarty, 2003).

V mé diplomové práci bylo používáno *Mycobacterium tuberculosis*, které je *Mycobacterium bovis* značně blízké. Oba druhy bakterií vystavují na svém povrchu četnou řadu PAMPs, např. peptidoglykeny, mykolovou kyselinu, lipomanan nebo lipoarabinomanan (Brennan, 2003). Tyto PAMPs interagují s různými PRRs, což jednak může přispívat k vazbě mykobakterií na cílové buňky hostitele a jednak se tím může aktivovat imunitní systém.

Významným PAMP mykobakterií je glykolipid lipoarabinomanan, který je klíčovou molekulou v indukci sekrece cytokinů makrofágy. Váže se na makrofágy prostřednictvím TLR2 s pomocí adaptorové molekuly CD14 (Means a kol., 1999). Aktivuje i dendritické buňky vazbou na receptor rodiny lektinů typu C - DC-SIGN (Tailleux a kol., 2003).

M. tuberculosis sekretuje 19 kDa lipoprotein. Tento protein stimuluje makrofágy prostřednictvím TLR2 k sekreci TNF a oxidu dusnatého, indukuje T-buněčnou odpověď a aktivuje dendritické buňky (Ashbridge a kol., 1989). Působení 19 kDa lipoproteinu na TLR2 je znázorněno na Obr. 4.



Obr. 4: Působení 19 kDa lipoproteinů na TLR2. Aktivace makrofágového TLR2 spustí řadu reakcí. Jednak indukuje apoptózu makrofágů a snižuje expresi MHC II, ale zároveň i aktivuje imunitu. Dochází k produkci NO, produkci cytokinů makrofágy, které aktivují dendritické buňky a Th1 buněčnou odpověď (Převzato z Stenger a Modlin, 2002).

Další z PAMPs *M. tuberculosis* je muramyldipeptid, který je ligandem NLR2 receptoru a jeho navázání vede k produkci prozánětlivých cytokinů. NLR2 receptor a TLR2 vykazují v produkci cytokinů synergii (Ferwerda a kol., 2002).

Dále existuje mnoho jiných ligandů TLR2, které aktivují imunitní systém buď prostřednictvím TLR2 samotného nebo v kombinaci TLR2 s jinými TLRs. *M. tuberculosis* vlastní nejen velký repertoár TLR ligandů (Bhatt a Salgame, 2007), ale interaguje také s mnoha fagocytárními receptory včetně Fc receptrou, manózoového receptoru, komplementových receptorů CR1, CR2, CR3, receptoru pro surfaktantový protein a scavenger receptoru (Sakamoto, 2012).

Také se předpokládá, že infekce celou bakterií vyvolá velmi komplexní aktivaci imunitního systému, kdy dochází k indukci různých signálních cest, do kterých je zahrnut minimálně i jeden z dalších PRRs a to TLR4 (Stenger a Modlin, 2002). Do snahy zbavit se bakterie jsou zapojeny všechny buňky imunitního systému. Například neutrofilů mají ochrannou funkci a existuje řada teorií, jakými mechanismy tuto funkci zprostředkovávají. Zvažuje se imunomodulace produkcí cytokinů a chemokinů, aktivace makrofágů komponentami z granul nebo dokonce převod antimikrobních látek přímo do makrofágů. Vyčerpání neutrofilů během prvních týdnů infekce umožňuje u myši zvýšený růst mykobakterie v játrech, slezině a plicích (Pedrosa a kol., 2000). Je také známo, že neutrofil může zabít *M. tuberculosis* oxidativním i neoxidativním způsobem (Neufert a kol., 2001) a rovněž bylo dokázáno, že *M. tuberculosis* vyvolává u neutrofilů tvorbu NETs, i když vytvoření této formace zřejmě nevede k zabití patogena, ale má sloužit pouze k zabránění šíření infekce (Kichik a kol., 2009). Eliminace tohoto patogena se účastní i NK-buňky, které mimo jiné slouží k zabíjení makrofágů napadnutých bakterií a brání tak dalšímu šíření bakterie. (Brill a kol., 2001). Do obrany proti *M. tuberculosis* se zapojuje vrozená i získaná imunita, živá bakterie však má mnohé vlastnosti, pomocí kterých nakonec dokáže nad imunitním systémem získat převahu.

2.8 ZM241385

ZM241385 je antagonist adenosinového receptoru A2A (Poucher a kol., 1995). Adenosinový receptor je protein z rodiny receptorů spřažených s G-proteinem vyskytující se hlavně v bazálních gangliích, cévách, T-lymfocytech a destičkách. Stimulace adenosinového receptoru snižuje aktivitu destiček, leukocytů a endoteliálních buněk a chrání tak tkáň před zánětlivým poškozením (Ohta a Sitkovsky, 2001).

Janotová a kol. ve své práci popsali kromě synergie TLRs a fagocytárních receptorů také jeden nežádoucí efekt – použité terapeutické přístupy ztrácely časem na účinnosti (Janotová a kol., 2014). Jedním z možných důvodů by mohlo být uvolňování adenosinu z nekrotizovaných tkání, který by mohl vazbou na A2A působit inhibičně. Proto jsme se rozhodly využít vazby ZM241385 na receptor a snažily se tak účinek adenosinu eliminovat.

3 Cíle práce

- Hledání náhrad LPS - najít vhodné agonisty TLR, které budou v synergii s agonisty fagocytárních receptorů
- Možnosti prodloužení účinku protinádorové terapie
- Sledování nádorové infiltrace v průběhu léčby pomocí průtokové cytometrie
- Hodnocení cytotoxické schopnosti neutrofilů *in vitro*
- Studium degranulace neutrofilů, *in vivo a in vitro* techniky

4 Materiál a metody

4.1 Chemikálie

- Anti-Mouse CD45 PerCP-Cy5.5; clone 30-F11 (eBioscience)
- Anti-Mouse CD45 APC; clone 30-F11 (eBioscience)
- Anti-Mouse CD3e FITC; clone 145-2C11 (eBioscience)
- Anti-Mouse CD4 APC; clone GK1,5 (eBioscience)
- Anti-Mouse CD8a PE-Cy7; clone 53-6.7 (eBioscience)
- Anti-Mouse NK1.1 PE; clone PK136 (eBioscience)
- Anti-Mouse Ly-6G (Gr-1) Alexa Fluor 700; clone RB6-8C5 (eBioscience)
- Anti-Mouse CD19 APC; clone eBio1D3 (eBioscience)
- Anti-Mouse F4/80 PE-Cy7; clone BM8 (eBioscience)
- BAM -biokompatibilní kotva pro membrány, Mw 4000 (NOF Corporation)
- DMSO - dimetyl sulfoxid (Sigma- Aldrich)
- DNáza I (Roche Diagnostics)
- DTT – dithiotreitol (Sigma-Aldrich)
- EDTA - kyselina ethylendiamintetraoctová (Sigma- Aldrich)
- f-MLF - N-formyl-methionin-leucin-fenylalanin (Sigma- Aldrich)
- f-MLF KK - N-formyl-methionin-leucin-fenylalanin-lysin-lysin (Schafer-N)
- FCS - fetální bovinní sérum (Sigma-Aldrich)
- GM-CSF (Sigma-Aldrich)
- H-MLF KK – methionin-leucin-fenylalanin-lysin-lysin (Schafner-N)
- Imiquimod (R-837) (Calbiochem)
- Kalibrační kuličky značené fluorescenčně (Invitrogen)
- Laminarin z *L. digitata* (Sigma-Aldrich)
- Liberáza DL (Roche Diagnostics)
- Mannan – ze *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma-Aldrich)
- *Mycobacterium tuberculosis* – heat killed (Invivogen)
- Myeloperoxidase (MPO) Fluorometric Activity Assay Kit (Sigma-Aldrich)
- Neutrophil Isolation Kit (Miltenyi Biotec)
- PMA - Phorbol myristate acetate (Sigma-Aldrich)
- Poly I:C – (Sigma-Aldrich)
- Resiquimod (R-848) (Tocris)

- RPMI 1640 (Sigma-Aldrich)
- SMCC - 4-(N-Maleimidomethyl)cyclohexanecarboxylic acid N-hydroxysuccinimide ester (Thermo Scientific)
- TCEP - tris(2-Carboxyethyl)phosphine hydrochlorid (Sigma-Aldrich)
- TNF- α (Sigma-Aldrich)
- Trypsin (Sigma-Aldrich)
- ZM241385 (Tocris)

4.2 Laboratorní zvířata

Laboratorními zvířaty používanými v *in vivo* a *in vitro* pokusech byly myši samice kmene C57/BL/6N pocházející z chovu Charles River Laboratories. Myši byly chovány za standardních podmínek při teplotě 22 °C a relativní vlhkosti vzduchu 65 % s neomezeným přístupem k vodě a krmivu. Při zahájení *in vivo* pokusu byla zvířata 8 týdnů stará.

4.3 Buněčná linie

V pokusech byl používán melanom B16F10. Buňky této buněčné linie byly kultivovány v médiu RPMI 1640 s 10% bovinním fetálním sérem, 1% antibiotiky, 1% glutaminem a 0,1% merkaptoetanolem. Kultivace probíhala v termostatu při 37 °C v atmosféře nasycené vodními parami a obsahující 5 % CO₂.

4.4 Příprava buněčné linie pro transplantaci a transplantace

Z buněčné linie nádorových buněk se před použitím odstranilo kultivační medium. Do kultivační lahve se nalilo sterilní PBS, lehce se promíchalo a vylilo ven. Toto promytí se opakovalo celkem třikrát. Protože nádorové buňky mají tendenci adherovat, přidala se k nim posléze trypsinizační směs (0,02% trypsin a 0,02% EDTA v PBS) a nechala se působit 2 minuty v termostatu (37 °C, 5% CO₂ atmosféra). Po dvou minutách se kultivační lahev poklepala až se trypsinizační směs buňkami zakalila a trypsinizace se pak zastavila přidáním RPMI 1640 s 10% FCS. Suspenze uvolněných buněk se nechala centrifugovat 10 min při 4 °C a 150g. Centrifugované buňky byly naředěny RPMI 1640 na požadovaný objem a rozvolněny. Jejich koncentrace byla spočítána v Bürkerově komůrce za pomoci trypanové modři, která barví mrtvé buňky, kdežto živé zůstávají bez barvení. Tak je možné určit životnost buněk. Po zjištění koncentrace buněk byla suspenze naředěna na koncentraci

4 000 000 buněk /ml RPMI 1640 a injikována do pravé dolní části zad v množství 0,1 ml na myš.

4.5 Měření a výpočet velikosti nádorů

Velikost nádoru byla měřena pomocí kaliperu a to každý druhý den. Objem nádoru se spočítal podle vzorce $V = \pi/6 * A * B^2$, kde A značí největší rozměr nádoru (délku) a B nejmenší rozměr nádoru (výšku). Vzorec byl sestaven Li a kol. (Li a kol., 2009).

4.6 Počítání plicních metastáz

Po usmrcení myši se vypitvaly plíce a nechaly se zakonzervovat v 4% roztoku formaldehydu. Poté se prohlédly pod binolupou a spočítalo se množství metastatických ložisek, které vypadají jako černé tečky.

4.7 Izolace neutrofilů z kostní dřeně

Myš byla zabita strhnutím vazů a byly z ní vypitvány stehenní a holenní kosti. Oba konce každé kosti byly odstřiženy a pomocí 5 ml injekční stříkačky s jehlou 26G z nich byla vypláchnuta kostní dřeň. K výplachu bylo použito RPMI 1640 s 10% FCS. Poté byla kostní dřeň rozsuspendována pomocí pipety se špičkou a přefiltrována přes filtr o velikosti pórů 70 μm . Přefiltrovaná suspenze byla centrifugována 10 min při 4°C a 150g. Následně se provedla lýza erytrocytů tak, že po slití supernatantu se k buňkám přidal roztok NH_4Cl a směs byla promíchána. Po dvou minutách byla erytolýza zastavena přidáním 10 ml RPMI 1640 s 10% FCS (Stassen a kol., 2006).

Buňky se počítaly v Bürkerově komůrce s použitím trypanové modři a vlastní izolace neutrofilů pak byla provedena podle návodu z komerčně dodaného kitu Neutrophil isolation kit. Tento kit je založen na magnetické separaci, kdy nežádoucí buňky jsou magneticky značeny protilátkou a při průchodu speciální kolonkou umístěnou v magnetickém poli jsou zachyceny v kolonce, zatímco požadované buňky – neutrofilové - jsou neoznačené a kolonkou projdou bez zachycení. Jedná se o tzv. negativní selekci. Tato metoda byla vyvinuta firmou Miltenyi Biotec.

Pro dosažení vyšší výtěžnosti neutrofilů se ukázalo jako vhodné před vlastní magnetickou separací na kolonku vložit preseparační filtr o velikosti pórů 30 μm . Filtr pomohl zachytit nečistoty a větší částice, které jinak způsobovaly ucpávání kolonky. Také vynechání lýzy erytrocytů do značné míry zvyšovalo výtěžnost, protože při provedení lýzy

se v suspenzi objevovaly části lyzovaných erytrocytů, které taktéž bránily průchodu směsi kolonkou. Touto optimalizací se podařilo zvýšit výtěžnost neutrofilů ze 4 milionů/myš na 10 milionů/myš.

4.8 Priming neutrofilů

Priming neutrofilů probíhal dvacet minut v termostatu (37 °C, 5% CO₂ atmosféra) působením GM-CSF (12 ng/ml) a TNF- α (2,5 ng/ml), případně i laminarinu s výslednou koncentrací 2 μ M. Na 1 ml suspenze neutrofilů bylo přidáno 1,2 μ l GM-CSF, 1,25 μ l TNF- α a 1 μ l laminarinu. Cytokiny GM-CSF a TNF- α dokáží z tzv. spících neutrofilů vytvořit primované neutrofile, které se po aktivaci různými signály snadněji zapojují do zabíjení (Hallett a Lloyds, 2010). Laminarin jakožto rozpustný beta-glukan může naaktivovat CR3 (Hong a kol., 2004).

4.9 Sonikace

Suspenze buněk byla sonikována na přístroji HIELSCHER VP200S s 6 mm sondou a zahrnovala 10 cyklů, kdy v každém cyklu probíhala 10 s sonikace a následovalo 20 s chlazení.

4.10 Analýza dat

Data byla statisticky zpracována v programu STATISTICA 12. Grafy sledující přežívání myší byly vyhodnoceny pomocí testu Log-rank. Statistická významnost byla určena pomocí ANOVY nebo Studentova t-testu.

Průměrná redukce nádorového růstu byla vypočtena podle následujícího vzorce:

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

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 průměrnou redukcí nádorového růstu (%).

4.11 Příprava terapeutických látek

Příprava roztoků Imiquimodu

Nejprve bylo 5 mg Imiquimodu předrozpuštěno v 50 μ l DMSO a poté byl vytvořen roztok imiquimodu v PBS o koncentraci 5 mg/ml.

Příprava roztoků Resiquimodu (Resiquimod HCl)

Pro terapeutické použití byl připraven resiquimod ve formě hydrochloridu smícháním 1,5 mg Resiquimodu s 4,2 μ l 3,5% HCl. Příslušné roztoky byly pak připraveny přidavkem PBS nebo PBS obsahujícím další látky (R-837, manan-SMCC, manan-SMCC + Poly I:C, manan-SMCC + ZM241385, manan-SMCC + Poly I:C + ZM241385).

Příprava manan-SMCC

12 ml 0,296 mM roztoku aminovaného mananu se smíchalo s 1,188 mg SMCC rozpuštěném v DMSO a nechalo se inkubovat 40 minut při pokojové teplotě. Přes noc byla provedena dialýza ve střevě o MWCO 3500 proti PBS při 4 °C. Po úpravě kondenzace byl získán 0,2 mM roztok manan-SMCC v PBS.

Příprava *Mycobacterium tuberculosis*-SMCC

20 mg *M. tuberculosis* v 4 ml PBS bylo smícháno s 1 mg SMCC rozpuštěným v 50 μ l DMSO a nechalo se inkubovat 40 minut při pokojové teplotě. Přes noc byla provedena dialýza ve střevě o MWCO 3500 proti PBS při 4 °C.

Příprava směsi *Mycobacterium tuberculosis*-SMCC s mananem-SMCC

20 mg *M. tuberculosis* bylo smícháno s 4 ml 0,2 mM roztoku mananu-SMCC a s 1 mg SMCC rozpuštěným v 50 μ l DMSO. Další postup byl stejný jako u přípravy *M. tuberculosis*-SMCC.

Příprava f-MLFKK-BAM a H-MLFKK-BAM

Vazby BAM (obsahující jeden alifatický řetězec) na aminoskupinu f-MLFKK (H-MLFKK) byla provedena při pH 7,3 podle Kato a kol. (Kato a kol., 2004). Během jedné hodiny za pokojové teploty zreagovala N-hydroxysukcinimidová skupina BAM s aminoskupinou lysinu. Získaný roztok (v PBS) byl uchováván při 200 °C.

4.12 Pokusy

4.12.1 Terapie melanomu pomocí náhrad LPS

V prvním experimentu bylo použito 18 myší, které byly po injekci melanomových buněk rozděleny do tří skupin (A, B, K) po šesti myších. Dvanáctý den po transplantaci došlo k zahájení léčby (den 0). Každá skupina byla léčena jinou terapeutickou látkou. Každá myš byla umístěna do jednoho boxu.

Skupiny myší podle terapeutika:

A) R-837 (5 mg/ml PBS)

B) směs R-837 (0,25 mg/ml PBS) a R-848 (0,25 mg/ml PBS)

K) PBS (kontrola)

Terapeutika byla aplikována intratumorálně u všech skupin vždy v množství 50 μ l na myš a v pulzním režimu. Pulzní režim znamená, že léčiva byla podávána ve dnech 0, 1, 2, ... 8, 9, 10. Velikost nádorů byla měřena od 0. dne každý druhý den až do dne 14. Tento den byly myši usmrceny stržením vazů a po vyjmutí plic v nich byly spočítány metastázy.

4.12.2 Potlačení zpětnovazebné inhibice pomocí ZM241385

V tomto experimentu bylo použito 30 myší, které byly po injekci melanomových buněk rozděleny do pěti skupin (A, B, C, D, E) po šesti myších. Dvanáctý den po transplantaci došlo k zahájení léčby (den 0). Každá skupina byla léčena jinou terapeutickou látkou. Myši byly chovány po třech ve sterilním prostředí a vzájemně odlišeny ustřížením konců uší.

Skupiny myší podle terapeutika:

A) Roztok 0,5 mg R-848.HCl v 0,2 mM mannan-SMCC v PBS

B) Roztok 0,5 mg R-848.HCl a 0,5 mg POLY:IC v 0,2 mM mannan-SMCC v PBS

C) Roztok 0,5 mg R-848.HCl a 0,5 mg ZM241385 v 0,2 mM mannan-SMCC v PBS (ZM241385 podáván až od 8. dne)

D) Roztok 0,5 mg R-848.HCl, 0,5 mg POLY I:C a 0,5 mg ZM241385 v 0,2 mM mannan-SMCC v PBS (ZM241385 podáván až od 8. dne)

E) PBS (kontrola)

Hodinu před vlastním podáním terapeutika bylo myším do nádoru aplikováno 50 µl 50 mM roztoku TCEP v PBS. TCEP je redukční činidlo působící na disulfidické můstky cystinu buněčných membrán, jehož účinkem vzniká -SH skupina. Přítomnost -SH skupiny zajistí vazbu SMCC na membrány (Christiaansen a kol., 1984). Terapeutika byla aplikována intratumorálně u všech skupin vždy v množství 50 µl na myš. Aplikace probíhala v pulsech ve dnech 0, 1, 2, .. 8, 9, 10, .. 16,17,18, .. 24, 25, 26. Velikost nádorů byla měřena od 0. dne každý druhý den až do 30. dne. Po ukončení léčby byl sledován růst nádorů a doba přežití myší.

4.12.3 Terapie melanomu pomocí *Mycobacterium tuberculosis*

Pro tento pokus bylo použito 30 myší, které byly po injekci melanomových buněk rozděleny do pěti skupin (A, B, C, D, E) po šesti myších. Dvanáctý den po transplantaci došlo k zahájení léčby (den 0). Každá skupina byla léčena jinou terapeutickou látkou. Každá myš byla umístěna do jednoho boxu.

