

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Přírodovědecká fakulta**



**Terapie nádorových onemocnění založená na ukotvení  
laminarinu na povrch nádorových buněk**

Bakalářská práce

**Marie Auerová**

školitel: RNDr. Jan Ženka, CSc.

České Budějovice 2012

Auerová, M., 2012: Terapie nádorových onemocnění založená na ukotvení laminarinu na povrch nádorových buněk. [Therapy of cancer based on the fixation of laminarine to the surface of tumor cells. Bc. Thesis, in Czech] – 42 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

**Annotation:**

The aim of this thesis is to evaluate the therapeutic effect of laminarin and its fixation to the surface of tumor cells. The study also deals with possible synergy with TLR activation based on LPS application.

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

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

V Českých Budějovicích, dne 22.4.2012

.....  
Marie Auerová

## **Poděkování:**

Mé poděkování patří zejména panu školiteli RNDr. Janu Ženkovi, CSc. za veškeré odborné vedení, ochotu kdykoli pomoci, cenné rady a velkou dávku trpělivosti v průběhu vypracovávání této diplomové práce.

Rovněž bych chtěla poděkovat prof. RNDr. Janu Kopeckému, CSc. a RNDr. Jiřímu Salátovi, PhD. za jejich vstřícnost, poskytnutí prostředků a zázemí na Oddělení imunologie parazitů Parazitologického ústavu AV ČR v Českých Budějovicích.

V neposlední řadě bych ráda poděkovala za pomoc a vytvoření příjemného pracovního prostředí všem kolegyním, velký dík také směřuje rodině, partnerovi a přátelům za jejich podporu.

# Obsah

<b>1. Úvod.....</b>	<b>1</b>
1.1. Rakovina – nádorové bujení.....	1
1.1.1. Historie .....	1
1.1.2. Definice nádorů .....	2
1.1.3. Rozdělení nádorů.....	3
1.1.3.1. Dělení dle biologického chování.....	3
1.1.3.2. Dělení dle histologického původu.....	4
1.1.3.3. Melanom.....	5
1.1.3.3.1. Myší melanom .....	6
1.1.4. Příčiny a vznik nádorů.....	6
1.2. Léčba rakoviny .....	7
1.2.1. Imunoterapie.....	8
1.2.1.1. Humorální imunoterapie .....	8
1.2.1.2. Buněčná imunoterapie .....	9
1.3. Rakovina a imunitní systém .....	10
1.3.1. Imunitní systém .....	10
1.3.1.1. Imunitní dohled .....	11
1.3.2. Efektory přirozených protinádorových mechanismů .....	13
1.4. Terapie nádorů založena na stimulaci nespecifické imunity.....	14
1.4.1. Akutní zánět .....	14
1.4.2. Fagocytóza .....	16
1.4.2.1. Rozpoznávací mechanismy fagocytů.....	16
1.4.3. $\beta$ -glukany.....	18
1.4.3.1. Účinky na imunitní systém.....	19
1.4.3.2. $\beta$ -glukanové fagocytární receptory .....	19
1.4.3.3. TLR 2 a jeho spolupráce s fagocytárními $\beta$ -glukanovými receptory.....	20
1.4.3.4. Laminarin .....	22
<b>2. Cíle práce .....</b>	<b>23</b>
<b>3. Materiál a metody .....</b>	<b>24</b>
3.1. Materiál .....	24