Skupiny myší podle terapeutika:

- A) *Mycobacterium tuberculosis* (5 mg/ml PBS)
- B) *Mycobacterium tuberculosis*-SMCC (5 mg/ml PBS)
- C) 0,2 mM manan-SMCC v PBS
- D) suspenze 5 mg *Mycobacterium tuberculosis*-SMCC/ml 0,2 mM manan-SMCC v PBS
- E) PBS (kontrola)

Hodinu před vlastním podáním terapeutika bylo myším ze skupiny A a E do nádoru aplikováno 50 µl PBS a myším ze skupiny B, C a D 50 µl 50 mM roztoku TCEP v PBS. Terapeutika byla aplikována intratumorálně u všech skupin vždy v množství 50 µl na myš a v pulzním režimu 0, 1, 2, ... 8, 9, 10. Velikost nádorů byla měřena od 0. dne každý druhý den až do dne 14. Po ukončení léčby byl sledován růst nádorů a doba přežití myší.

4.12.4 Vyhodnocení infiltrace leukocytů v melanomu pomocí průtokové cytometrie po aplikaci *Mycobacterium tuberculosis*-SMCC

V tomto experimentu bylo použito 18 myší. Po injekci melanomových buněk byly myši rozděleny do dvou skupin po devíti dle terapeutické látky (PBS a *Mycobacterium tuberculosis*-SMCC). Myši byly chovány po třech ve sterilním prostředí a vzájemně odlišeny

ustřížením konců uší. Dvanáctý den od transplantace melanomových buněk (čas 0) bylo intratumorálně aplikováno 50 µl terapeutika na myš. Hodinu před vlastním podáním terapeutika bylo myším do nádoru aplikováno 50 µl roztoku TCEP v PBS. Po 12, 24 a 48 hodinách od aplikace terapeutika byly vždy v každé skupině usmrceny tři myši. Pro negativní kontrolu byly použity další tři myši, kterým nebylo aplikováno nic.

Po změření byly myším vyjmuty nádory, z nichž byly opláchnuty nečistoty pomocí RPMI 1640. Nádory se rozstříhaly na malé části a umístily do RPMI 1640 s obsahem Liberázy DL (0,33 mg/ml) a DNázy I (0,2 mg/ml). Takto se nechaly hodinu inkubovat při 37 °C za mírného třepání a pak proběhla 10 minutová centrifugace (4 °C/160g). Supernatant byl odebrán a zamrazen pro další použití. K vzniklému peletu bylo přidáno PBS a celá suspenze byla nalita na sítko se 70 µm póry. Zhomogenizovaná suspenze se opět nechala 10 minut centrifugovat (4 °C/160g) a pelet se doplnil do objemu 0,5 ml pomocí PBS.

Do destičky s U dnem bylo pipetováno 10 µl této suspenze na jamku – suspenze od každého nádoru byla pipetována vždy do tří jamek. Do první ze tří jamek se pak přidalo 10 µl směsi I – směs fluorescenčně značených monoklonálních protilátek ředěných v PBS (viz Tab. 2), do druhé jamky 10 µl směsi II – směs fluorescenčně značených monoklonálních protilátek ředěných v PBS (viz Tab. 2) a třetí jamka se ponechala bez značení jako kontrola pro vyloučení možnosti nespecifického navázání protilátek na povrch buněk.

směs I		směs II	
protilátka	ředění	protilátka	ředění
CD45 PerCP-Cy5.5	200x	CD45 PerCP-Cy5.5	200x
CD3e FITC	100x	CD3e FITC	100x
CD4 APC;	100x	Ly-6G Alexa Fluor 700	100x
CD8a PE-Cy7	100x	CD19 APC	100x
NK1.1 PE	100x	F4/80 PE-Cy7	100x

Tab. 2: Směsi fluorescenčně značených monoklonálních protilátek

Po napipetování směsí monoklonálních protilátek se destička nechala inkubovat 20 minut při 4 °C a pak byla promyta PBS a centrifugována 2 minuty (4 °C/424g). Po odstranění supernatantu bylo do každé jamky přidáno 140 µl PBS a 10 µl kalibračních kuliček, které se používají ke zjišťování absolutního počtu buněk ve vzorku. Vlastní měření proběhlo na průtokovém cytometru BD FACS Canto II flow citometr (BD Biosciences). Nastavení přístroje je uvedeno v Tab. 3. Bylo měřeno 20 000 událostí a výsledky

analyzovány v programu BD FACSDiva verze 6.1.3. Výsledné hodnoty byly vztaženy na objem nádorové tkáně.

Nastavení laserů		Nastavení HTS	
Windows extension	2,0	Sample flow rate	1,0
FSC Area Scaling	0,8	Sample Volume (μl)	30,0
Laser Delay Blue	0,0	Mixing Volume (μl)	100,0
Laser Delay Red	30,0	Mixing Speed	100,0
Area Scaling Blue	0,8	Number of Mixes	3,0
Area Scaling Red	1,3	Wash Volume (μl)	400,0

Tab. 3: Nastavení průtokového cytometru

4.12.5 Stanovení aktivity MPO v mezibuněčném prostoru nádorové tkáně po aplikaci *Mycobacterium tuberculosis*-SMCC

4.12.5.1 Příprava vzorků

Pro stanovení aktivity MPO uvolněné do prostoru se využily supernatanty získané při přípravě pokusu 4.12.4. (Postup získání supernatantů viz kapitola 4.12.4).

4.12.5.2 Stanovení aktivity MPO

Stanovení aktivity uvolněné MPO bylo provedeno pomocí soupravy MPO Fluorometric Activity Assay Kit. Postupovalo se podle přiloženého návodu. Princip tohoto testu spočívá v tom, že enzym MPO katalyzuje tvorbu kyseliny chlorné reagující se substrátem (aminofenyl fluorescein) za tvorby fluoresceinu ($\lambda_{ex} = 485 / \lambda_{em} = 525$ nm). Florescence byla měřena v pětiminutových intervalech po dobu 60 minut.

Aktivita MPO byla vypočtena tak, že pomocí kalibrační křivky se odečetlo množství fluoresceinu uvolněného v počátečním a konečném čase. Rodíl těchto hodnot za určitou časovou jednotku pak představuje aktivitu MPO. Aktivita je tedy uváděna v pmol/min, což jsou mikrojednotky. Jedna jednotka MPO je množství enzymu, které oxiduje substrát při zisku 1 μmol fluoresceinu za 1 minutu při pokojové teplotě.

4.12.6 Studium cytotoxické schopnosti neutrofilů *in vitro* s použitím f-MLFKK-BAM

4.12.6.1 Ověření cytotoxicity f-MLFKK-BAM na nádorové buňky

Melanomové buňky byly získány stejně jako v případě přípravy pro transplantaci (viz kapitola 4.4) a byly naředěny na koncentraci 1 000 000 buněk/ml media (RPMI 1640 s 10% FCS). Do šesti jamek destičky s U dnem bylo napipetováno 100 μ l této suspenze (100 tisíc buněk na jamku). Do prvních třech jamek se přidalo 100 μ l směsi PBS a RPMI 1640 s 10% FCS (v poměru 1 díl PBS + 4 díly RPMI 1640 s 10% FCS), do dalších třech 100 μ l 0,1 mM roztoku f-MLFKK-BAM. Destička se nechala inkubovat půl hodiny v termostatu (37 °C, 5% CO₂ atmosféra) a posléze se stočila (2 min, 4°C, 424G). Supernatant byl odstraněn. Jamky pak byly jednou promyty 200 μ l RPMI 1640 s 10% FCS, opět následovalo stočení destičky za stejných podmínek a odstranění supernatantu. Do všech jamek bylo přidáno 200 μ l RPMI 1640 s 10% FCS, destička se nechala inkubovat 2 hodiny v termostatu (37 °C, 5% CO₂ atmosféra) a po inkubaci se spočítalo množství nádorových buněk v Bürkerově komůrce s pomocí trypanové modři.

4.12.6.2 Ověření cytotoxické schopnosti neutrofilů s použitím f-MLFKK-BAM

K pokusu bylo zapotřebí připravit si dvoje buňky – nádorové buňky B16F10 a neutrofilů izolované z kostní dřeně. Příprava nádorových buněk proběhla obdobně jako u *in vivo* pokusů (viz kapitola 4.4) jen s tím rozdílem, že koncentrace buněk byla upravena na 1 000 000 buněk/ml media (RPMI 1640 s 10% FCS). Izolace neutrofilů byla provedena výše popsaným postupem (viz kapitola 4.7) a jejich koncentrace byla upravena na 1 250 000/ml media (RPMI 1640 s 10% FCS). Experiment byl prováděn v tripletech v destičce s U dnem.

Do jamek destičky se nejprve napipetovalo 100 μ l připravené suspenze nádorových buněk a 100 μ l roztoku f-MLFKK-BAM. Pro navázání f-MLFKK-BAM byla vytvořena jeho 0,05 mM koncentrace. Do jamek bez roztoku f-MLFKK-BAM bylo umístěno 100 μ l směsi PBS a RPMI 1640 s 10% FCS (v poměru 1 díl PBS + 9 díly RPMI 1640 s 10% FCS). Destička se nechala inkubovat půl hodiny v termostatu (37 °C, 5% CO₂ atmosféra) a posléze se stočila (4°C, 424G). Supernatant byl z jamek odstraněn. Jamky pak byly jednou promyty 200 μ l RPMI 1640 s 10% FCS, opět následovalo stočení destičky za stejných podmínek

a odstranění supernatantu. Poté se připipetovalo 200 µl neutrofilů a do jamek bez neutrofilů bylo přidáno 200 µl RPMI 1640 s 10% FCS. Výsledný poměr nádorových buněk a neutrofilů v jamce tedy byl 1: 2,5. Schéma experimentu je znázorněno v Tab. 4.

buňky	vazba f-MLFKK-BAM	neutrofilly
B16F10	+	+
B16F10	-	+
B16F10	-	-

Tab. 4: Schéma experimentu

Destička se nechala inkubovat 2 hodiny v termostatu a po inkubaci se spočítalo množství nádorových buněk v Bürkerově komůrce s pomocí trypanové modři.

4.12.6.3 Ověření cytotoxické schopnosti neutrofilů s použitím f-MLFKK-BAM (při vyšším poměru neutrofilů k nádorovým buňkám)

Experiment byl proveden podobně jako experiment 4.12.6.2 až na následující rozdíly. Koncentrace neutrofilů byla upravena na 2 500 000 buněk/ml media, takže výsledný poměr nádorových buněk k neutrofilům byl 1: 5. Pro navázání f-MLFKK-BAM byla vytvořena jeho 0,1 mM koncentrace. Byl navázán také H-MLFKK-BAM (pipetováno 100 µl o koncentraci 0,1 mM) jako kontrola negativní vazby. Tento pokus byl navíc oproti předchozímu rozšířen o studium vlivu volného f-MLF (přidán na výslednou 0,05 mM koncentraci k nádorovým buňkám s neutrofilly) a byla přidána i pozitivní kontrola (PMA) na výslednou koncentraci 10 ng/ml k nádorovým buňkám s neutrofilly. Připipetování 10 µl roztoku f-MLF a 5 µl PMA se provedlo těsně před závěrečnou inkubací. Schéma experimentu zobrazuje Tab. 5.

Buňky	vazba	f-MLF	neutrofilly
B16F10	f-MLFKK-BAM	-	+
B16F10	H-MLFKK-BAM	-	+
B16F10	-	+	+
B16F10	-	-	+
B16F10	-	-	-
B16F10	-	-*	+

Tab. 5: Schéma experimentu

*přidán PMA jako pozitivní kontrola

Po závěrečné inkubaci se z vrchu opatrně odebralo 60 µl z každé jamky a zamrazilo se pro další použití. Zbytek se v destičce rozsuspendoval, destička se stočila (2 min, 4 °C, 424G) a 60 µl supernatantu se znovu odebralo a zamrazilo pro další použití. Ke stočeným buňkám se přidalo 120 µl PBS a spočítalo se množství nádorových buněk v Bürkerově komůrce s pomocí trypanové modři.

4.12.6.4 Ověření cytotoxické schopnosti primovaných neutrofilů s použitím f-MLFKK-BAM

Experiment byl proveden stejně jako předchozí (viz 4.12.6.3.) jen s tím rozdílem, že kromě nepřimovaných neutrofilů byly použity i neutrofilové primované GM-CSF a TNF- α . Schéma experimentu viz Tab. 6.

buňky	vazba	f-MLF (volné)	neutrofilové
B16F10	f-MLFKK-BAM	-	+
B16F10	H-MLFKK-BAM	-	+
B16F10	-	+	+
B16F10	-	-	+
B16F10	-	-	-
-	-	-	+
B16F10	f-MLFKK-BAM	-	+ (primované)
B16F10	H-MLFKK-BAM	-	+ (primované)
B16F10	-	+	+ (primované)
B16F10	-	-	+ (primované)
-	-	-	+ (primované)
B16F10	-	-*	+

Tab. 6: Schéma experimentu

*přidán PMA jako pozitivní kontrola

Po závěrečné inkubaci nebyly odebírány supernatanty, ale spočítaly se jen nádorové buňky a neutrofilové v Bürkerově komůrce s pomocí trypanové modři.

4.12.7 Stanovení množství uvolněné MPO po interakci neutrofilů s melanomovými buňkami a fMLFKK-BAM

Pro stanovení aktivity MPO se využily vzorky získané při přípravě pokusu 4.12.6.3. (Postup získání vzorků viz kapitola 4.12.6.3). Vlastní stanovení se provedlo dle kapitoly 4.12.5.2.

4.12.8 Studium cytotoxické schopnosti neutrofilů *in vitro* s použitím *Mycobacterium tuberculosis*-SMCC

K pokusu bylo zapotřebí připravit si dvoje buňky – nádorové buňky B16F10 a neutrofilu izolované z kostní dřeně. Příprava nádorových buněk proběhla obdobně jako u *in vivo* pokusů je s tím rozdílem, že koncentrace buněk byla nejprve upravena na 2 000 000 buněk/ml media (RPMI 1640 s 10% nedeaktivovaným FCS). (K vlastnímu pokusu bylo zapotřebí nižší koncentrace nádorových buněk – 1 000 000 buněk/ml, ale protože během další manipulace s buňkami byl pozorován jejich úhyn, byl na začátku připraven raději nadbytek buněk.) Nádorové buňky byly posléze rozděleny na dvě části a stočeny 10 min při 4 °C a 150G. K prvnímu sedimentu byl přidán 5 mM roztok DTT v PBS, který působí jako redukční činidlo a umožňuje vazbu SMCC na membránu nádorových buněk. K druhému sedimentu bylo přidáno PBS a obě zkumavky se nechaly hodinu na ledu. Po hodině se provedla centrifugace (10 min při 4 °C a 150G) a koncentrace nádorových buněk v každé zkumavce byla upravena na 1 000 000 buněk /ml.

Izolace neutrofilů byla provedena výše popsáním postupem (viz kapitola 4.7) a jejich koncentrace byla upravena na 2 500 000/ml media (RPMI 1640 s 10% nedeaktivovaným FCS). K primingu neutrofilů bylo použito GM-CSF, TNF- α a laminarin.

Mycobacterium-tuberculosis-SMCC bylo připraveno podobně jako pro *in vivo* pokusy (viz kapitola 4.11) jen s tím rozdílem, že pro *in vitro* pokusy bylo použito desetkrát zředěnější – tedy 0,5 mg/ ml PBS.

Nyní bylo možno přejít k vlastnímu pokusu. Experiment probíhal v tripletech v destičce s U dnem. Do jamek destičky se nejprve napipetovalo 100 μ l připravené suspenze nádorových buněk. V další kroku se destička stočila (2 min, 4 °C, 424G) a supernatant byl odstraněn. K sedimentu bylo připipetováno 10 μ l suspenze s volnou nebo vázanou bakterií. Do jamek bez bakterie bylo umístěno 10 μ l PBS. Po 30 minutové inkubaci v termostatu (37 °C, 5% CO₂ atmosféra) bylo přidáno 200 μ l suspenze primovaných neutrofilů

a do jamek bez neutrofilů 200 µl RPMI 1640 s 10% nedeaktivovaným FCS. Schéma experimentu je znázorněno v Tab. 7.

buňky	redukce	vazba <i>M. tuberculosis</i> -SMCC	volné <i>M. tuberculosis</i>	primované neutrofilly
B16F10	+	+	-	-
B16F10	+	+	-	+
B16F10	-	-	-	-
B16F10	-	-	-	+
B16F10	-	-	+	-
B16F10	-	-	+	+

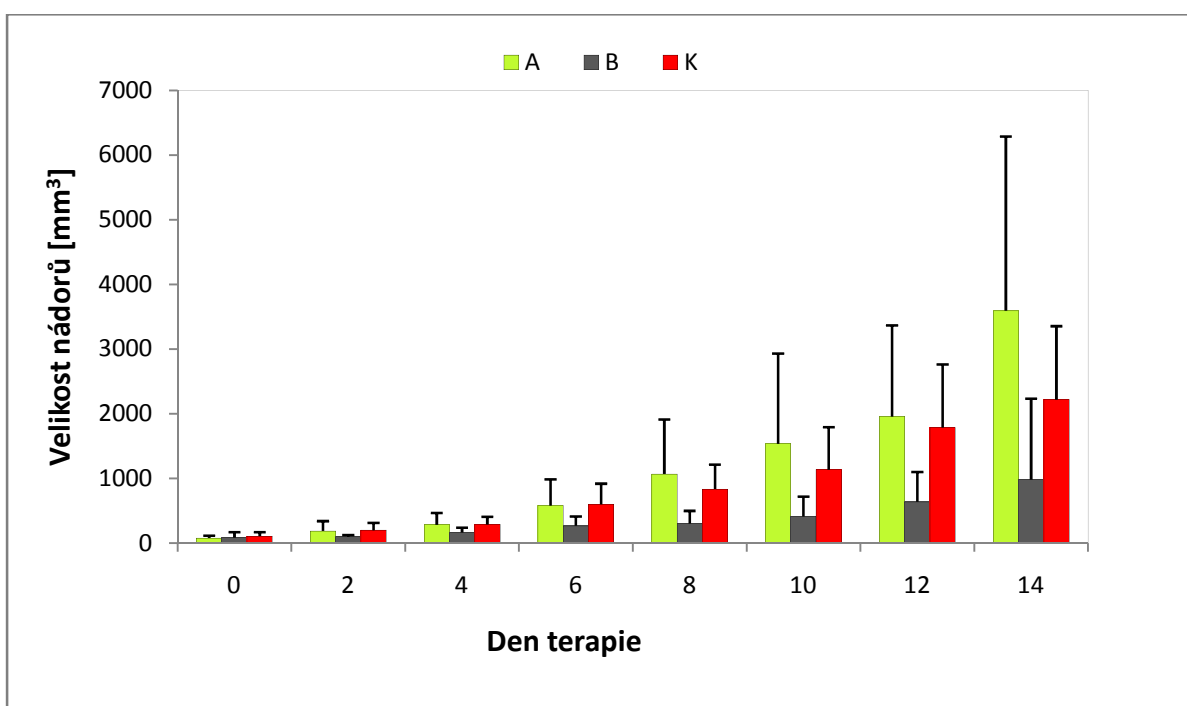
Tab. 7: Schéma experimentu

Destička se nechala inkubovat 2 hodiny v termostatu (37 °C, 5% CO₂ atmosféra) a po inkubaci se počítalo se množstvím neutrofilů a nádorových buněk v Bürkerově komůrce s pomocí trypanové modři.

5 Výsledky

5.1 Terapie melanomu pomocí náhrad LPS

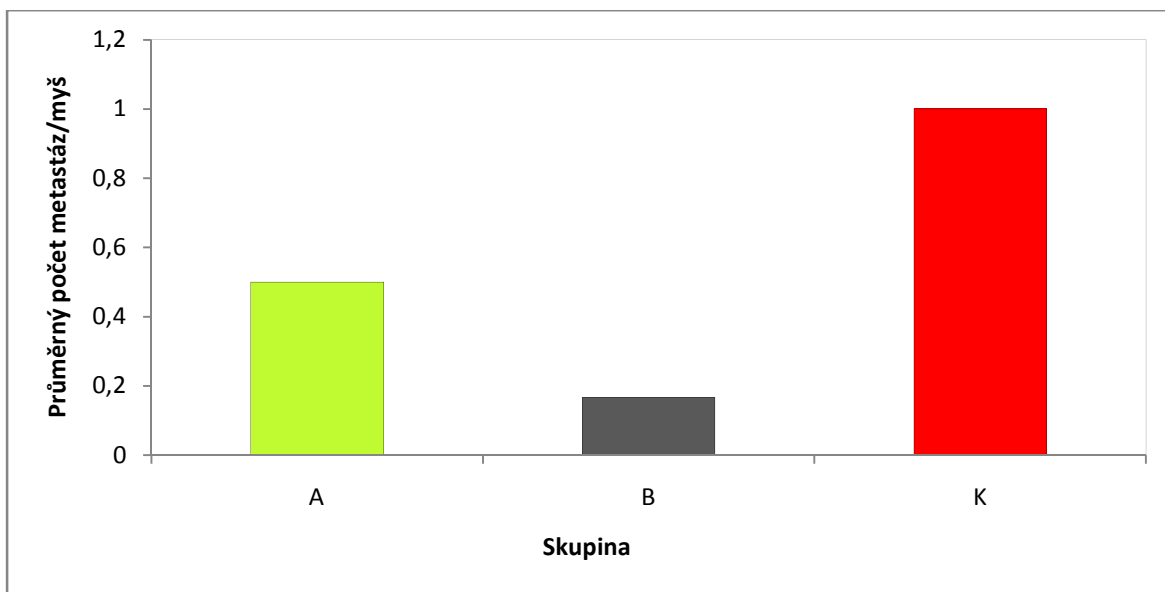
První z pokusů představuje začátky hledání vhodné náhrady LPS v léčbě melanomu. Byl zde vyzkoušen účinek Imiquimodu a kombinace Imiquimodu a Resiquimodu. Na Obr. 5 je znázorněn vliv léčby na redukci růstu melanomu a je zřejmé, že zatímco samotný Imiquimod (skupina A, zelená barva) nevykazuje žádné účinky, kombinace Imiquimodu a Resiquimodu (skupina B, šedivá barva) růst nádorů redukuje. Tato redukce ale není statisticky významná.



Obr. 5: Vliv terapie na redukci růstu nádoru

A) R-837 B) kombinace R-837 a R-848 K) PBS (kontrola)

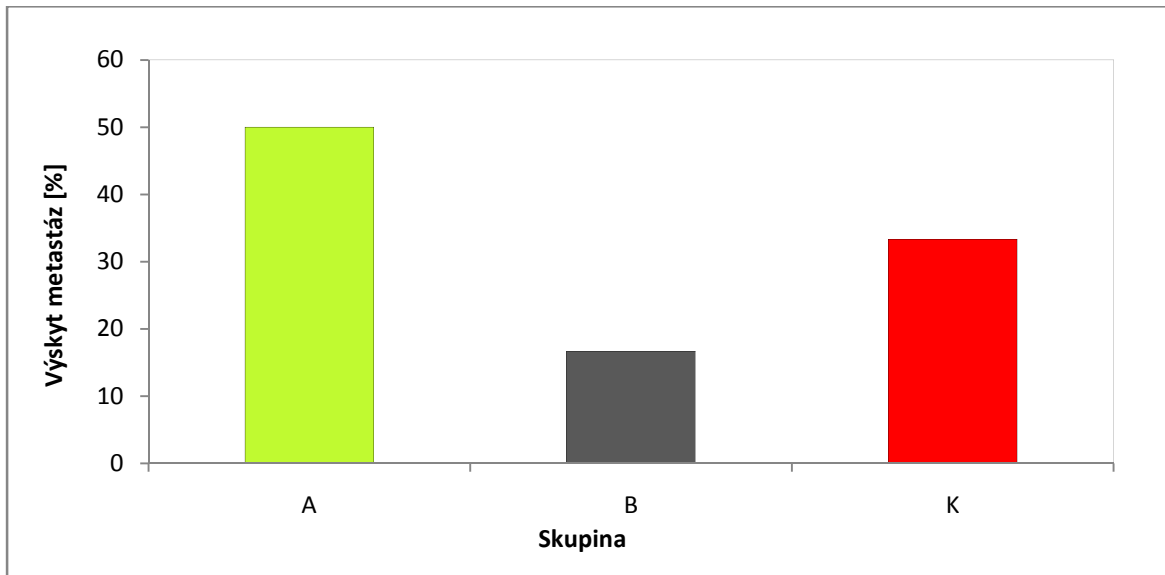
Obr. 6 znázorňuje průměrný počet metastáz na myš. Nejméně metastáz se vyskytovalo u myší léčených kombinací Imiquimodu a Resiquimodu (skupina B, šedivá barva).



Obr. 6: Průměrný počet metastáz na myš u jednotlivých skupin

A) R-837 **B)** kombinace R-837 a R-848 **K)** PBS (kontrola)

Na Obr. 7 je uveden výskyt metastáz v procentech. U skupiny léčené kombinací Imiquimodu a Resiquimodu se metastázy objevily jen u jedné myši (skupina B, šedivá barva).

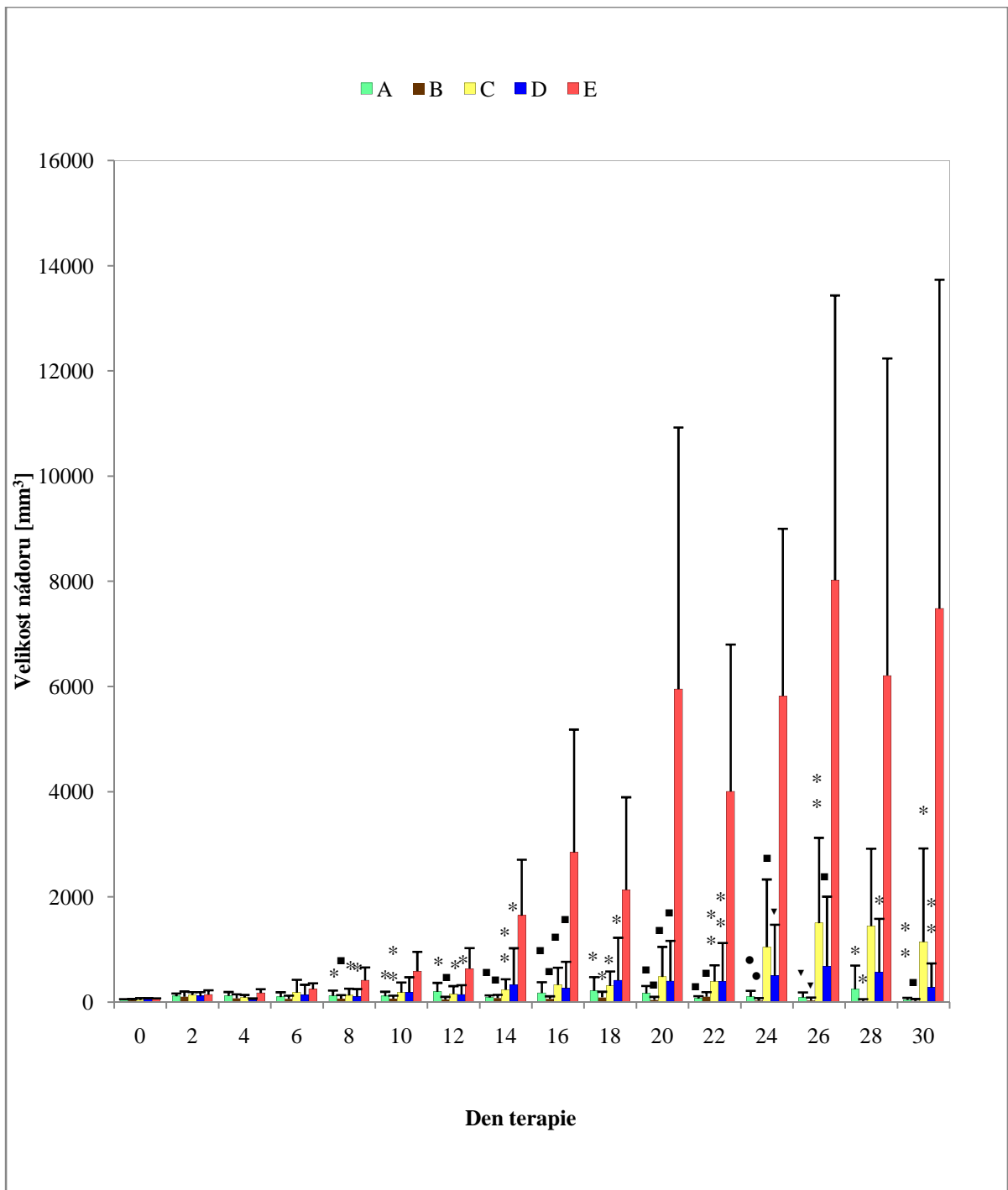


Obr. 7: Výskyt metastáz u jednotlivých skupin myší

A) R-837 **B)** kombinace R-837 a R-848 **K)** PBS (kontrola)

5.2 Potlačení zpětnovazebné inhibice pomocí ZM241385

Cílem druhého pokusu bylo potlačit možné zpětné uvolňování adenosinu z nekrotizovaných tkání pomocí ZM241385. Jako náhrady za LPS byly tentokrát vybrány látky R-848 a Poly I:C. Na Obr. 8 vidíme účinky terapeutik. Směs mannan-SMCC a R-848 (skupina A, zelená barva) a směs mannan-SMCC, R-848 a POLY I:C (skupina B, hnědá barva) vykazují od osmého dne výrazně statisticky signifikantní účinek vzhledem ke kontrolní skupině (skupina E, červená barva). Skupina C (žlutá barva) a skupina D (modrá barva), kde byl navíc od 8. dne podáván ZM241385, mají rovněž velmi signifikantní vliv na redukci růstu nádoru, ale v porovnání s předchozími dvěma skupinami zde dochází k zeslabení celého efektu.



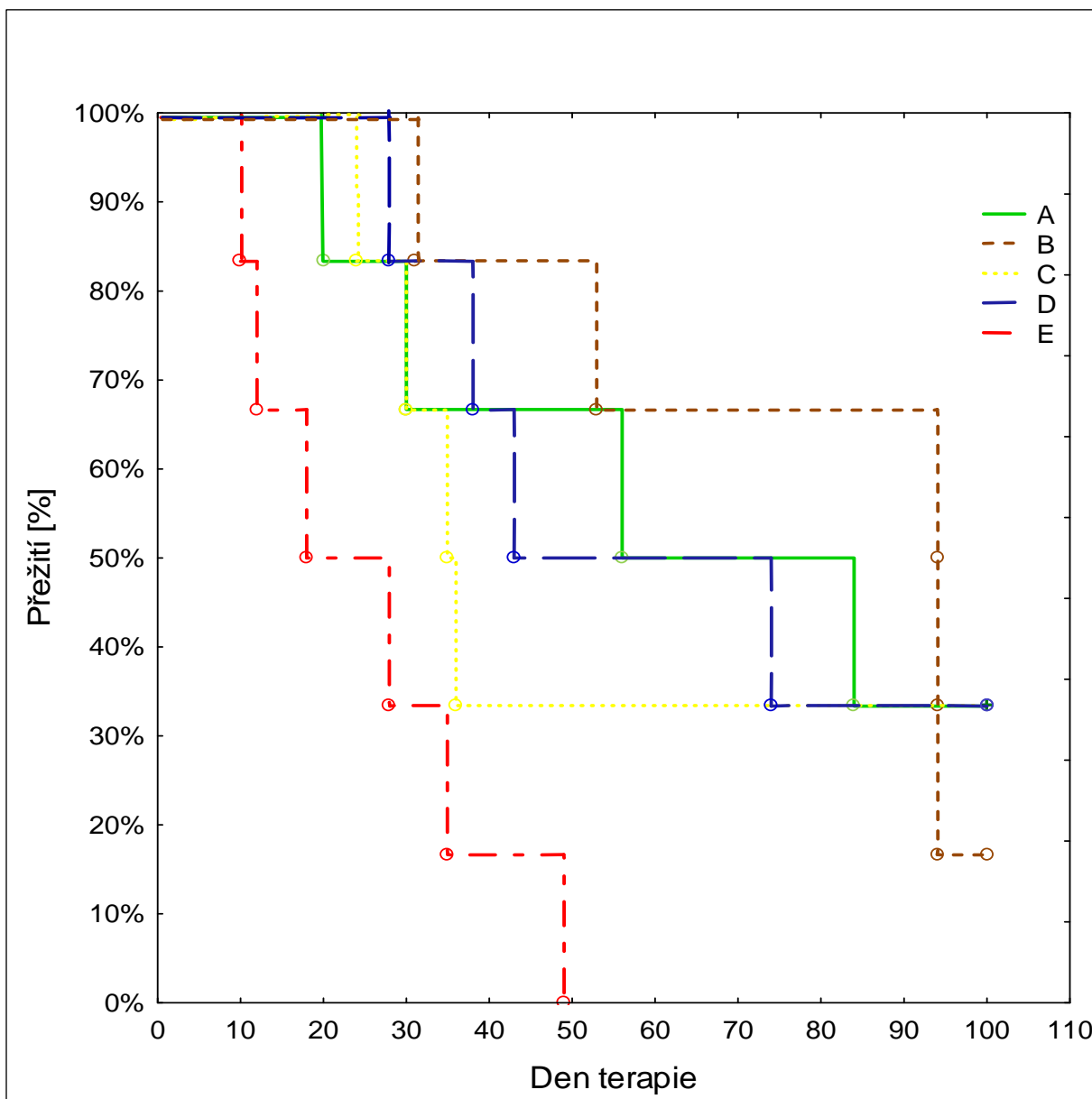
Obr. 8: Vliv terapie na redukci růstu nádoru

A) směs mannan-SMCC a R-848 B) směs mannan-SMCC, R-848 a POLY I:C C) směs mannan-SMCC, R-848 a ZM241385 D) směs mannan-SMCC, R-848, POLY I:C a ZM241385 E) PBS (kontrola)

* $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, ■ $P \leq 0,005$, ▼ $P \leq 0,001$, ● $P \leq 0,0005$ vztaženo ke skupině E

U tohoto pokusu byla sledována doba přežití jednotlivých skupin, která je zachycena na Obr. 9. Nejdéle přežívaly myši ze skupiny B (hnědá přerušovaná čára) a to průměrně 78

dní, což je třikrát více než myši z kontrolní skupiny E (červená přerušovaná čára), které se dožívaly průměrných 25 dní. Také ostatní terapeutika dokázaly prodloužit přežití. Myši ze skupiny A (zelená čára) žily průměrně 65 dní, myši ze skupiny C 54 dní a myši ze skupiny D 64 dní. Statistická významnost prodloužení přežití byla zjištěna u skupin A a B, přičemž hladina signifikance $\leq 0,05$. Hranici 100 dní přežily 2 myši ze skupiny A, 1 myš ze skupiny B, 2 myši ze skupiny C a 2 myši ze skupiny D.



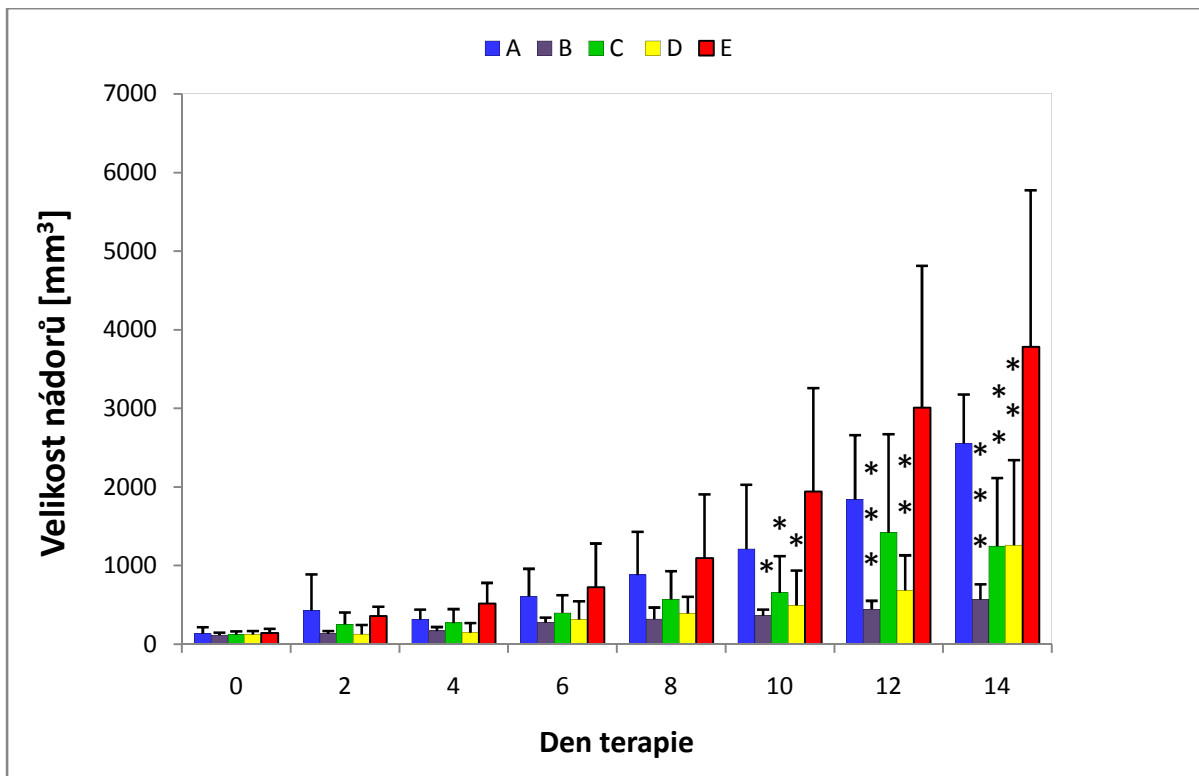
Obr. 9: Vliv terapie na délku přežití

A) směs mannan-SMCC a R-848 B) směs mannan-SMCC, R-848 a POLY I:C C) směs mannan-SMCC, R-848 a ZM241385 D) směs mannan-SMCC, R-848, POLY I:C a ZM241385 E) PBS (kontrola)

U přeživších uzdravených myší z tohoto pokusu byla 120. den od začátku terapie provedena retransplantace nádorových buněk. Celkem pěti myším (2 myši ze skupiny A, 1 myš ze skupiny B a 2 myši ze skupiny D) se znovu injikovalo 400 000 nádorových buněk asi 1 cm od původního místa nádoru a byl sledován růst nádoru. Zatímco myším ze skupiny A nádory vyrostly a jedna uhynula 37. den po retransplantaci, u myší ze skupiny B a D nádory se nádory již neobjevily.

5.3 Terapie melanomu pomocí *Mycobacterium tuberculosis*

Cílem tohoto pokusu bylo vyzkoušet účinek intratumorálně aplikované bakterie *Mycobacterium tuberculosis*. Obr. 10 znázorňuje redukci nádorové masy u jednotlivých terapeutických skupin. Zatímco volné *Mycobacterium tuberculosis* mělo na léčbu jen minimální vliv (skupina A, modrá barva), kotvené *Mycobacterium tuberculosis* (skupina B, fialová barva) vykazovalo nejlepší účinky ze všech skupin. 10, 12 a 14 den došlo u této skupiny k redukci nádorů, která byla statisticky významná vůči kontrolní skupině (skupina E, červená barva). V pokusu byl použit také kotvený manan (skupina C, zelená barva) a kombinace kotvené bakterie a kotveného mananu (skupina D, žlutá barva). I tyto dvě skupiny dosáhly statisticky významného účinku – manan-SMCC ve dnech 10 a 14 a kombinace mananu-SMCC a *Mycobacterium tuberculosis*-SMCC ve dnech 10, 12 a 14. Zajímavé bylo zjištění, že výrazný protinádorový účinek kotvených bakterií nebyl přídavkem manan-SMCC posílen.