3.1.1.	Chemikálie .....	24
3.1.2.	Experimentální zvířata .....	24
3.1.3.	Buněčná linie.....	24
3.2.	Metody .....	25
3.2.1.	Příprava buněk melanomu B16-F10 pro užití in vivo.....	25
3.2.2.	Transplantace nádorových buněk B16-F10.....	25
3.2.3.	Měření velikosti nádoru .....	25
3.2.4.	Měření teploty nádoru a myši.....	26
3.2.5.	Vyhodnocení počtu metastáz .....	26
3.2.6.	Statistické vyhodnocení dat.....	26
3.2.7.	Příprava laminarin - BAM.....	26
3.2.8.	Pokus č. 1: Působení laminarinu samotného i ve směsi s LPS na růst melanomů 27	
3.2.9.	Pokus č. 2: Studium vlivu kotvení laminarinu na povrch nádorových buněk na jeho protinádorovou účinnost a řešení otázky synergie s LPS .....	27
3.2.10.	Pokus č. 3: Synergie působení kotveného laminarinu (laminarin-BAM) s LPS/LTA.....	28
<b>4.</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>29</b>
4.1.	Pokus č. 1: Působení laminarinu samotného i ve směsi s LPS na růst melanomů 29	
4.2.	Pokus č. 2: Studium vlivu kotvení laminarinu na povrch nádorových buněk na jeho protinádorovou účinnost a řešení otázky synergie s LPS .....	31
4.3.	Pokus č. 3: Synergie působení kotveného laminarinu (laminarin-BAM) s LPS/LTA.....	34
<b>5.</b>	<b>Diskuse.....</b>	<b>37</b>
<b>6.</b>	<b>Závěr.....</b>	<b>39</b>
<b>7.</b>	<b>Seznam použité literatury.....</b>	<b>40</b>

# 1. Úvod

## 1.1. Rakovina – nádorové bujení

Skupina více než sta chorob spadajících pod pojem rakovina se v současné době v důsledku stárnutí populace, kouření a špatné životosprávy stala nejčastějším důvodem úmrtí. Ročně jí podlehnou miliony lidí. Postihuje jednoho člověka ze tří. Každý čtvrtý muž a každá pátá žena pak bitvu s touto zákeřnou nemocí prohrávají (Jemal et al., 2011; Knowles a Selby, 2005).

### 1.1.1. Historie

Dávné rčení, že rakovina je stejně stará jako lidstvo samo, má sice zčásti reálný základ, nicméně paleontologické nálezy dokazují výskyt nádorového bujení u zvířat již v prehistorických dobách a daleko předtím, než se na Zemi objevil člověk. Nejstarší dochovaný popis zhoubného nádorového onemocnění je možno nalézt v Edwin Smithově Papyru, jenž byl napsán přibližně 3 – 2,5 tisíce let před naším letopočtem. Jeho autor došel k závěru, že rakovina prsu je vážné onemocnění, které nelze vyléčit. Ebersův Papyrus, datovaný kolem roku 1500 př. n. l., poprvé zmiňuje nádor měkké tkáně, lipom, a obsahuje zmínky o možné rakovině kůže, dělohy, žaludku a konečníku. Zajímavostí je, že Egyptané se nádory pokoušeli léčit vypálením, vyříznutím, aplikací solí a arzenové pasty, která byla používána jako „egyptské mazání“ až do 19. století (Hajdu, 2011).

Hippokrates (460-375 př. n. l.) a jeho následovníci odůvodnili vznik rakoviny přemírou nebo nedostatkem krve, hlenu, žluče a dalších tělních sekretů, a to převážně ve starším věku. Řeční lékaři věděli o rakovině kůže, úst, žaludku a prsu. Hippokrates pak také dokázal

rozlišit nezhoubný nádor od zhoubného. Ten pojmenoval termínem *karkinóma*, neboť mu připomínal pohyb kraba (Hajdu, 2011; Trnka, 2008).

Předmětem novodobých výzkumů se rakovina stala relativně pozdě. Do 19. století se jednalo o chorobu poměrně vzácnou, neboť v té době se průměrná evropská délka života pohybovala okolo 35 let. Rakovina však postihovala a postihuje zejména vyšší věkové skupiny. Pokud se objevil takovýto starší pacient, na nádorové bujení bylo nahlíženo spíše jako na projev Boží vůle či náhodu. Jiná vysvětlení se začala objevovat teprve na konci 18. století v podobě teorií, že kancerogeneze může být spojena se specifickými zkušenostmi či stylem života pacientů (Wienberg, 1998).