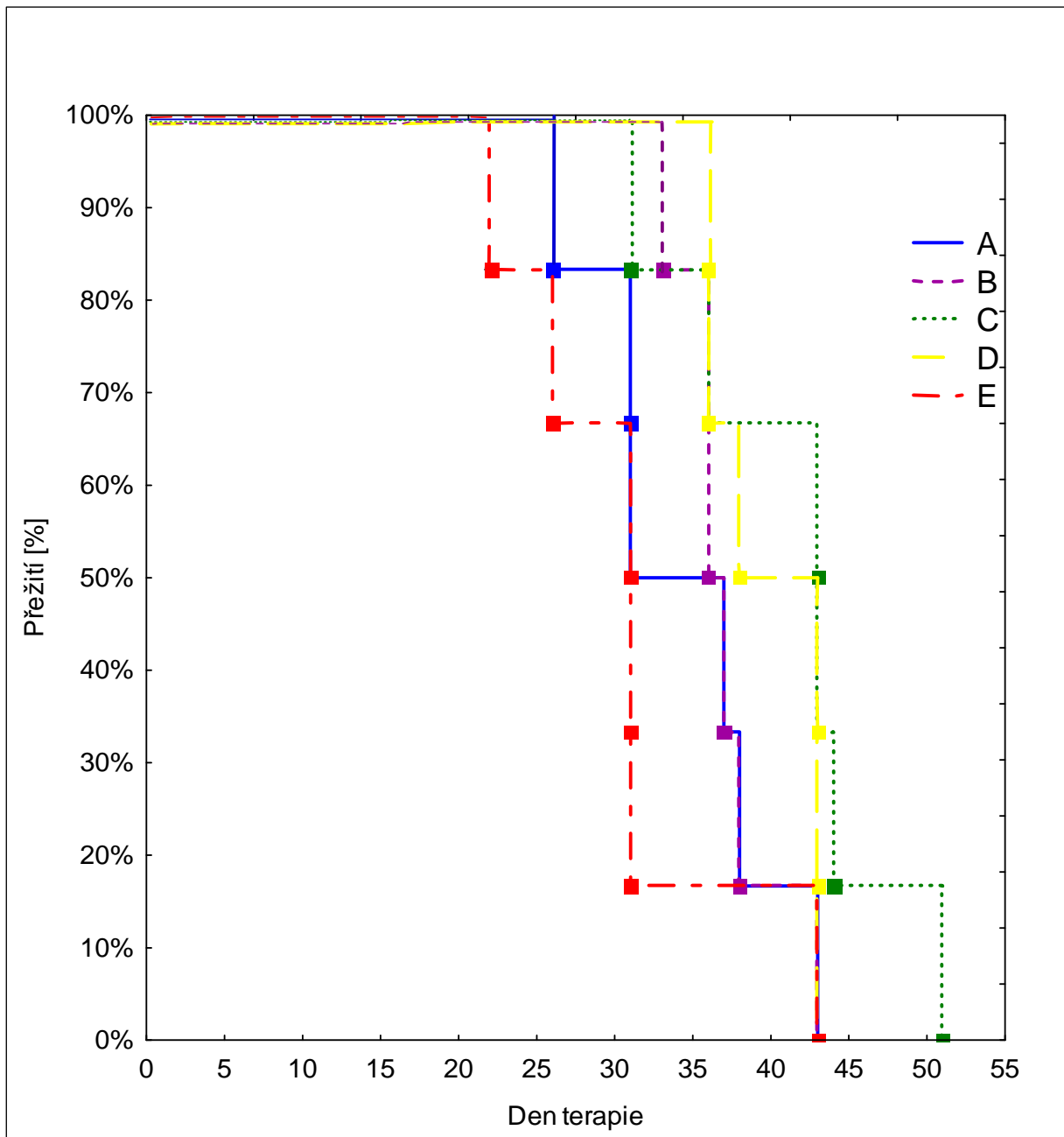


Obr. 10: Vliv terapie na redukci růstu nádoru

A) *Mycobacterium tuberculosis* (5 mg/ml PBS) **B)** *Mycobacterium tuberculosis*-SMCC (5 mg/ml PBS) **C)** manan-SMCC v PBS (0,2 mM) **D)** směs *Mycobacterium tuberculosis*-SMCC (5 mg/ml PBS) a manan-SMCC (0,2 mM) v PBS **E)** PBS (kontrola)

* $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,005$ vztaženo ke skupině E

Obr. 11 pak znázorňuje dobu přežití jednotlivých skupin. Ačkoliv *Mycobacterium tuberculosis*-SMCC a kombinace *Mycobacterium tuberculosis*-SMCC a manan-SMCC signifikantně redukuje nádorovou masu, efekt na prodloužení života myši nebyl zaznamenán. Jen manan-SMCC (skupina C, zelená přerušovaná čára) o trochu prodloužil dobu přežití oproti kontrole (skupina E, červená přerušovaná čára) i ostatním skupinám, ale toto prodloužení nebylo statisticky významné a žádná myš se nedožila hranice 100 dní.

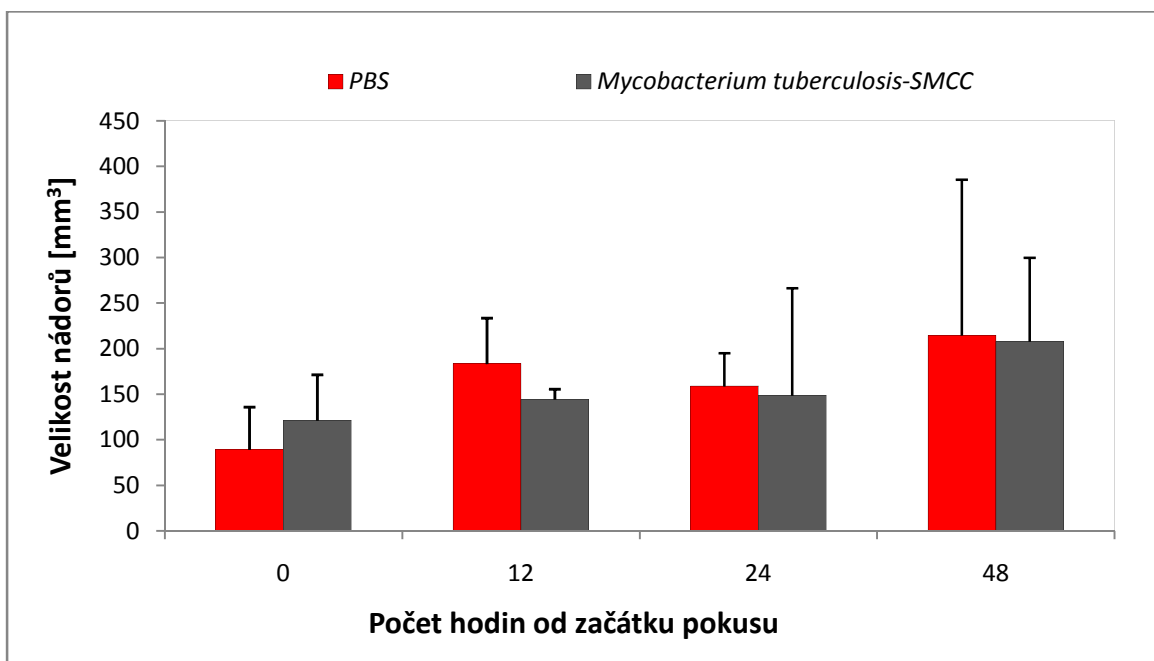


Obr. 11: Vliv terapie na délku přežití

A) *Mycobacterium tuberculosis* (5 mg/ml PBS) **B)** *Mycobacterium tuberculosis*-SMCC (5 mg/ml PBS) **C)** manan-SMCC v PBS (0,2 mM) **D)** směs *Mycobacterium tuberculosis*-SMCC (5 mg/ml PBS) a manan-SMCC (0,2 mM) v PBS **E)** PBS (kontrola)

5.4 Vyhodnocení infiltrace leukocytů v melanomu pomocí průtokové cytometrie po aplikaci *Mycobacterium tuberculosis*-SMCC

Tento pokus nám měl objasnit, které buňky imunitního systému infiltrují nádor a mohou se tak podílet na likvidaci nádorových buněk. Obr. 12 znázorňuje, jak se měnily velikosti nádorů v průběhu pokusu. Nádory myši, kterým bylo aplikováno *Mycobacterium tuberculosis*-SMCC jsou první dny aplikace přibližně stejně velké jako nádory, do kterých bylo aplikováno PBS (kontrola).

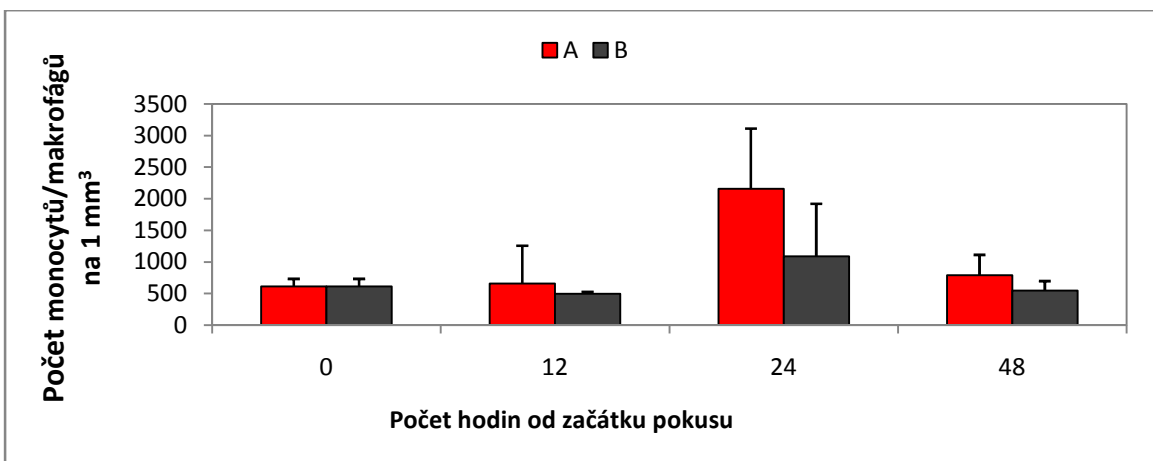
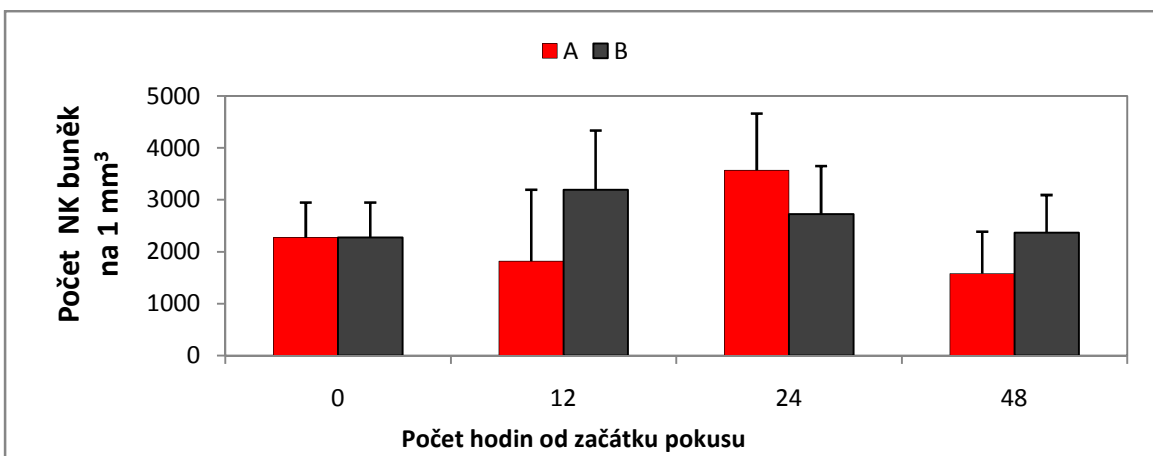
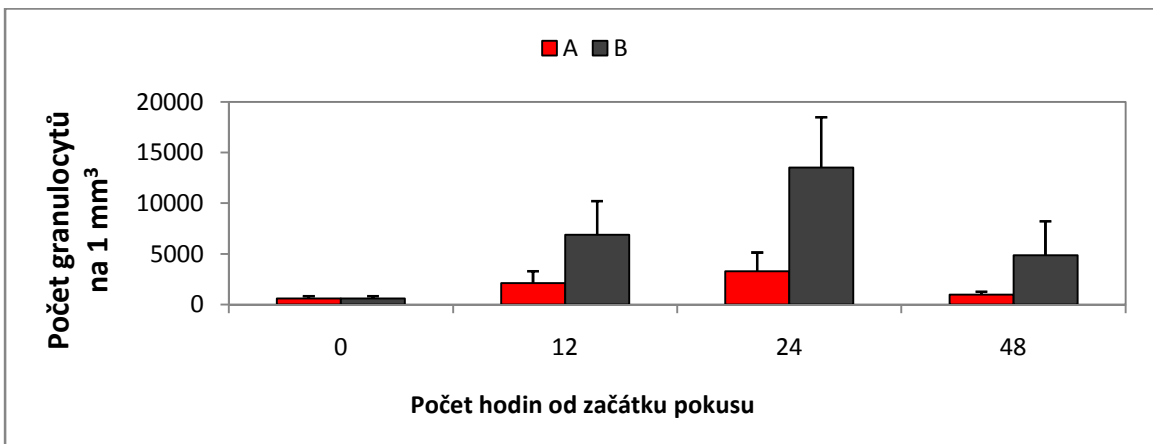
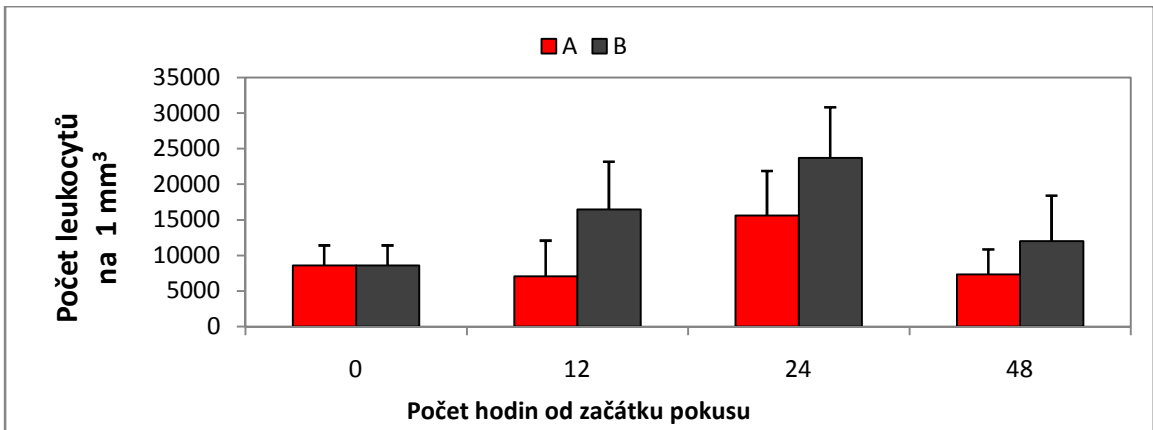


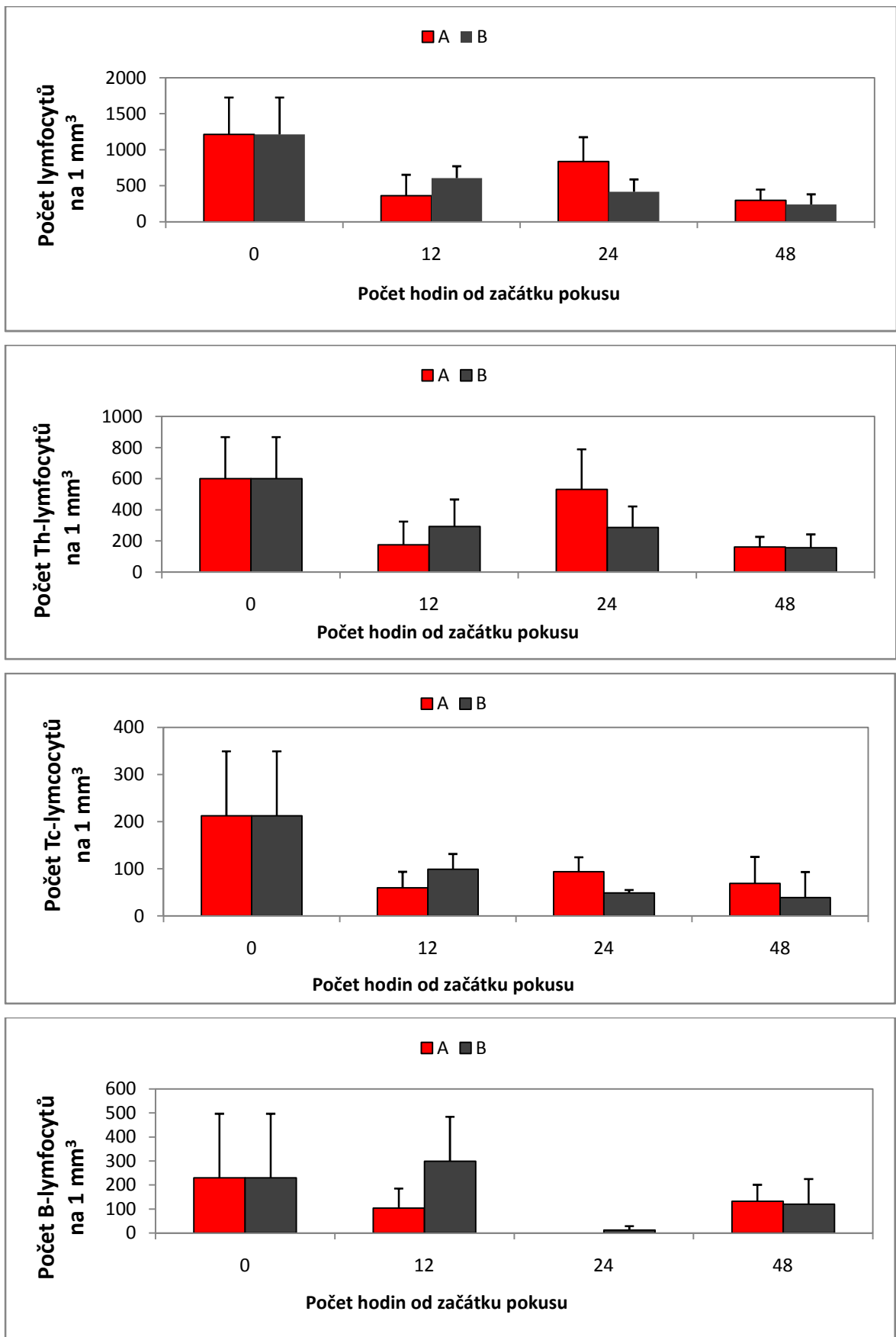
Obr. 12: Velikost nádorů v průběhu pokusu

Na Obr. 13 je vidět infiltrace leukocytů v nádorech v průběhu pokusu. Počet leukocytů (CD45+ buňky) u skupiny *Mycobacterium-tuberculosis*-SMCC (skupina B, šedá barva) od začátku pokusu stoupal a dosáhl nejvyšších hodnot ve 24 hodinách. Hlavní podíl leukocytů tvořily granulocyty (GR1+ buňky), jejichž počet byl rovněž nejvyšší ve 24 hodinách. Významnou část z leukocytární populace zaujímaly také NK buňky (NK1.1+ buňky). Během času ale nedošlo k významnému růstu NK buněk jako u granulocytů, protože poměrně velké množství NK buněk bylo v nádoru přítomno už na začátku pokusu (v čase 0). NK buňky se navíc vyskytovaly jak u skupiny s *Mycobacterium tuberculosis*-SMCC, tak u skupiny s PBS (kontrola). Menší část infiltrátu tvořily monocyty a makrofágy (F4/80+ buňky), které dosáhly svého maxima ve 24 hodinách. Množství těchto buněk ale bylo mezi terapeutickou a kontrolní skupinou rovněž srovnatelné. V čase 24 hodin

dokonce přesáhlo množství buněk v kontrolní skupině skupinu terapeutickou, což mohlo být způsobeno pouhým traumatem po vpichu jehlou.

V pokusu byla sledována také infiltrace lymfocytů (CD3+ buňky) a jejich subpopulací – Tc-lymfocytů (CD8+ buňky), Th-lymfocytů (CD4+ buňky) a B-lymfocytů (CD19+ buňky). Obecně jejich množství v čase vykazovalo spíše klesavou tendenci. Jejich počty byly o jeden až dva řády nižší ve srovnání s počty buněk vrozené imunity a rozdíly mezi kontrolní a terapeutickou skupinou byly zanedbatelné.





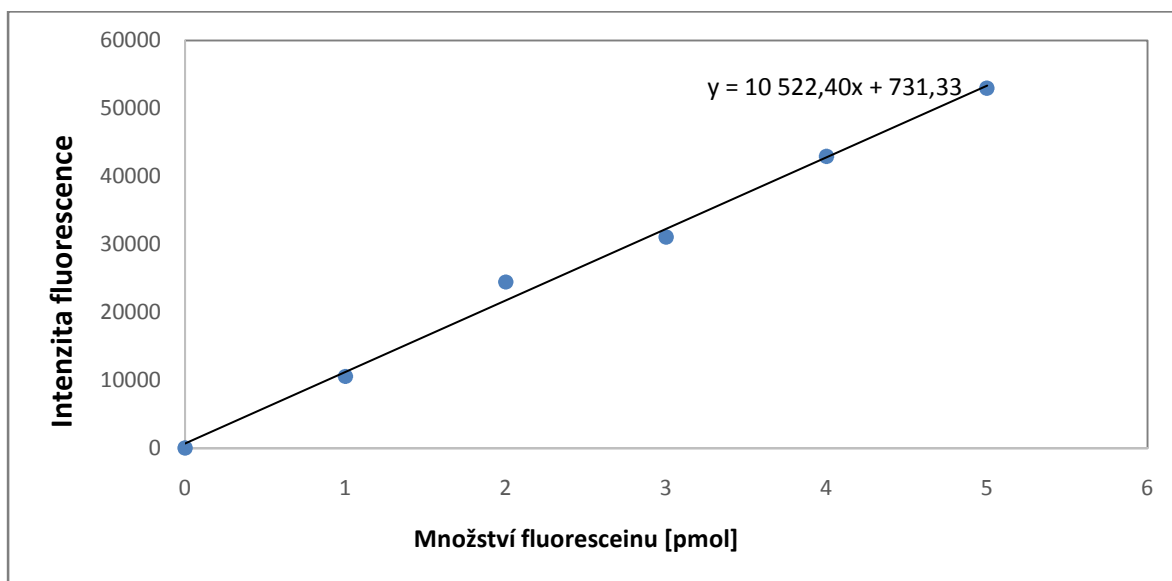
Obr 13: Nádorová infiltrace leukocytů a různých subpopulací leukocytů

A) PBS (kontrola) B) Mycobacterium tuberculosis-SMCC

5.5 Stanovení aktivity MPO v mezibuněčném prostoru nádorové tkáně po aplikaci *Mycobacterium tuberculosis*-SMCC

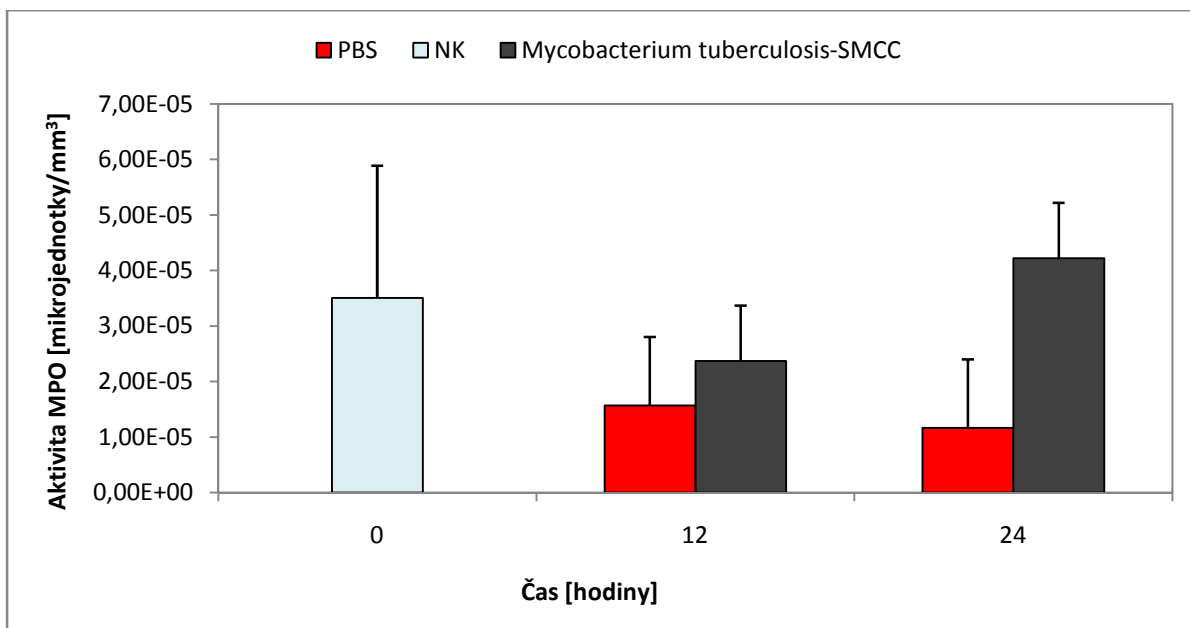
V pokusu 5.4. bylo zjištěno, že největší část nádorové infiltrace po aplikaci *Mycobacterium tuberculosis*-SMCC tvořily neutrofilové. Následující pokus měl napovědět, co se v nádorové tkáni děje a zda neutrofilové uvolňují do prostředí MPO.

Obr. 14 představuje kalibrační křivku, která byla použita k výpočtu množství uvolněného fluoresceinu.



Obr. 14: Množství uvolněného fluoresceinu

Obr. 15 zobrazuje výsledky pokusu. V čase 24 hodin došlo k nárůstu aktivity MPO oproti času 12 hodin, což by odpovídalo i zvýšenému počtu granulocytů v tkáni v tuto dobu (Viz pokus 5). Z výsledků však nelze vyvozovat závěry pro značnou velikost negativní kontroly. Hodnoty v čase 48 hodin nebyly přístrojem změřeny. Důvodem mohlo být znečištění, které se do supernatantu dostalo během přípravy nádorové tkáně.



Obr. 15: Aktivita MPO v mezibuněčném prostoru nádorové tkáně

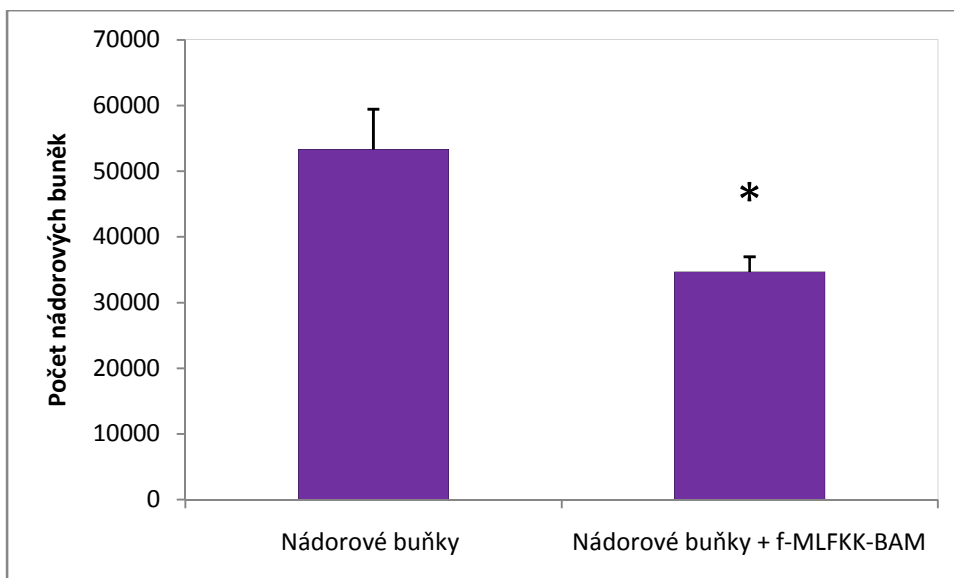
5.6 Studium cytotoxické schopnosti neutrofilů *in vitro* s použitím f-MLFKK-BAM

Předchozí pokusy ukázaly, že *Mycobacterium tuberculosis* kotvené na nádorových buňkách je účinným prostředníkem v redukci nádorového růstu *in vivo* (viz pokus 5.3) a že je schopno přilákat do nádorové tkáně neutrofilů (viz pokus 5.4). Záměrem série těchto pokusů bylo potvrdit cytotoxickou schopnost neutrofilů *in vitro*. Jako motiv kotvený na nádorové buňky byl využit peptid typický pro bakterie – f-MLF.

Čistota neutrofilů izolovaných z kostní dřeně byla zjišťována celkem 4x na průtokovém cytometru BD FACS Canto II flow citometr (BD Biosciences). Čistota neutrofilů vypočítaná jako průměrná hodnota ze všech měření byla 90,5 %.

5.6.1 Ověření cytotoxicity fMLFKK-BAM na nádorové buňky

Před zahájením celé série pokusů bylo třeba zjistit, zda f-MLFKK-BAM není samo o sobě pro nádorové buňky cytotoxické. Výsledky předpokusu znázorňuje Obr. 16. Samotný f-MLFKK-BAM vyvolal 35% redukci počtu buněk.

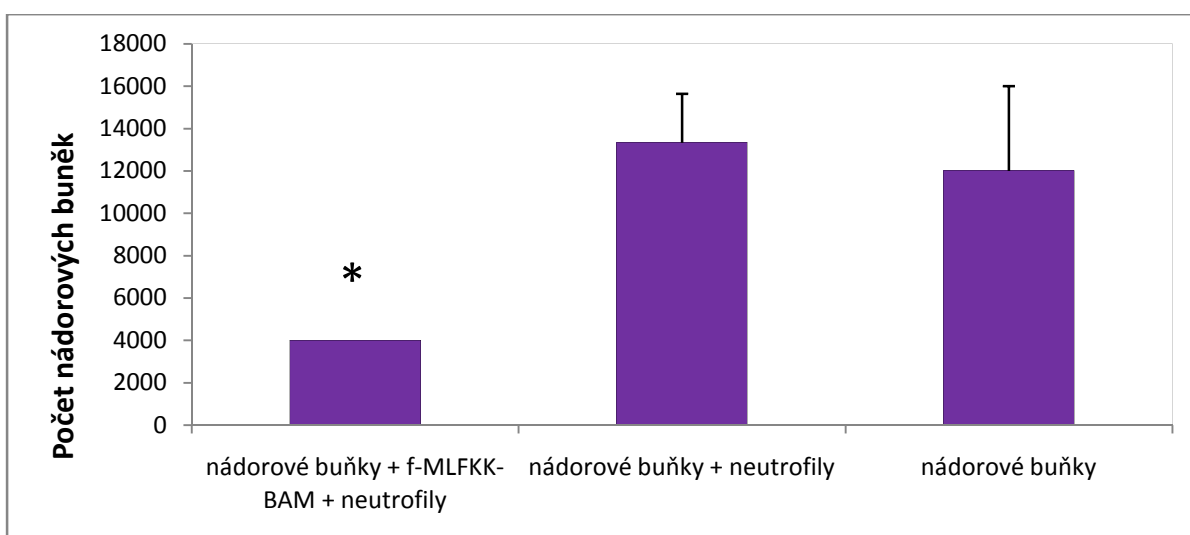


Obr. 16: Vliv f-MLFKK-BAM na nádorové buňky

* $P \leq 0,05$ vztaženo ke skupině nádorové buňky

5.6.2 Ověření cytotoxické schopnosti neutrofilů s použitím f-MLFKK-BAM

V dalším pokusu už byla testována cytotoxická schopnost neutrofilů izolovaných z kostní dřeně. Na Obr. 17 je vidět, že počet nádorových buněk značených f-MLFKK-BAM po interakci s neutrofilami signifikantně klesl. Došlo k 70 % redukci nádorových buněk vůči skupině, kde byly jen nádorové buňky s neutrofilami.

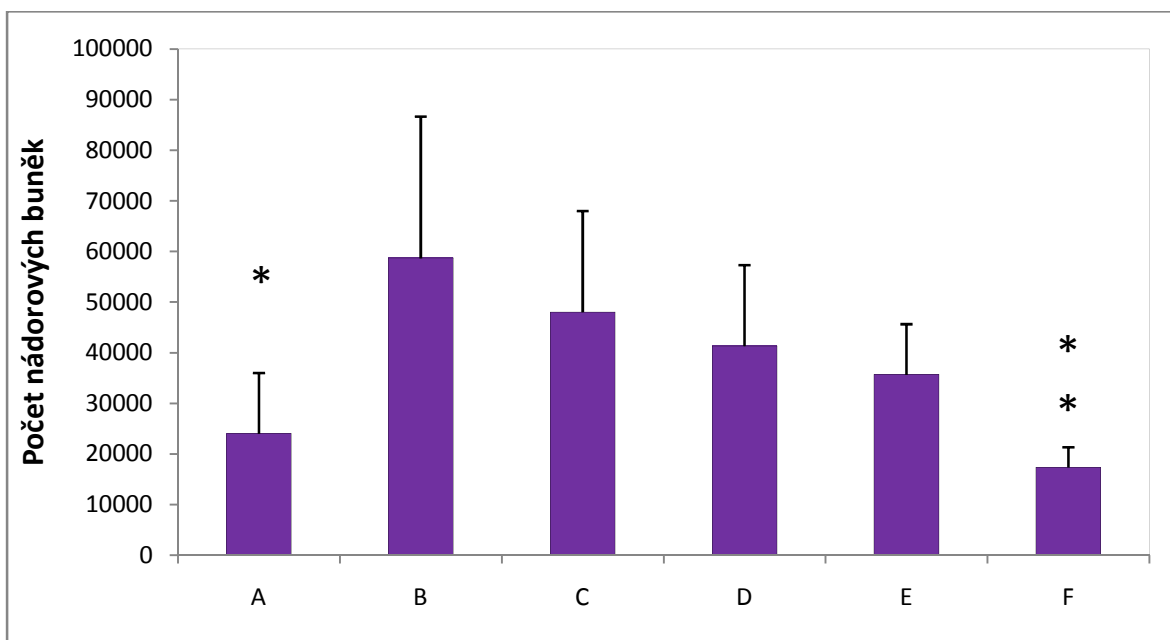


Obr. 17: Cytotoxický efekt neutrofilů na nádorové buňky značené f-MLFKK-BAM

* $P \leq 0,05$ vztaženo ke skupině nádorové buňky + neutrofilly

5.6.3 Ověření cytotoxické schopnosti neutrofilů s použitím f-MLFKK-BAM (při vyšším poměru neutrofilů k nádorovým buňkám)

V dalším pokusu byl použit dvakrát vyšší poměr neutrofilů vzhledem k nádorovým buňkám než v předchozím pokusu. Výsledek zachycuje Obr. 18. F-MLFKK-BAM (sloupec A) tentokrát vyvolal 42 % redukci v počtu buněk ve srovnání se skupinou, kde byly jen nádorové buňky s neutrofilami (sloupec D). V tomto pokusu byl použit PMA jako pozitivní kontrola (sloupec F), který vyvolal 52 % redukci (ve srovnání se skupinou D). Jako negativní kontrola vazby byl vyzkoušen H-MLFKK-BAM (skupina B). Z obrázku je patrné, že vazba pomocí bioaktivní kotvy nádorové buňky neovlivňuje. Dále bylo potřeba zjistit jaký účinek má volné f-MLF (sloupec C). V grafu je vidět, že volný f-MLF nemá na nádorové buňky žádný efekt a to jak v porovnání s nádorovými buňkami samotnými (sloupec E), tak se skupinou, kde byly nádorové buňky společně s neutrofilami (sloupec D).



Obr. 18: Cytotoxický efekt neutrofilů na nádorové buňky značené f-MLF-BAM

A) nádorové buňky + f-MLFKK-BAM + neutrofilů **B)** nádorové buňky + H-MLFKK-BAM + neutrofilů **C)** nádorové buňky + f-MLF + neutrofilů **D)** nádorové buňky + neutrofilů **E)** nádorové buňky **F)** nádorové buňky + PMA + neutrofilů

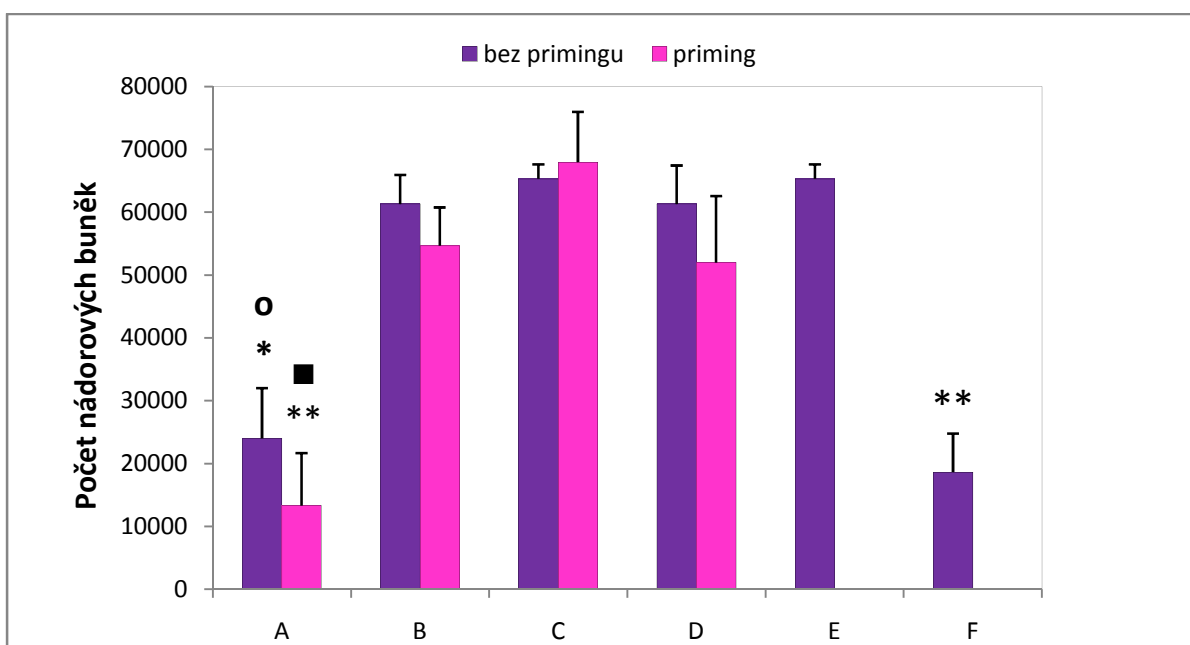
* $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$ vztaženo ke skupině B

Tentýž pokus byl ještě jednou opakován s výslednou redukcí počtu nádorových buněk o 66 %. Z uvedených výsledků vyplývá, že zvýšením poměru neutrofilů vůči nádorovým buňkám se nepodařilo navýšit redukci nádorových buněk.

5.6.4 Ověření cytotoxické schopnosti primovaných neutrofilů s použitím f-MLFKK-BAM

I poslední pokus této série představuje snahu navýšit cytotoxický efekt neutrofilů *in vitro*. Obr. 19 ukazuje, že priming neutrofilů vede k významné redukci počtu nádorových buněk. Zatímco v tomto pokusu nepřimované neutrofilové redukovaly počet nádorových buněk o 61 % (sloupec A, fialová barva) ve srovnání s nádorovými buňkami a neutrofilové (sloupec D, fialová barva), primované neutrofilové vyvolaly redukci o 75 % (sloupec A, růžová barva) ve srovnání s nádorovými buňkami a primovanými neutrofilové (sloupec D, růžová barva). V pozitivní kontrole došlo k 69 % redukci vůči sloupci D (fialová barva).

Tento pokus stejně jako předešlý potvrdil, vazba na nádorové buňky (sloupec B) a volné f-MLF (sloupec C) životnost nádorových buněk neovlivňuje.



Obr. 19: Vliv f-MLF-BAM na nádorové buňky při interakci primovaných i nepřimovaných neutrofilů s nádorovými buňkami

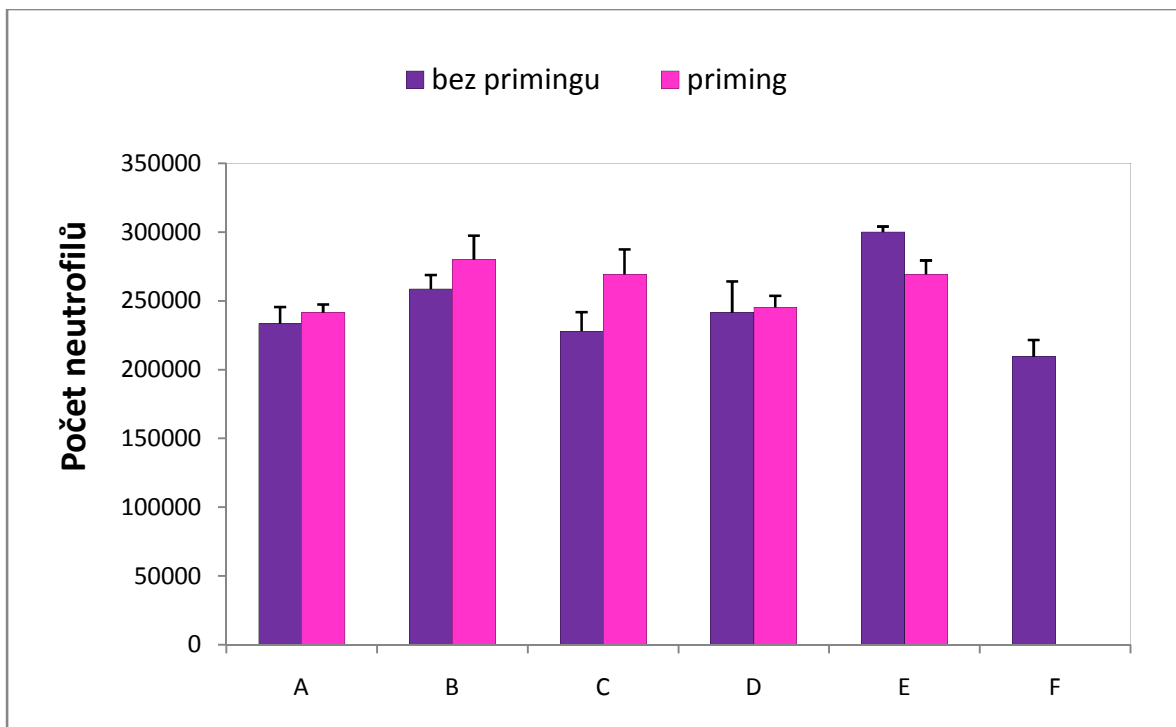
A) Nádorové buňky + f-MLFKK-BAM + neutrofilové **B)** nádorové buňky + H-MLFKK-BAM + neutrofilové **C)** nádorové buňky + f-MLF + neutrofilové **D)** nádorové buňky + neutrofilové **E)** nádorové buňky **F)** nádorové buňky + PMA + neutrofilové

* $P \leq 0,005$, ** $P \leq 0,0005$ vztaheno ke skupině E (fialová barva)

o $P \leq 0,0005$ vztaheno ke skupině B, C a D (fialová barva)

■ $P \leq 0,0005$ vztaheno ke skupině B, C a D (růžová barva)

V tomto pokusu bylo také spočítané množství neutrofilů. Informace o změnách počtu neutrofilů totiž může naznačovat způsob, jakým k zabíjení nádorových buněk dochází. Z Obr. 20 je zřejmé, že mezi skupinami nejsou významné rozdíly a žádná ze skupin se nevyznačuje výraznějším úbytkem neutrofilů.