Roku 1775 londýnský chirurg Percival Pott pozoroval zvýšený výskyt karcinomu šourku u kominíků, čímž odhalil příčinnou vazbu mezi vznikem rakoviny a pravidelným kontaktem s uhelným prachem a sazemi. Další příklady naznačovaly možnou souvislost mezi šňupáním tabáku a rakovinou nosu, těžením uranu a rakovinou plic, prací s rentgenovým zářením a rakovinou kůže i leukémií, atd. (Trnka, 2008; Wienberg, 1998).

Výsledků Pottova výzkumu využili v roce 1915 japonští vědci Jamagiva a Išikava, kteří opakovaně potírali uši králíků uhelným prachem, což vedlo ke vzniku karcinomu. Tímto pokusem zahájili éru experimentální onkologie (Trnka, 2008).

Bylo rovněž zjištěno, že četnost výskytu různých druhů rakoviny je dána také geografickou polohou. Např. rakovina žaludku postihuje 11x častěji lidi žijící v Japonsku než v Americe, výskyt rakoviny tlustého střeva je 20-30x vyšší ve Spojených státech než v určitých regionech Afriky, atd. Z těchto výsledků vyplynulo, že významnou roli při kancerogenezi hrají i vnější faktory jako životní prostředí, životní styl a výživa člověka (Wienberg, 1998).

### **1.1.2. Definice nádorů**

Možností, jakými lze definovat nádory, existuje mnoho. Jedna z definic zní, že nádor je nahroučení abnormálních buněk, jež se od standardních buněk liší svým růstem. Ten pokračuje i ve chvíli, kdy původní příčina podněcující nádorový růst již na buňky nepůsobí (Mačák a Mačáková, 2004).

Další hovoří o vzniku nádoru ireverzibilní změnou tkáně - jejím neregulovatelným růstem, který má autonomní povahu. Nádorové buňky jsou téměř ve všech případech pozměněné

buňky vlastního těla vznikající tak, že se vyhnou kontrolním mechanismům regulujícím správný růst zdravých tkání (Mačák a Mačáková, 2004).

Používanými synonymy slova nádor jsou blastom, neoplazie nebo tumor. Ne všechna jsou však užívána správně, např. pojmem tumor se v klinické diagnóze označuje jakékoli zduření. Laická veřejnost také často nazývá karcinomem i benigní nádorová bujení, ačkoli se tento termín v odborné praxi vztahuje jen na maligní epitelové nádory (Mačák a Mačáková, 2004).

### **1.1.3. Rozdělení nádorů**

Typy nádorů se odvozují od tkáně, ze které vznikly, přidáním přípony –om. Rozlišujeme také nádory nepravé, nazývané pseudotumory (Mačák a Mačáková, 2004). Ty připomínají nádory navenek, např. svým tvarem nebo strukturálně - pozměněním buněk, ale celkový charakter naznačuje, že se o pravé nádory nejedná. Do této kategorie patří hyperplazie, hamancie, choristie, cysty, ukládání patologického materiálu či zánětlivý pseudotumor (Miřejovský a Bednár, 1994).

#### **1.1.3.1. Dělení dle biologického chování**

Z hlediska biologického chování se pravé nádory dělí na benigní neboli nezhoubné a maligní čili zhoubné. Některé prameny uvádí také třetí skupinu, nádory intermediární, což jsou novotvary na hranici mezi dvěma předešlými skupinami - prognóza je příznivější než u maligních nádorů, ale občas recidivují, tvoří metastázy (Mačák, 2002).

**Benigní nádory** vykazují pomalý a expanzivní růst, což znamená, že svým zvětšováním a rozšiřováním utlačují okolní tkáně. Při nepříznivé lokalizaci mohou mít pro pacienta smrtelné následky. Novotvary tohoto typu bývají ohraničené a opouzďené. Jsou většinou jednoduše chirurgicky odstranitelné, růst se neopakuje, nemetastazují. Jedná se o zralé, diferenciované buňky (Mačák a Mačáková, 2004; Miřejovský a Bednár, 2000).

Mačák (2002) ve své publikaci uvádí, že „**maligní nádory** rostou rychle, jsou nepřesně ohraničené a zpravidla neopouzďené. Buňky jsou málo diferenciované nebo zcela nezralé, zpravidla se u nich vyskytují četné mitózy (i atypické). Růst je infiltrativní, nádory metastazují. Působí celkově, vedou ke kachexii, anémii, paraneoplastickým syndromům.“

Hranice mezi jednotlivými nádorovými skupinami nelze pevně vymezit, novotvar může být např. ohraničený, a přesto tvořit metastázy. Jediným skutečně průkazným projevem pro



skupinu maligních onemocnění je zmíněné metastázování (=vytváření sekundárních shluků rakovinných buněk, které se uvolnily od původního nádoru a nashromáždily se na jiném místě s příhodnými podmínkami) a invazivita (Mačák, 2002).

K rozčlenění pacientů do skupin, jež mají různé odhady dalšího vývoje nemoci a vyžadují tak různou léčbu, se používá „grading“ - stanovení stupně diferenciacie nádorových buněk, a „staging“ - stanovení velikosti, rozsahu a dalších klinických znaků nádoru (Mačák a Mačáková, 2004).

### **1.1.3.2. Dělení dle histologického původu**

Novotvary podle histogeneze rozdělujeme na:

#### **a) mezenchymové**

Patří sem nádory nezhoubné z pojivových tkání, vaziva (fibrom), chrupavky (chondrom), tukové tkáně (lipom), svaloviny (myom), cév, atd.

Maligní mezenchymové nádory se nazývají sarkomy (fibrosarkom, liposarkom,...).

#### **b) hematopoetické**

Jedná se o nádory z krve tvorných tkání, k maligním novotvarům tohoto druhu spadají leukémie a lymfomy.

#### **c) epitelové**

Mezi benigní nádory řadíme papilomy vycházející z krycí a výstelkové tkáně a adenomy ze žlázového epitelu. Zhoubné nádory epitelových buněk se pak označují jako karcinomy.

#### **d) z nervové tkáně a pigmentových buněk kůže**

Do této kategorie spadají nádory mozku, míchy a periferních nervů (benigní např. – gliom, maligní – glioblastom). Mezi nádory z nervové tkáně se řadí také melanom coby maligní novotvar, benigní se běžně vyskytuje jako pigmentový névus.

#### **e) smíšené**

Při histologickém vyšetření zjistíme, že se tyto nádory skládají ze dvou nebo více různých struktur. Mohou být obě mezenchymového původu (např. fibrolipom), nebo obsahují struktury epitelového a mezenchymového původu (fibroadenom).

#### **f) nádory ze zárodečných tkání (germiomy)**

Benigním druhem je teratom, kterému dávají vzniknout zárodečné buňky vaječníku/varlete, nebo se objevuje na základě vývojové anomálie. Maligním pak seminom, embryonální karcinom.

### **g) nádory trofoblastu**

Tato skupina zahrnuje nádorové bujení trofoblastu (zevní vrstvy buněk embrya ve stádiu blastocysty). Nezhoubným druhem je mola hydatidosa, zhoubným choriokarcinom (Miřejovský a Bednár, 1994; Mačák a Mačáková, 2004; Trnka, 2008).

#### **1.1.3.3. Melanom**

Melanom vzniká z melanocytů, což jsou pigmentové buňky neuroektodermálního původu nacházející se v pokožce, v některých orgánech (očích), vzácně ve škáře a sliznicích.

Pacientů s diagnostikovaným kožním melanomem každým rokem přibývá, Trnka ve své knize uvádí, že v roce 1970 maligní melanom v České republice postihoval 3,3/100 tis. obyvatel, zatímco v roce 2003 už to byl více než pětinašobek - 17,1/100 tis. obyvatel (Trnka, 2008). Kasper hovoří o incidenci této choroby u obyvatel USA. Ročně se objeví 54 200 nových pacientů, z čehož více než 8 200 případů končí smrtí. Ačkoli četnost výskytu oproti jiným nádorovým onemocněním kůže není příliš vysoká, nebezpečí spočívá v jeho vysoké agresivitě biologického chování (Kasper et al., 2005).