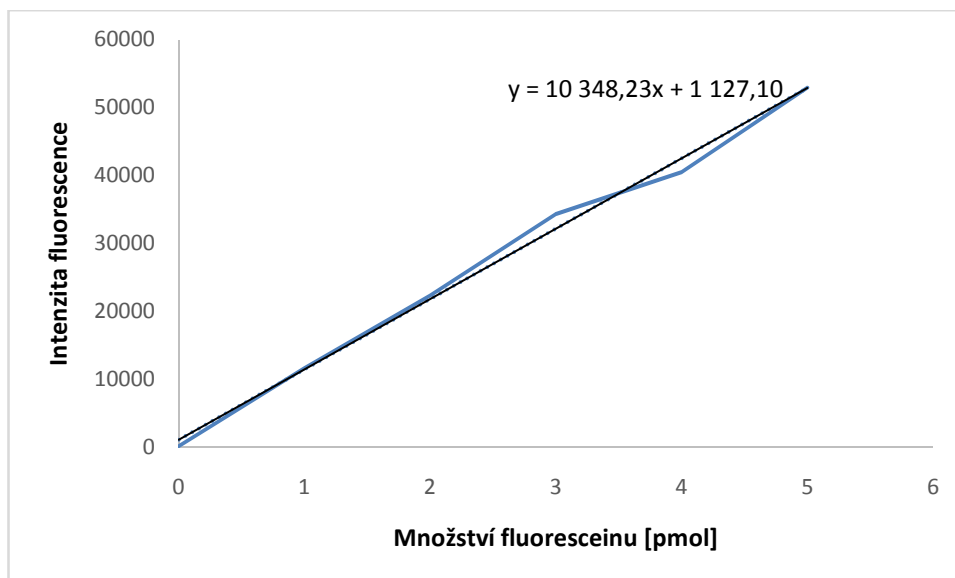


Obr. 20: Počty neutrofilů při interakci primovaných a neprimovaných neutrofilů s nádorovými buňkami

A) Nádorové buňky + f-MLFKK-BAM + neutrofily B) nádorové buňky + H-MLFKK-BAM + neutrofily C) nádorové buňky + f-MLF + neutrofily D) nádorové buňky + neutrofily E) neutrofily F) nádorové buňky + PMA + neutrofily

5.7 Stanovení množství uvolněné MPO po interakci neutrofilů s melanomovými buňkami a f-MLFKK-BAM

Tento pokus měl objasnit, zda je při zabíjení nádorových buněk neutrofily *in vitro* uvolňována MPO z neutrofilu. Obr. 21 zobrazuje kalibrační křivku, z které bylo odečteno množství fluoresceinu.



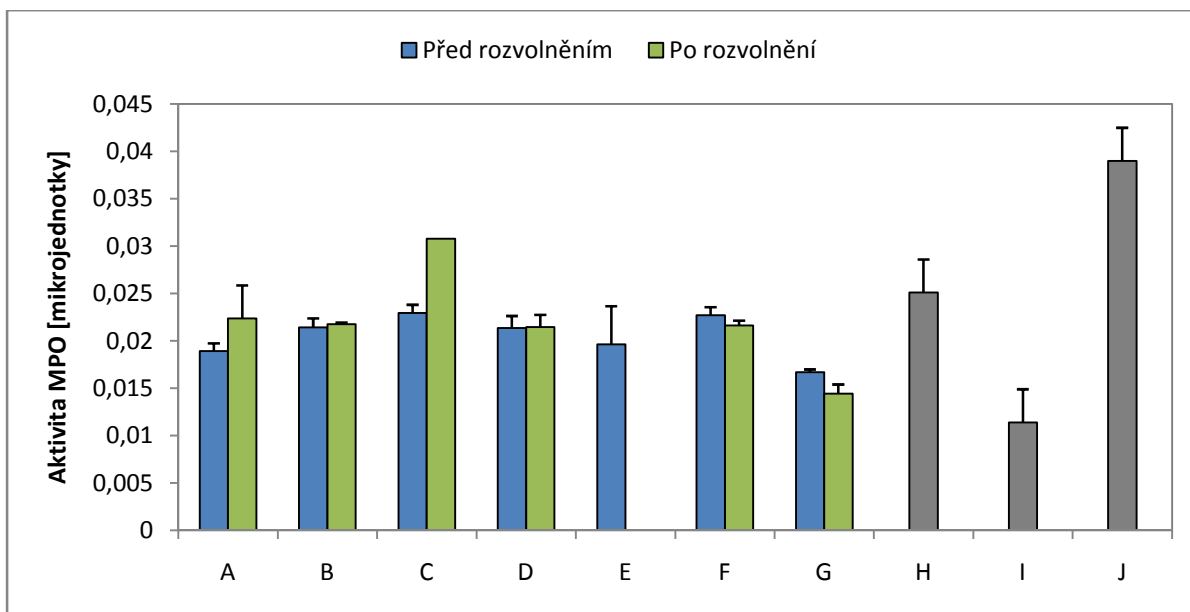
Obr. 21: Množství uvolněného fluoresceinu

Na Obr. 22 jsou uvedeny výsledky pokusu. Protože neutrofilů mohou vytvářet kolem velkých objektů (nádorových buněk) speciální kapsy (viz kapitola 2.4.3 Neutrofilů), snažili jsme se v průběhu pokusu tyto kapsy rozvolnit a sledovala se aktivita MPO jak před tímto rozvolněním (modré sloupce), tak po rozvolnění (zelené sloupce). Z grafu je ale patrné, že rozdíl mezi těmito skupinami byly malé.

Obecně lze říci, že naměřené aktivity MPO nekorespondovaly s výsledky cytotoxického testu. Tam, kde došlo k velkému zabíjení nádorových buněk v přítomnosti vázaného f-MLF (Obr. 18, sloupec A), nedošlo ke zvýšení aktivity MPO (Obr. 22, sloupec A). Nejvyšší aktivitu MPO vykazuje skupina s volným f-MLF po rozvolnění (Obr. 22, zelený sloupec C), ačkoliv nebyl zaznamenán účinek volného f-MLF v cytotoxickém testu.

Aktivita MPO byla u všech skupin poměrně vyrovnaná a u žádné skupiny nedosáhla statisticky významného zvýšení.

V tomto pokusu bylo také zjišťováno množství uvolněné MPO sonikovanými nádorovými buňkami (sloupec I) a sonikovanými neutrofilů (sloupec H).



Obr. 22: Aktivita MPO po interakci neutrofilů s nádorovými buňkami

A) nádorové buňky + *f*-MLFKK-BAM + neutrofilů **B)** nádorové buňky + *H*-MLFKK-BAM + neutrofilů **C)** nádorové buňky + *f*-MLF + neutrofilů **D)** nádorové buňky + neutrofilů **E)** nádorové buňky **F)** neutrofilů **G)** nádorové buňky + PMA + neutrofilů **H)** sonikované neutrofilů **I)** sonikované nádorové buňky **J)** pozitivní kontrola (součástí kitu)

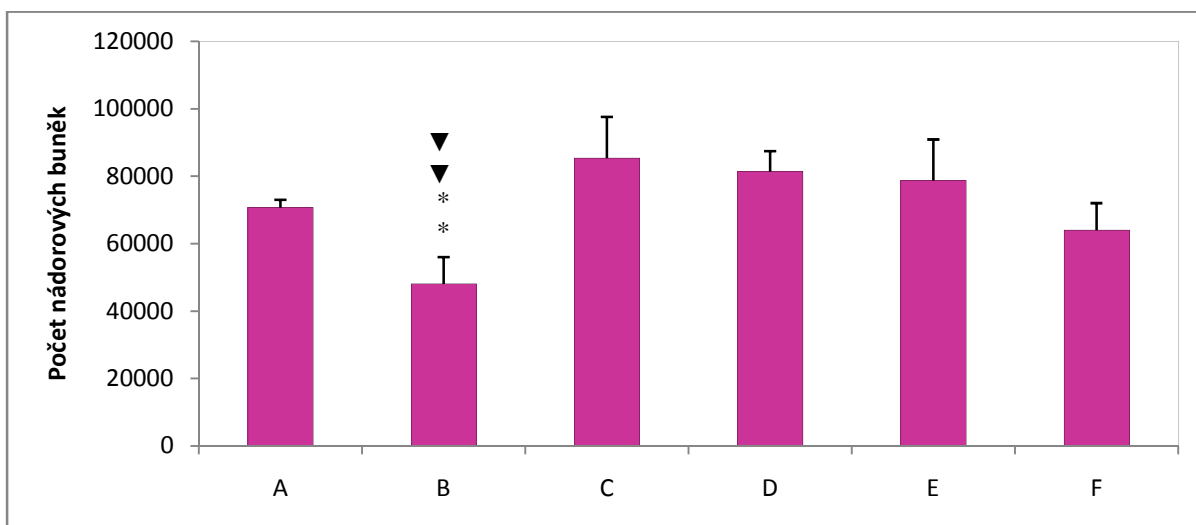
Tento pokus byl ještě 3x opakován. Výsledky byly vždy podobné. U skupiny s *f*-MLFKK-BAM nebyla aktivita nikdy vyšší než u kontrolních skupin. Nejvyšší aktivitu MPO vždy vykazovala skupina s volným *f*-MLF.

5.8 Studium cytotoxické schopnosti neutrofilů *in vitro* s použitím *Mycobacterium tuberculosis*-SMCC

Cílem posledního pokusu bylo *in vitro* potvrdit schopnost neutrofilů zabíjet nádorové buňky, které na svém povrchu mají instalované *Mycobacterium tuberculosis*.

Výsledek experimentu je zobrazen na Obr. 23. Statisticky signifikantního cytotoxického efektu bylo dosaženo u skupiny B (nádorové buňky + *Mycobacterium*-SMCC + neutrofilů) a to jak ve srovnání se skupinou C (nádorové buňky), tak i ve srovnání se skupinou D (nádorové buňky + neutrofilů). Bylo dosaženo 59 % redukce v počtu nádorových buněk. Samotné kotvení bakterie ve skupině A (nádorové buňky + *Mycobacterium tuberculosis*-SMCC) lehce snížilo počet nádorových buněk. Vliv přidání volného *Mycobacterium tuberculosis* k nádorovým buňkám ve skupině E mělo na nádorové

buňky minimální vliv a skupina F (nádorové buňky + volné *M. tuberculosis* + neutrofilů) vykazovala také jen mírný pokles hodnot.

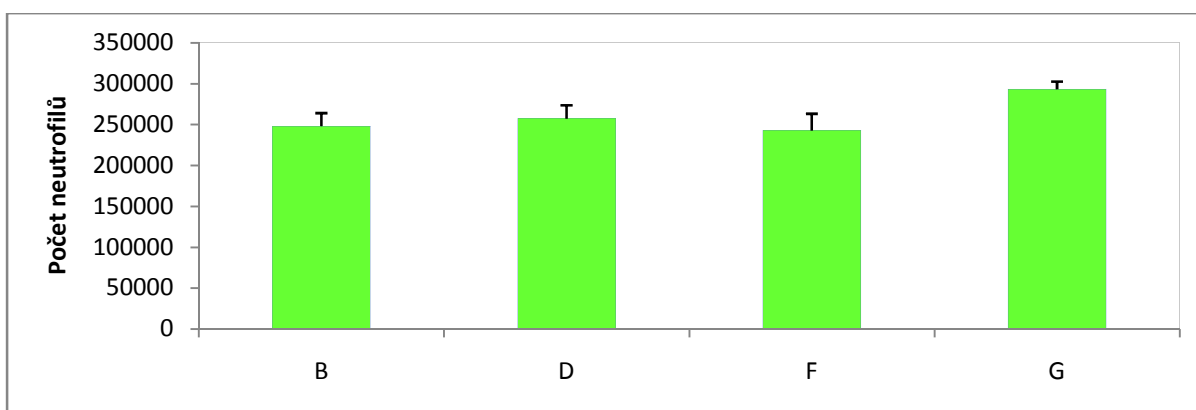


Obr. 23: Počet nádorových buněk zjištěný při interakci neutrofilů s nádorovými buňkami a *Mycobacterium tuberculosis*

A) nádorové buňky + *Mycobacterium tuberculosis*-SMCC **B)** nádorové buňky + *Mycobacterium tuberculosis*-SMCC + neutrofilů **C)** nádorové buňky **D)** nádorové buňky + neutrofilů **E)** nádorové buňky + *Mycobacterium tuberculosis* **F)** nádorové buňky + *Mycobacterium tuberculosis*-SMCC

** $P \leq 0,01$ vztaženo ke skupině C, ▼▼ $P \leq 0,01$ vztaženo ke skupině D

Obr. 24 znázorňuje množství neutrofilů v jednotlivých skupinách. Mezi skupinami nebyly zaznamenány statisticky významné rozdíly.



Obr. 24: Počet neutrofilů při interakci neutrofilů s nádorovými buňkami

A) *Mycobacterium tuberculosis* **B)** nádorové buňky + *Mycobacterium tuberculosis*-SMCC + neutrofilů **D)** nádorové buňky + neutrofilů **F)** nádorové buňky + *Mycobacterium tuberculosis* + neutrofilů **G)** neutrofilů

6 Diskuze

Tato diplomová práce navazuje na předchozí rozsáhlé výzkumy našeho týmu zabývající se bojem proti nádorům s využitím nespecifické imunity. V předešlých pokusech bylo dosaženo velmi slibného efektu v redukci nádorového růstu a mnohokrát se povedlo nádoru se úplně zbavit. Tato terapie byla nejefektivnější v případě, že byla založena na kombinaci aktivace TLRs a fagocytárních receptorů prostřednictvím jejich ligandů. Jako významný agonista TLR byl použit LPS, který ale pro jeho toxicitu není možné použít v humánní medicíně (Janotová a kol., 2014) a proto bylo třeba vyhledat jiný přístup, který by byl aplikovatelný nejen u myší, ale i u lidí. To se také stalo jedním z hlavních cílů této diplomové práce. Další řešenou problematikou bylo prodloužení účinku nádorové terapie. V pokusech Švecové, Caisové a Maierové schrnutých do publikace Janotové a kol. bylo totiž zjištěno, že ačkoliv se nádory podařilo eliminovat, tato eliminace byla velmi často jen dočasným jevem a po nějaké době se začaly opět objevovat. Vliv terapie na přežití myší byl pak ve výsledku malý. Tento jev se vyskytoval obzvláště při použití kovalentně vázaného ligandu pomocí SMCC. (Švecová, 2013; Caisová, 2013; Maierová, 2012; Janotová a kol., 2014), V neposlední řadě měla tato diplomová práce přispět k objasnění složitých imunitních dějů, ke kterým v průběhu zabíjení nádorových buněk dochází.

Cílem prvního pokusu bylo najít takovou náhradu za LPS, která by byla schopná vyvolat syntézu prozánětlivých cytokinů, způsobila dostatečnou infiltraci nádorové tkáně imunitními buňkami a umožnila redukci nádorového růstu. Velmi slibnými látkami se zdály být Imiquimod a Resiquimod, sloučeniny které nejenže indukují tvorbu prozánětlivých cytokinů, ale byly u nich prokázány protinádorové účinky nezávislé na aktivaci TLRs (Schön a Schön, 2007), přičemž Imiquimod byl již jednou zkoušen v koncentraci 0,5 mg/ml bez většího účinku (Ženka, ústní sdělení), ale bylo třeba ověřit, zda by použití jeho vyšší koncentrace nevedlo k lepšímu výsledku. Protože Imiquimod a Resiquimod mohou indukovat tvorbu odlišných cytokinů, byla vyzkoušena i jejich kombinace.

Z výsledků je patrné, že zatímco u Imiquimodu nebyl zaznamenán žádný účinek, kombinace Imiquimodu a Resiquimodu vyvolala průměrnou redukci nádorového růstu 59,6%. Dá se předpokládat, že za úspěšnost této terapie je odpovědný zřejmě jen Resiquimod, jehož dobré působení bylo potvrzeno i v práci Husníkové (Husníková, 2014) a Glaserové (Glaserová, in prep.).

Vysvětlení, proč naše terapie Imiquimodem selhala, nabízí Huang a kol., kteří tvrdí, že mechanismus apoptózy při léčbě Imiquimodem se liší v závislosti na nádorové linii (Huang a kol., 2010) a je tedy možné, že u linie B16F10 Imiquimod k apoptóze vůbec nevede. Sama modulace TLR-7 pak zřejmě nepostačila k vyvolání léčebného efektu. Naše výsledky jsou ovšem v rozporu s prací Drobits a kol., kde Imiquimod redukuje růst nádorových buněk z linie B16F10. V tomto případě byl použit 5 % Imiquimod ve formě masti (Drobits a kol., 2012), takže je otázkou, zda toto není lepší forma aplikace.

Důvod proč sloučenina chemicky velmi podboná Imiquimodu – Resiquimod dosahuje mnohem lepších výsledků, může být dán skutečností, že Resiquimod je až 100x efektivnější v indukci cytokinů než Imiquimod *in vitro* i *in vivo* (Sauder a kol., 2003). Resiquimod indukuje tvorbu cytokinů v podobných koncentracích jako LPS. Jedná se hlavně o cytokiny IFN- α , TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 a MIP-1 α . Resiquimod je efektivní v indukci cytokinu IL-1ra a to ve větší koncentraci než LPS. Ve srovnání s Imiquimodem indukuje vyšší koncentrace GM-CSF a G-CSF (Testerman a kol., 1995).

V dalším pokusu jsme se soustředili hlavně na mechanismy, které stojí v cestě dokonalé likvidaci nádoru a v minulosti byly příčinou krátkodobého efektu terapie. Touto otázkou se už částečně zabývala Husníková, která se snažila zablokovat molekulu CD47, která funguje u nádorových buněk jako „don't eat me“, avšak nedosáhla kýženého efektu (Husníková, 2014). Možných příčin nedokonalého působení terapeutických látek může být ale více. Auerová ve své práci naměřila vyšší koncentrace TGF- β v nádorové tkáni po podání terapeutik (Auerová, 2014). TGF- β je cytokinem využívaným nádory k polarizaci neutrofilů a makrofágů schopných zabít nádorové buňky na TAN a TAM (s tumory asociované neutrofilily a makrofágy) s protumorovými vlastnostmi (Fridlender a kol., 2009) a TGF- β tak může být označen jako viník nedokonalého efektu terapie. Je ale také možné uvažovat o vyselektování odolných nádorových buněk či toleranci na agonisty PRRs. Jinou eventualitou je pak uvolňování adenosinu z nekrotizovaných tkání jako reakce na imunitní atak (Zeh a Lotze, 2005). Nekrotizace tkáně po naší léčbě byla prokázána Kovářovou (Kovářová, 2013) a proto jsme se v tomto pokusu rozhodli blokovat inhibiční efekt adenosinu antagonistou adenosinového receptoru A2A.

Jako agonisté TLRs byly v tomto pokusu zvoleny látky Resiquimod a POLY I:C. Navíc jsme přidali i manan-SMCC, který dokáže opsonizovat tumorové buňky a zacílit tak proti nim fagocyty (Janotová a kol., 2014). Doufali jsme, že tak dosáhneme synergického efektu. Pro blokaci A2A receptoru byl použit ZM241385. Při použití tohoto antagonisty ale

nebylo dosaženo delší léčby oproti skupinám bez něj. Průměrná redukce nádorového růstu u skupiny s mannan-SMCC a R-848 byla 57,4%, u skupiny s mannan-SMCC, R-848 a POLY I:C 78,71%. Analogické skupiny se ZM241385 dosáhly jen 48,3% a 39,3% průměrné redukce nádorového růstu.