Melanom postihuje všechny věkové skupiny, nejčastěji osoby dospělého věku. Náchylnější skupinou jsou pak lidé fototypu I a II, neboť za rizikový faktor jeho vzniku je považováno UV záření, potažmo opakované solární dermatitidy v raném dětství či po krátkodobém, ale intenzivním vystavení UV paprskům – dovolené u moře, solária (Kasper et al., 2005; Trnka, 2008).

Klinicky se rozlišují čtyři základní formy:

**Povrchově se šířící melanom** - nejběžnější forma, má tvar nepravidelného oblouku, je vyvýšen cca 2-4 mm nad úroveň pokožky, barva přechází od světle hnědé přes hnědou, šedou, černou po fialovo-růžovou a bílou.

**Nodulární melanom** - roste velice rychle jako vředovitý, na povrchu zaschlý uzlík, tvarově je relativně uniformní s tmavou, modrou-černou barvou.

**Lentigo maligna melanom** – ze všech uvedených forem bývá největší (zabírá největší plochu), je často zaměňován s povrchově se šířícím melanomem díky podobnému zabarvení, bývá však zcela nepravidelný, nevyvýšený. Vzniká malignizací Dubreuilhovy melanózy.

**Akrální melanom** - častěji se vyskytuje u černochů, Hispánců a Asiatů, v podobě zvětšujícího se mateřského znaménka na dlaních či chodidlech (Wallace et. al., 1969; Kasper et al., 2005).

Jedinou efektivní léčbou melanomu je chirurgické odstranění primárního nádoru tak rychle, jak je to jen možné. Jeho špatná prognóza pramení z deficitu dostatečně citlivých a specifických sérových markerů pro imunitní dohled nad vznikajícím melanomem v raném stádiu ( Hiura et al., 2011).

#### **1.1.3.3.1. Myší melanom**

Myší melanomové modely se využívají již od počátku 20. století, kdy bylo na myších kmenech objeveno nádorové bujení melanomového typu. Buňky z těchto spontánně vznikajících neoplazií bylo možné transplantovat do kongenních myší, nebo kultivovat a studovat in vitro. Pomohly odpovědět na mnoho otázek týkajících se biologických procesů tohoto druhu rakoviny. (Damsky a Bosenberg, 2010).

Pro onkologický výzkum má obrovský význam myší melanom B16 (v podobě solidního tumoru i metastáz). Tato buněčná linie byla charakterizována v roce 1954, od roku 1970 se kultivuje a transplantuje za účelem studia metastáz, jež vznikají v plicích, játrech a slezině Teicher et al., 2011).

#### **1.1.4. Příčiny a vznik nádorů**

Oproti jiným onemocněním existuje u rakoviny mnoho příčin jejího vzniku, což znesnadňuje vytvoření přesného obrazu patogeneze této nemoci. Klasické etiologické faktory se z velké části vztahují jen ke specifickým druhům nádorů (Miřejovský a Bednár, 1994).

Mačák a Mačáková (2004) ve své publikaci řadí mezi vlivy podílející se na kancerogenezi toto:

##### **a) chemické látky zevního prostředí**

Tyto látky jsou označovány jako karcinogeny. Jedná se hlavně o látky odvozené z dehtu, areny - benzen, dále pak například vinylchlorid, aflatoxin, radon, látky obsažené v cigaretovém kouři (způsobující rakovinu plic), v alkoholu (rakovina hltanu a jícnu, nepřímo i karcinom jater),...