Poměrně zajímavé výsledky ale přinesla retransplantace nádoru. Ukázalo se, že u skupin, kde byl aplikován POLY I:C nedošlo znovu k růstu nádorů a terapie působila stále. To je v souladu s výsledky Glaserové (Glaserová, in prep.). Tento efekt si můžeme vysvětlovat úspěšnou prezentací nádorových antigenů získané imunitě. POLY I:C aktivuje klasické dendritické buňky, které pak mohou prezentovat antigeny Th a Tc lymfocytům (Verdijk a kol., 1999). K celému efektu pak jistě přispívá i Resiquimod, který je schopen aktivovat plasmocytoidní dendritické buňky (Gibson a kol., 2002), které se účastní rozvoje populace paměťových T-lymfocytů. Tato léčba tedy dokáže zaktivovat i specifickou část imunitního systému a je schopná vytvořit odolnost proti zbylým buňkám v primárním nádoru a mohla by tak být účinná i při ataku metastáz nebo cirkulujících buněk schopných založit metastázy. Tento pokus tedy nepodpořil naši domněnku, že příčinou nedokonalého efektu v předešlých pokusech prováděných Janotovou a kol. (Janotová a kol., 2014) bylo inhibiční působení adenosinu, ale přesto pomohl najít nový přístup léčby s trvalým charakterem účinku.

V třetím *in vivo* experimentu byla vyzkoušena G+ bakterie *Mycobacterium tuberculosis*. Aplikace mykobakterie ve formě BCG vakcíny (atenuované *Mycobacterium bovis*) do močového měchýře je dnes standartní metodou používanou v léčbě rakoviny močového měchýře. Mechanismy působení této vakcíny nebyly přesně popsány, ale je známo, že BCG má imunostimulační vliv (Redelman-Sidi a kol., 2014) a tak bylo nasnadě předpokládat, že by se mykobakterie mohla uplatnit i v naší léčbě. Výsledky ukázaly, že zatímco léčba volnou bakterií měla na redukci nádorového růstu malý vliv (průměrná redukce nádorového růstu 35%), vazba kovalentně vázané bakterie (SMCC) vyústila v silný terapeutický efekt (s průměrnou redukcí nádorového růstu 73,7%). Tento efekt nebyl zvýšen přidáním mannanu-SMCC (průměrná redukce nádorového růstu 69%). To je možné vysvětlit si tím, že bakterie na svém povchu exprimuje široký repertoár jak signálních (Bhatt a Salgame, 2007), tak fagocytárních receptorů (Sakamoto, 2012), které dokážou vyvolat dostatečně komplexní účinek a přidávat další fagocytární motiv k aktivaci fagocytozy je již zcela zbytečné. Důležitost kotvení bakterie prokázaná v našem pokusu je v souladu s názory Toma a kol., kteří tvrdí že kovalentní vazba agonistů TLRs na nádorové buňky vyvolá větší

imunostimulační efekt než může být dosaženo prostřednictvím volných forem (Tom a kol., 2013). Vazba *Mycobacterium tuberculosis* skýtá velký potenciál v léčbě nádorových onemocnění. Narozdíl od volné mykobakterie používané v BCG vakcíně, která je uplatnitelná jen při léčbě omezeného množství typů nádoru, zatímco u jiných nádorů selhává (Alexandroff et al., 1999), by navíc vázaná bakterie mohla být použita v daleko širším rozsahu nádorových typů.

Protože jsme předpokládali, že vázané *Mycobacterium tuberculosis* je odpovědné za poměrně komplexní aktivaci imunitního systému, v dalším pokusu bylo třeba rozklíčovat, které buňky imunitního systému se infiltrují do nádorové tkáně. Výsledky jasně ukazují, že v prvních 48 hodinách hlavní složku nádorového infiltrátu tvoří buňky nespecifické imunity (neutrofilů, makrofágy, NK-buňky), přičemž vrcholu dosahují ve 24 hodinách terapie. Buňkami s rozhodující úlohou pro odstranění nádoru jsou bezpochyby neutrofilů, které tvořily největší množství z celkového počtu buněk. Nábor neutrofilů do místa infekce po podání *Mycobacterium tuberculosis* nebo BCG byl pozorován i v pracích Fultona a kol. a Pedrosy a kol. (Fulton a kol., 2000; Pedrosa a kol., 2000). Naše výsledky rozsvětlují korespondují s výsledky analýzy nádorové infiltrace po aplikaci LPS provedené Caisovou a Maierovou (Caisová, 2013; Maierová 2012), což naznačuje, že *Mycobacterium tuberculosis* je podobně jako LPS schopno přilákat buňky nespecifické imunity do nádorové tkáně. Přítomnost NK-buněk je možné vysvětlit jejich schopností rozpoznat nádorové buňky a účastnit se jejich likvidace. Jejich přítomnost už na začátku pokusu a to i v kontrolní skupině svědčí o snaze imunitního systému myši zareagovat na změněné buňky nádoru i bez přítomnosti terapeutika. Buňky získané imunity se v nádorové tkáni vyskytovaly spíše sporadicky, tudíž se dá předpokládat, že alespoň v prvních dnech může být úspěšnost likvidace nádoru připsána pouze imunitě vrozené.

Cílem dalšího pokusu bylo přispět k objasnění mechanismů, jakými naverbované neutrofilů zabíjejí nádorové buňky. Protože bakterii navázanou na velkou nádorovou buňku nemůže malý neutrofil zfagocytovat, připadají v úvahu dva mechanismy zabíjení: vytváření kapes mezi neutrofilem a melanomovou buňkou nebo tvorba NETs. V tomto pokusu jsme se rozhodli prověřit první z možností a to pomocí stanovení MPO. Z výsledku je patrné, že aktivita MPO je vyšší v čase 24 hodin oproti času 12 hodin, ale rozdíly mezi skupinami nejsou natolik významné, aby se dalo jednoznačně říci, jestli je tvorba kapes hlavním mechanismem zabíjení nádorových buněk. V pokusech Waldmanové a Auerové bylo

prokázáno, že podání LPS a agonisty fagocytárního receptoru zvyšuje aktivitu MPO až 48 hodin po podání terapeutik, kdy teprve dojde k destrukci melanomových buněk a uvolnění MPO z kapes do prostoru (Auerová, 2014; Waldmannová 2013). V našem pokusu nebylo možno hodnoty v tomto čase změřit, což nám možná zabránilo dozvědět se o přesných mechanismech naší terapie více a je třeba toto studium podrobit dalšímu důkladnějšímu zkoumání s využitím i jiných metod.

Pod šestý pokus je shrnuto několik pokusů, jejichž cílem bylo ověřit, zda jsou neutrofilů i v *in vitro* podmínkách schopny pomocí vázaného fagocytárního ligandu zabít melanomové buňky. V pokusu zahajujícím celou sérii experimentů jsme zjistili, že samo f-MLFKK-BAM vykazuje 35% toxicitu na nádorové buňky. Následovaly pokusy s použitím neutrofilů v různém poměru k nádorovým buňkám, které jasně ukázaly, že zatímco neoznačených melanomových buněk si neutrofil nevšímá, na buňky značené f-MLF-BAM působí vysoce cytotoxicky. To je umožněno aktivací FPR neutrofilů vázaným ligandem. Sérii pokusů uzavíral experiment, pro který jsme použili primované neutrofilů a kde díky primingu došlo k nejvyšší redukci počtu nádorových buněk (73%).

Důvod, proč je f-MLFKK-BAM samo o sobě cytotoxické, není dán vlivem samotné vazby. Tuto možnost jsme vyloučily přidáním H-MLFKK-BAM, které nádorové buňky vůbec neovlivňovalo. Vysvětlení ale nabízí kolektiv Chakravartih, kteří prokázali, že agresivní typy melanomu na svém povrchu exprimují FPR (Chakravarti a kol., 2013), a je tedy možné, že navázání f-MLF na jejich povrchu podněcuje nádorové buňky k zabíjení se navzájem. Vzájemné interakce nádorových buněk pod vlivem vzájemného se f-MLF pozorovala kolegyňě Vácová (Vácová, in prep.).

V tomto pokusu jsme také znovu potvrdili důležitost vazby f-MLF. Ačkoliv je volné f-MLF označováno za velmi účinného aktivátora neutrofilů (Panaro and Mitolo, 1999), u neutrofilů použitých v našich experimentech nevyvolávalo žádnou ochotu zabíjet. Podmínkou dobrého cytotoxického působení bylo vždy ukotvení f-MLF.

V závěrečném experimentu této série bylo také zjištěno, že nedošlo k výraznému úbytku neutrofilů v žádné ze skupin. Tato informace může podhalit způsob cytotoxického působení neutrofilů. Zatímco v případě fagocytózy a extracelulárního zabíjení pomocí kapes zpravidla nedochází k úhynu neutrofilů, zabíjení pomocí NETs je jednoznačně spojeno se smrtí neutrofilů (Fuchs a kol., 2007). V neprospěch tvorby NETs hovoří také článek Branzk a kol., kteří tvrdí, že ke kompletnímu vytvoření NETs dojde až za 4 hodiny po prvním kontaktu neutrofilu s cílovou buňkou (Branzk a kol., 2014). My jsme nechali inkubovat

neutrofilů s nádorovými buňkami dvě hodiny, takže NETs zřejmě ještě nemohly být zformovány. Detekcí NETs se zabývala podrobněji kolegyně Fáberová a výsledky jejích pokusů jsou v souladu s těmito pozorováními (Fáberová, in prep.).

V sedmém pokusu byla měřena aktivita MPO *in vitro* po inkubaci neutrofilů s nádorovými buňkami značenými f-MLFKK-BAM. Rozdíly hodnot mezi jednotlivými skupinami byly minimální a rovněž po rozvolnění hypotetických kapes jsme nezaznamenali vyšší hodnoty. Podobné hodnoty naměřily ve svých pokusech i Waldmannová a Auerová (Waldmannová 2013, Auerová 2014), které prováděly podobný pokus s odlišným ligandem. Protože jsme nenaměřili vysoké hodnoty MPO ani u sonikovaných neutrofilů, nemůžeme na základě tohoto pokusu hypotézu kapes jednoduše zavrhnout. Stejně jako u *in vivo* pokusu (viz kapitola 5.5) bude nutné k určení mechanismu zabíjení najít jiné přesvědčivější metody.

Čeho si ale můžeme všimnout je, že u *in vivo* pokusu dochází k navýšení aktivity MPO nejdříve za 24 hodin. Je tedy možné, že se v našem dvouhodinovém pokusu oxidativní vzplanutí a tvorba MPO nestačily aktivovat? Fagocytóza je obecně považována za velmi rychlý děj (Branzk a kol, 2014) a dá se tak předpokládat, že tvorba kapes, která je fagocytóze do značné míry podobná, bude zhruba stejně časově náročná a dvouhodinový interval by měl být dostačující. Vezměme přesto v úvahu, že MPO ještě nemusela být vytvořena. Jakým dalším mechanismem by mohlo k zabíjení nádorových buněk docházet? Možným vysvětlením je, že do kapes se vylučují lyzozomální hydrolázy a defensiny (Weissmann a kol, 1972), které způsobují zánik nádorových buněk i bez MPO.

V posledním pokusu bylo potvrzeno, že neutrofilů jsou schopné zabít nádory s navázanou bakterií. V tomto případě ale není zabíjení zprostředkováno přes formylpeptidový receptor jako tomu bylo u ligandu f-MLFKK-BAM. Zde zřejmě dochází k aktivaci CR3 neutrofilů pomocí primovacích směsí (Hong a kol., 2004) a ten pak může interagovat s vázanou bakterií (Sakamoto, 2012). Opět byla potvrzena nutnost vazby mykobakterie na nádorové buňky a rovněž došlo k ověření poznatku, že účinná redukce počtu nádorových buněk není spojena s úbytkem neutrofilů.

7 Souhrn

- Byla studována možnost použití Imiquimodu jako náhrady LPS v protinádorové terapii. Ani vysoké dávky této látky nebyly účinné.
- Léčba prostřednictvím Resiquimodu a POLY I:C vykazuje dlouhodobý efekt a dá se předpokládat, že bude účinná i při likvidaci metastáz. Potlačení zpětnovazebného působení adenosinu se ukázalo jako zbytečné.
- Byl zjištěn zásadní vliv kotvení *Mycobacterium tuberculosis* na nádorové buňky pro úspěšnost imunoterapeutického použití této bakterie. Díky komplexnímu složení této bakterie nebylo nutné kombinovat její použití s přidavkem ligandů fagocytárních motivů. Tato terapie otevírá možnosti použití v humánní medicíně.
- Byla sledována nádorová infiltrace v průběhu léčby *Mycobacterium tuberculosis*-SMCC a bylo zjištěno, že nejvíce byly v nádoru zastoupeny neutrofilů, které jsou v prvních dnech klíčové pro zabíjení nádorových buněk.
- Byla potvrzena cytotoxická schopnost neutrofilů *in vitro*. Neutrofilů zabíjejí, jak buňky značené f-MLFKK-BAM, tak buňky značené *Mycobacterium tuberculosis*-SMCC. Bylo doloženo, že pro zabíjení nádorových buněk neutrofilů je nezbytné tyto PAMPs vázat.
- Byl zjištěn pozitivní vliv cytokinového primingu na schopnost neutrofilů zabíjet nádorové buňky s ukotveným f-MLFKK-BAM.
- Stanovení MPO se ukázalo jako problematické pro sledování interakcí neutrofilů s nádorovými buňkami. Důvody jsou diskutovány.

8 Seznam zkratek

AP-1 – transkripční faktor

APC - antigen prezentující buňky

CD – cluster designation, typ transmembránových bílkovin

CR - komplementový receptor

CRP – C-reaktivní protein

DAMP - damage-associated molecular patterns

Fc γ RIIA a Fc γ RIIB - Fc fragment IgG, speciální receptory

FPR – formylpeptidový receptor

HLA – hlavní histokompatibilní komplex

I κ B – protein, který inhibuje NF-kappa-B

IL- interleukin

INF - interferon

IRAK – interleukin receptor associated kinase

IRF7 – interferon regulatory factor 7

LPS – lipopolysacharid

Mal – myelin and lymphocyte protein

MAPK - Mitogen-activated protein kinases

MBL – manose-binding lectin

MD-2 myeloid differential factor 2

MIP-1 α – macrophage inflammatory protein - 1 α

MyD88 - myeloid differentiation primary response gene

NET – neutrophil extracellular trap

NF- κ B - nukleární faktor κ B

NOD-like receptory - nucleotide-binding oligomerization domain receptors

NK-T-Lymfocyty – Natural killer T-lymfocyty

PAMPs - pathogen-associated molecular patterns

PMA - Phorbol-12-myristat-13-acetat

PRR – Pattern recognition receptor

RAG1 a RAG2 - Recombination-activating gene 1 a 2

ROS – reaktivní formy kyslíku

STAT₁ - Signal Transducers and Activators of Transcription family of Transcription factor

TAK1 – ubiquitin-dependentní kináza

TLR – Toll-like receptor

TNF – tumour necrosis factor

TRAF - TNF receptor-associated factor

TRIF - TIR-domain containing adapter inducing interferon β

9 Použitá literatura

- Ahonen C. L., Gibson S. J., Smith R. M., Peerson L. K., Lindh J. M., Tomai M. A., Vasilakos J. P. (1999): Dendritic Cell Maturation and Subsequent Enhanced T-Cell Stimulation Induced with the Novel Synthetic Immune Response Modifier R-848. *Cellular Immunology*. 197: 62–72.
- Akira S., Uematsu S., Takeuchi O. (2006): Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell*. 124:783-801.
- Alexandroff A. B., Jackson A. M., ODonell M. A., James K. (1999): BCG immunotherapy of bladder cancer: 20 years on. *Lancet*. 353: 1689-1694.
- Anders H. J., Patole P. S. (2005): Toll-like receptors recognize uropathogenic *Escherichia coli* and trigger inflammation in the urinary tract. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 20: 1529-1532.
- Ashbridge K. R., Booth R. J., Watson J. D., Lathigra R. B. (1989): Nucleotide sequence of the 19 kDa antigen gene from *Mycobacterium tuberculosis*. *Nucleic Acid Research*. 17: 1249.
- Auerová M. (2014): Mechanismy imunitní odpovědi při léčbě rakoviny kotvením ligandů fagocytárních receptorů na povrch nádorových buněk. Diplomová práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. České Budějovice.
- Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C., Fauler B., Uhlemann Y., Weiss D. S., Yvette Weinrauch Y., Zychlinsky A. (2004): Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science*. 303: 1532-1533.
- Becker J. C., Houben r., Schrama D., Voigt H., Ugurel S., Reisfeld R. A. (2010): Mouse models for melanoma: a personal perspective. *Experimental Dermatology*. 19: 157-164.
- Bendelac A., Bonneville M., Kearney J. F. (2001): Autoreactivity by design: innate B and T lymphocytes. *Nature Reviews Immunology*. 1: 177-186.
- Bhatt K., Salgame P. (2007): Host innate immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Immunology*. 27: 347-362.
- Branzk N., Lubojemska A., Hardison S. E., Wang Q., Gutierrez M. G., Brown G. D., Papayannopoulos V. (2014): Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. *Nature Immunology*. 15: 1017-1025.

- Brennan P. J. (2003): Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*. 83: 91-97.
- Brill K. J., Li Q., Larkin R., Canday D. H., Kaplan D. R., boom W. H., Silver R. F. (2001): Human Natural Killer Cells Mediate Killing of Intracellular *Mycobacterium tuberculosis* via Granule-Independent Mechanisms. *Infection and Immunity*. 69: 1755-1765.
- Caisová V. (2013): Použití agonistů FPR receptorů pro terapii nádorových onemocnění. Diplomová práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. České Budějovice.
- Carroll M. C., Fischer M. B. (1997): Complement and the immune response. *Current Opinion in Immunology*. 9: 64-69.
- Chakravarti N., Peddareddigari V. G., Warneke C L., Johnson M. M, Overwijk W. W., Hwu P., Prieto V G. (2013): Differential Expression of the G-Protein–Coupled Formyl Peptide Receptor in Melanoma Associates With Aggressive Phenotype. *The American Journal of Dermatopathology*. 35:184-190.
- Christiaansen J. F., Gallardo D., Burnside S. S., Nelson A. A., Sears D. W. (1984): Rapid covalent coupling of proteins to cell surfaces: Immunological characterization of viable protein-cell conjugates. *Journal of Immunological Methods*. 74: 229–239.
- Coley W. B. (1910): The Treatment of Inoperable Sarcoma by Bacterial Toxins (The Mixed Toxins of the Streptococcus erysipelas and the Bacillus prodigiosus). *Proceedings of the Royal Society of Medicine*. 3: 1-48.
- Cui, Z., Willingham, M. C., Hicks, A. M., Alexander-Miller, M. A., Howard, T. D., Hawkins, G. A., Miller, M. S., Weir, H. M., Du, W. & DeLong, C. J. (2003). Spontaneous regression of advanced cancer: identification of a unique genetically determined, age-dependent trait in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100: 6682–6687.
- Danciu C., Falamas A., Dehelean C., Soica C., Radeke H., Barbu-Tudoran L., Bojin F., Cinta Pinzaru S., Munteanu M. F. (2013): A characterization of four B16 murine melanoma cell sublines molecular fingerprint and proliferation behavior. *Cancer Cell International*. 13: 75-85.
- Dockrell D. H., Kinghorn G. R. (2001): Imiquimod and resiquimod as novel immunomodulators. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 48: 751-751.

- Dranoff G. (2004): Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*. 4:11-22.
- Drobits B., Holcman M., Amber N., Swiecki M., Grundtner R., Hammer M., Colonna M., Sibilio M. (2012): Imiquimod clears tumors in mice independent of adaptive immunity by converting pDCs into tumor-killing effector cells. *The Journal of Clinical Investigation*. 122: 575-585.
- Emmett M. S., Symonds K. E., Rigby H., Cook M. G., Price R., Metcalfe C., Orlando A., Bates D. O. (2010): Prediction of melanoma metastasis by the Shields index based on lymphatic vessel density. *BMC Cancer*. 10: 208.
- Erridge C., Bennett-Guerrero E., Poxton I. R. (2002): Structure and function of lipopolysaccharides. *Microbes and Infection*. 4:837-851.
- Ferwerda G., Girardi S. E., Kullberg B., Bourhis L., Jong D., Langenberg D. M. L., Crevel R., Adema G. J., Ottenhoff T. H. M., Meer J., Netea M. G. (2005): NOD2 and Toll-Like Receptors Are Nonredundant Recognition Systems of *Mycobacterium tuberculosis*. *Plos Pathogens*. 1: 279-285.
- Finn O. J. (2012): Immuno-oncology: understanding the function and dysfunction of the immune system in cancer. *Annals of Oncology*. 23: 6-9.
- Flutter B., Nestle F. O. (2013): TLRs to cytokines: Mechanistic insights from the imiquimod mouse model of psoriasis. *European Journal of Immunology*. 43: 3138-3146.
- Fridlender G., Sun J., Kim S., Kapoor V., Cheb G., Ling L., Worthen G. S., Albelda S. M. (2009): Polarization of Tumor-Associated Neutrophil Phenotype by TGF- β : "N1" versus "N2" TAN. *Cancer Cell*. 16: 183-194.
- Fu H., Karlsson J., Bylund J., Movitz Ch., Karlsson A., Dahlgren C. (2006): Ligand recognition and activation of formyl peptide receptors in neutrophils. *Journal of Leukocyte Biology*. 79: 2247-2256.
- Fuchs T. A., Abed U., Goosmann C., Hurwitz R., Schulze I., Volker W., Weinrauch Y., Brinkmann V., Zychlinsky A. (2007): Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *The Journal of Cell Biology*. 176: 231-241.
- Fulton S. A., Martin T. D., Redline R. W., Boom W. H. (2000): Pulmonary immune responses during primary *Mycobacterium bovis*-Calmette-Guérin bacillus infection in C57BL/6 mice. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 22:333-343.

- Furze R. C., Rankin S. (2008): Neutrophil mobilization and clearance in the bone marrow. *Immunology*. 125: 281-288.
- Gao J. L., Murphy P. M. (1993): Species and subtype variants of the N-formyl peptide chemotactic receptor reveal multiple important functional domains. *Journal of Biological Chemistry*. 268: 25395–25401.
- Garbe C., Leiter U (2009): Melanoma epidemiology and trends. *Clinics in Dermatology*. 27: 3-9.
- Gazi U. Martinez-Pomares L. (2009): Influence of the manose receptor in host imine responses. *Immunobiology*. 214: 554–561.
- Geissmann F., Manz M. g., Jung S., Sieweke M. H., Merad M., Ley K. (2010): Development of monocytes, macrophages and dendritic cells. *Science*. 327: 656-661.
- Ghiran I., Barbashov S. F., Klickstein L. B., Tas S. W., Jensenius J. C., Nicholson-Weller A. (2000): Complement receptor 1/CD35 is a receptor for mannan-binding lectin. *The Journal of Experimental biology*. 192: 1797-1808.
- Gibson S. J., Lindh J. M., Riter T. R., Gleason R. M., Rogers L. M., Fuller A. E., Oesterich J. L., Gorden K. B., Qiu X., McKane S. W., Noelle R. J., Miller R. L., Kedl R. M., Fitzgerald-Bocarsly P., Tomai M. A., Vasilakos J. P. (2002): Plasmacytoid dendritic cells produce cytokines and mature in response to the TLR7 agonists, imiquimod and resiquimod. *Celular imunology*. 218: 74-86.
- Hallett M. B., Lloyds D. (1995): Neutrophil priming: the cellular signals that say 'amber' but not 'green'. *Immunology today*. 16: 264-269.
- Hampton M. B., Kettle A. J., Winterbourn C. C. (1998): Inside the Neutrophil Phagosome: Oxidants, Myeloperoxidase and Bacterial Killing. *Blood*. 92: 9.
- Hanahan D, Weinberg D. A (2011): The hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*. 144: 646–674.
- Hansel T. T., Kropshofer H., Singer T., Mitchell J. A., George A. J. T (2010): The safety and side effects of monoclonal antibodies. *Nature Reviews Drug Discovery*. 9: 325-338.
- Hong F., Yan J., Allendorf D. J., Hansen R. D., Ostroff G. R., Xing P. X., Cheung N. K., Ross G. D. (2004): Mechanism by which orally administered beta-1,3-glucans enhance the tumoricidal activity of antitumor monoclonal antibodies in murine tumor models. *Journal of Immunology*. 173: 797-806.

- Huang S. W., Liu K. T., Chang C. C., Chen Y. J., Wu C. Y., Tsai J. J., Lu W. C., Wang Y. T., Liu C. M., Shieh J. J. (2010): Imiquimod simultaneously induces autophagy and apoptosis in human basal cell carcinoma cells. *British Journal of Dermatology*. 163: 310-320.
- Husníková H. (2014): Nádorová imunoterapie založená na použití ligandů fagocytárních receptorů, kotvených na nádorové buňky. Studium možností zesílení jejího účinku a specifity. Diplomová práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. České Budějovice.
- Hussain S. P., Harris C. C. (2007): Inflammation and cancer: An ancient link with novel potentials. *International Journal of Cancer*. 121: 2373–2380.
- Chakrabarty A. M. (2003): Microorganisms and Cancer: Quest for a Therapy. *The Journal of Microbiology*. 185:2683-2686.
- Janotová, T., Jalovecká, M., Auerová, M., Švecová, I., Bruzlová, P., Maierová, V., Kumťáková, 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.
- Jeannin P., Jaillon S., Delneste Y. (2008): Pattern recognition receptors in the immune response against dying cells. *Current Opinion in Immunology*. 20: 530-537.
- Jurk M., Heil F., Vollmer J., Schetter C., Krieg A. M., Wagner H., Lipford G., Bauer S. (2002): Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848. *Nature Immunology*. 3: 499.
- Kaer L., Parekh V. V., Wu L. (2011): Invariant natural killer T cells: bridging innate and adaptive immunity. *Cell and Tissue Research*. 343: 43-55.
- Kato K., Itoh C., Yasukouchi T., Nagamune T. (2004): Rapid protein anchoring into the membranes of mammalian cells using oleyl chain and poly(ethylene glycol) derivatives. *Biotechnology Progress*. 20: 897-904.
- Kawai T., Akira S. (2010): The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature Immunology*. 11: 373-384.
- Kichik V. R., Flores R. M., Castelan M. M., Pozos S. G., Hernandez S. M., Espinosa O. R., Salinas R C., Parra S. E., Garcia I. E. (2009): Neutrophil extracellular traps are induced by *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*. 89: 29-37.

- Kim U., Baumler A., Carruthers C., Bielat K. (1975). Immunological escape mechanism in spontaneously metastasizing mammary tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 72: 1012-1016.
- Klebanoff S. J. (2005): Myeloperoxidase: friend and foe. *Journal of Leukocyte Biology*. 77: 598-625.
- Kölmel K. F., Gefeller O., Pfahlberg a., Mastrangelo G., Nin M., Botev I. N., Seebacher C., Schneider D., Lambert D., Shafir R., Kokoschka E. M., Kleeberg U. R., Henz B. M. (1999): Febrile infections and malignant melanoma: results of a case-control study. *Melanoma research*. 9: 511-519.
- Kono H., Rock K. L. (2008): How dying cells alert the immune system to Danger, *Nature Reviews immunology*. 8: 279-289.
- Kopp E., Medzhitov R. (2003): Recognition of microbial infection by Toll-like receptors. *Current opinion in Immunology*. 15:396–401
- Kovářová (2013): Studium možnosti použití kotveného Zymosanu A pro imunoterapii melanomu. Diplomová práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. České Budějovice.
- Lanier L. L. (2005): NK cell recognition. *Annual Review of Immunology*. 23: 225-274.
- Lauw F. N., Caffrey D. R., Golenbock D. T. (2005): Of mice and man: TLR11 (finally) finds profilin. *Trends in Immunology*. 26: 509-511.
- Lemaitre B., Nicolas E., Michaut L., Reichhart J. M., Hoffmann J. A. (1996): The dorsoventral regulatory gene cassette spätzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*. 86: 973-983.
- 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: 2602-2608.
- Lin C. T., Wei W., Zhang J., Liu S., Liu Y., Zheng D. (2007): Formyl peptide receptor-like-1-mediated endogenous TRAIL gene expression with tumoricidal activity. *Molecular cancer therapeutics*. 6: 2618-2625.
- Maierová V. (2012): Protinádorová imunoterapie založená na instalaci manózy na povrch nádorových buněk. Diplomová práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. České Budějovice.

- Manavalan B., Basith S., Choi S. (2011): Similar Structures but Different Roles – An Updated Perspective on TLR Structures. *Frontiers in Physiology*. 2: 41
- Markovic S. N., Erickson L. a. Rao R. D., Weenig R. H., Pockaj B. A., Bardia A., Vachon C. M. Schild S. E., McWilliams R. R., Hand J. L., Laman S. D., Kttschade L. A., Maples W. J., Pettelkow M. R., Pulido J. S., Cameron J. D., Creagan E. T.(2007): Malignant melanoma in the 21st century, part 1: epidemiology, risk factors, screening, prevention, and diagnosis. *Mayo Clinics Proceedings*. 82: 364-380.
- McBlane J.F., Gent D. C., Ramsden D.A., Romeo C., Cuomo C. A., Gellert M., Oettinger M. A. (1995): Cleavage at a V(D)J recombination signal requires only RAG1 and RAG2 proteins and occurs in two steps. *Cell*. 83: 387-395.
- McCarthy E. F. (2006): The Toxins of William B. Coley and the Treatment of Bone and Soft-Tissue Sarcomas. *Iowa Orthopaedic Journal*. 26: 154–158.
- Means T K., Lien E., Yoshimura A., Wang S., Golenbock D., Fenton M. (1999): The CD14 Ligands Lipoarabinomannan and Lipopolysaccharide Differ in Their Requirement for Toll-Like Receptors. *The Journal of Immunology*. 163: 6748-6755.
- Medzhitov R. (2007): Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*. 449: 819-826.
- Medzhitov R., Janeway C. (2000): Innate immunity. *The new england Journal of medicine*. 343: 338-344.
- Metzler K.D., Fuchs T. A., Nauseef W. M., Reumaux D., Roesler J., Schulze I., Wahn V., Papayannopoulos V., Zychlinsky A. (2011): Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: implications for innate immunity. *Blood*. 117: 953-959.
- Meyer T., Surber C. French L. E., Stockfleth E. (2013): Resiquimod, a topical drug for viral skin lesions and skin cancer. *Drug evaluations*. 22: 149-159.
- Meylan E., Tschopp J., Karin M. (2006): Intracellular pattern recognition receptors. *Nature*. 442: 39-44
- Migeotte I., Communi D., Parmentier M. (2006): Formyl peptide receptors: A promiscuous subfamily of G protein-coupled receptors controlling immune responses. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 17: 501-517.
- Miyake K. (2003): Innate recognition of lipopolysaccharide by CD14 and toll-like receptor 4-MD-2: unique roles for MD-2. *International Immunopharmacology*. 3: 119-128.

- Napolitani G., rinaldi A., Bertoni F., Sallusto F., Lanzavecchia A. (2005): Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1–polarizing program in dendritic cells. *Nature immunology*. 6: 769 – 776.
- Nauseef W. M. (2014): Myeloperoxidase in human neutrophil host defense. *Cellular Microbiology*. 16. 1146-1155.
- Neufert C., Pai R. K., Noss E. H., Berger M., Boom W. H, Harding C V. (2001): *Mycobacterium tuberculosis* 19-kDa Lipoprotein Promotes Neutrophil Activation. *The Journal of Immunology*. 167: 1542-1549.
- Ohta A, Sitkovsky M. (2001): Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage. *Nature*. 414: 916-920.
- Ozinsky A., Underhill d. M., Dontenot J. D., Hajjar A. M., Smith K. D., Wilson C. B., Schroeder L., Aderem A. (2000): The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of Amerika*. 97:13766-13771.
- Pacheco-Yepez J., Rivera-Aguilar V., Barbosa-Cabrera E., Hernandez R., Jarillo-Luna R. A., Campos-Rodriguez R. (2011): Myeloperoxidase binds to and kills *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Parasite Immunology*. 33: 255-264.
- Page C., Genin P., Baines M. G., Hiscott J. (2000): Interferon activation and innate immunity. *Reviews in Immunogenetics*. 3: 374-386.
- Palchetti S., Starace D., Cesaris P., Filippini A., Ziparo E., Riccioli A. (2015): Transfected poly(I:C) activates different dsRNA receptors leading to apoptosis or immunoadjuvant response in androgen-independent prostate cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*.
- Panaro M. A., Mitolo V. (1999): Cellular responses to FMLP challenging: a mini-review. *Immunopharmacology and immunotoxicology*. 21: 397-419.
- Parkin D.M., Bray F., Ferlay J., Jemal A (2014): Cancer in Africa 2012. *Cancer epidemiology biomarkers & prevention*. 23: 953-966.
- Pedrosa J., Saunders B. M., Appelberg R., Orme I. M., Silva M. T., Cooper A. M. (2000): Neutrophils Play a Protective Nonphagocytic Role in Systemic *Mycobacterium tuberculosis* Infection of Mice. *Infection and Immunity*. 68: 577-583.

- Pfahlberg A., Kolmel K. F., Grange J. M., Mastrangelo G., Krone B., Botev I. V., Niin M., Seebacher C., Lambert D., Shafir R., Schneider D., Kokoschka E., Kleeberg U. R., Uter W., Gefeller O. (2002): Inverse Association Between Melanoma and Previous Vaccinations Against Tuberculosis and Smallpox: Results of the FEBIM Study. *Journal of Investigative Dermatology*. 119: 570–575.
- Poucher S. M., Keddie J. R., Singh P., Stoggall S. M., Caulkett P. W., Jones G., Coll M. G. (1995) The in vitro pharmacology of ZM 241385, a potent, non-xanthine A2a selective adenosine receptor antagonist. *British Journal of Pharmacology*. 115: 1096-1102.
- Redelman-Sidi G., Glickman M. S., Bochner B. H. (2014): The mechanism of action of BCG therapy for bladder cancer—a current perspective. *Nature Reviews Urology*. 11: 153-162.
- Rezvani A. R., Maloney D. G (2011): Rituximab resistance. *Best practise & research Clinical Haematology*. 2: 203-216.
- Rigel D. S., Carucci J. A. (2008): Malignant melanoma: Prevention, early detection, and treatment in the 21st century. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 50: 252-236.
- Sakamoto K. (2012): The Pathology of *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *Veterinary Pathology*. 49: 423-439.
- Salaun B., Coste I., Rissoan M. C., Lebecque S. J., Renno T. (2006): TLR3 Can Directly Trigger Apoptosis in Human Cancer Cells. *Journal of Immunology*. 176: 4894–4901.
- Satoh T., Kato H., Kumagai Y., Yoneyama M., Sato S., Matsuchita K., Tsujimura T., Fujita T., Akira S., Takeuchi O. (2010): LGP2 is a positive regulator of RIG-I- and MDA5-mediated antiviral responses. *Immunology*. 107: 1512-1517.
- Sauder D. N., Smith M. H., Senta-McMillian T., Soria I., Meng T. (2003): Randomized, Single-Blind, Placebo-Controlled Study of Topical Application of the Immune Response Modulator Resiquimod in Healthy Adults. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 47: 3846-3852.
- Schön M. a Schön M. P. (2007): The antitumoral mode of action of imiquimod and other imidazoquinolines. *Current Medicinal Chemistry*. 14: 681-687.
- Scribner D. J., Fahreney D. (1976): Neutrophil Receptors for IgG and Complement: Their Roles in the Attachment and Ingestion Phases of Phagocytosis. *The Journal of Immunology*. 116: 892-897.

- Schromm A. B., Lienc E., Henneke P., Chowd J. C., Yoshimurae A., Heineb H., Latza E., Monksa B. G., Schwartzf D. A., Miyakeg K., Golenbocka D. T. (2001): A Point Mutation in a Conserved Region of Md-2 Abolishes Endotoxin-Induced Signaling. *The Rockefeller University Press*. 194: 79-88.
- Sell S. (2004). Stem cell origin of cancer and differentiation therapy. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 51: 1-28.
- Selvatici R., Falzarano S., Mollica A., Spisan S. (2006): Signal transduction pathways triggered by selective formylpeptide analogues in human neutrophils. *European Journal of Pharmacology*. 534: 1-11.
- Shankaran V., Idera H., Bruce A. T., White J. M., Swanson P. E., Old L., Schreiber R. D. (2001): IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature*. 410: 1107-1101.
- Stassen M., Valeva A., Walev I., Schmitt E. (2006): Activation of mast cells by streptolysin O and lipopolysaccharide. *Methods of Molecular Biology*. 315:393-403.
- Stenger S., Modlin R., L. (2002): Control of *Mycobacterium tuberculosis* through mammalian Toll-like receptors. *Current Opinion in Immunology*. 14: 452-457.
- Švecová I. (2013): Optimalizace imunoterapie melanomu založené na kotvení laminarinu na povrch nádorových buněk. Diplomová práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. České Budějovice.
- Tailleux L., Schwartz O., Herrmann J. L., Pivert E., Jackson M., Amara A., Legres L., Dreher D., Nicod L. P., Gluckman J. C., Lagrange P. H., Gicquel B., Neyrolles O. (2003): DC-SIGN is the major *Mycobacterium tuberculosis* receptor on human dendritic cells. *The journal of experimental medicine*. 197: 121-127.
- Takeda K., Akira S. (2004): Microbial recognition by Toll-like receptors. *Journal of Dermatological Science*. 34: 73-82.
- Takeda K., Kaisho T., Akira S. (2003): Toll-like receptors. *Annual review of Immunology*. 21: 335-376.
- Takeuchi O., Kawai T., Sanjo H., Copeland N. G., Gilbert D. J., Jenkins N. A., Takeda K., Akira S. (1999): TLR6: A novel member of an expanding toll-like receptor family. *Gene*. 231: 59-65.
- Tanaka T., Ebisuno Y., Kanemitsu N., Umemoto E., Yang B., Jang M., Miyasaka M. (2004): Molecular Determinants Controlling Homeostatic Recirculation

and Tissue-Specific Trafficking of Lymphocytes. *International Archive sof Allergy and Immunology*. 134: 120-134.

- Testerman T. L, Gerster J. F., Imbertson L. M., Reiter M. J., Miller R. L., Gibson S. J., Wagner T. L., Tomai M. A. (1995): Cytokine induction by the immunomodulators imiquimod and S-27609. *Journal of Leukocyte Biology*. 58: 365-372.
- Tom J. K., Mancini R. J., Esser-Kahn A. P. (2013): Covalent modification of cell surfaces with TLR agonists improves & directs immune stimulation. *Chemical Communication*. 49: 9618-9620.
- Turner M. V. (2003): The role of mannose-binding lectin in health and disease. *Molecular Immunology*. 40: 423-429.
- Turvey S. E., Broide D. H. (2010): Innate Immunity. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 125: S24–S32 .
- Underhill D. M., Gantner B. (2004): Integration of Toll-like receptor and phagocytic signaling for tailored imunity. *Microbes and Infection*. 6: 1368-1373.
- Verdijk R. M., Mutis T., Esendam B., Kamp J., Melief C. J. M., Brand A., Goulmy E. (1999): Polyriboinosinic Acid (Poly(I:C)) Induces Stable Maturation of Functionally Active Human Dendritic Cells. *The Journal of Immunology*. 163: 57-61.
- Waldmannová E. (2014): Protinádorová imunoterapie založená na instalaci manózy na povrch nádorových buněk. Diplomová práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. České Budějovice.
- Warren H. S., Fitting C., Hoff E., Adib-Conquy M., Beasley-Topliffe L., Tesini B., Liang X., Valentine C., Hellman J., Hayden D., Cavaillon J. (2010): Resilience to Bacterial Infection: Difference between Species Could Be Due to Proteins in Serum. *The Journal of Infection Diseases*. 2: 223-232.
- Weinberg D. A. (2013): The biology of Cancer. Second Edition. Garland Science. New York, 960 str.
- Weissmann G., Zurier R. B., Hoffstein S. (1972): Leukocytic proteases and the immunologic release of lysosomal enzymes. *The American Journal of Pathology*. 68: 539-564.
- WHO. Cancer mortality and morbidity [online]. [cit. 2015-02-22].

http://www.who.int/gho/ncd/mortality_morbidity/cancer/en/index.html

- Woo E. Y., Yeh H., Chu C. S., Schlienger K., Carroll R. G., Riley J. L., Kaiser L. R., June C. H. (2002): Cutting Edge: Regulatory T Cells from Lung Cancer Patients Directly Inhibit Autologous T Cell Proliferation. *Journal of Immunology*. 168: 4272-4276.
- Yamamoto M., Sato S. Mori K., Hoshino K., Takeuchi O., Takeda K. Akira S. (2002): Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. *Journal of Immunology*. 169: 6668-72.
- Yuk J. M., Jo E. K. (2011): Toll-like Receptors and Innate Immunity. *Journal of Bacteriology and Virology*. 4: 225-235.
- Zeh H. J., Lotze M. T. (2005): Addicted to death: invasive cancer and the immune response to unscheduled cell death. *The Journal of Immunotherapy*. 28: 1-9.
- Zhou Y., Bian X., Le Y., Gong W., Hu J., Zhang X., Wang L., Iribarren P., Salcedo R., Howard O. M., Farrar W., Wang J. M. (2005): Formylpeptide receptor FPR and the rapid growth of malignant human gliomas. *Journal of National Cancer Institute*. 11: 823-825.