##### **b) fyzikální vlivy**

K dobře doloženým faktorům této skupiny patří rentgenové záření a obecně záření o krátké vlnové délce, ionizující záření (souvislost s vznikem leukémií byla zjištěna v Hirošimě a Nagasaki) a sluneční UV záření (především UV-B ) zvyšující výskyt melanomů.

### **c) viry**

Podíl virů na kancerogenezi byl objeven a prokázán u zvířat. U člověka je zjištěna nepřímá souvislost s nádory u Epstein-Baar viru (Burkittův lymfom v oblasti centrální Afriky), papilomavirů a herpes virů (karcinom děložního čípku), možné nepřímé spojení existuje mezi virem HIV a vznikem lymfomů.

### **d) hormony**

Pro vliv hormonů na vznik nádorového bujení mluví zejména zvýšená četnost zhoubných nádorů u žen v klimakteriu, tedy v období, kdy se mění hladiny hormonů. Zvýšené množství estrogenů tak pravděpodobně vede k rakovině prsu, endometria a vaječníků.

### **e) dědičnost**

Tento faktor se zdá být v současné době méně důležitým. Jedná se spíše o dědičnost chorob přispívajících ke vzniku nádorů, což způsobuje vyšší náchylnost jedince k určitým druhům rakoviny.

### **f) dietetické zvyklosti a faktory okolního prostředí**

Tato kategorie vyplývá ze sledování obsáhlejšího vzorku lidí v různých lokalitách, které se liší způsobem stravy, tedy kvalitou potravy a její úpravou (Mačák a Mačáková, 2004).

Opakované vystavování chemikáliím, virům nebo fyzikálním vlivům uvedeným výše vede ke změnám v buněčném genomu. Z protoonkogenů, normálních genů ovlivňující růst a vývoj buněk, se (např. virovou transdukcí, bodovou mutací, translokací, nebo genovou amplifikací) stávají onkogeny, které posléze způsobují transformaci normální buňky v buňku nádorovou (Mačák a Mačáková, 2004).

Tento proces přeměny, tedy kancerogeneze, se skládá z několika stádií. První je stádium iniciace, kdy dochází k mutagennímu účinku daného karcinogenu. Následuje fáze promoce. Ta může být navozena látkami, jež primárně nejsou karcinogenní, avšak podporují klonální expanzi iniciovaných buněk. Posledním, třetím stádiem je progres, v němž se některé z těchto benigních nádorů spontánně nebo v důsledku dalšího vystavení karcinogenům přemění v maligní invadující nádory (Knowles a Selby, 2005).

## **1.2. Léčba rakoviny**

Hlavní účel léčby je rakovinu vymýtit. Pokud tohoto primárního cíle nelze dosáhnout, snaha zdravotníků se zaměřuje na zmírnění bolesti a symptomů, rovněž pak na zachování

kvality života, především ve snaze ho prodloužit. Lékařská zásada *primum non nocere*, tedy „především neškodit“, v terapii nádorů příliš neplatí. Pokud je léčba rakoviny možná, pacient by ji měl podstoupit navzdory možnosti nebezpečných, i život ohrožujících toxicit. Každý z léčebných postupů rakoviny má potenciál způsobit pacientovi újmu, a tak se lékařské pravidlo mění na *primum succerrere* – „především neprodleně pomoci“.

Terapie nádorů může být rozdělena do čtyř hlavních skupin: chirurgický zákrok, ozařování (včetně fotodynamické terapie), chemoterapie (zahrnující hormonální molekulárně cílenou terapii) a biologická terapie (imunoterapie a genovou terapii). Tyto druhy se často používají v kombinaci a léčebné prostředky v jedné kategorii mohou pracovat na principu několika mechanismů (Kasper et al., 2005).

### **1.2.1. Imunoterapie**

Modulace imunitního systému za terapeutickým účelem má dlouhou historii sahající až k Edwardu Jennerovi, který v roce 1796 prvně použil kravské neštovice k navození imunity proti neštovicím pravým. Od té doby imunoterapie, ve formě profylaktických a terapeutických vakcín, umožnila lékařům ošetřovat a předcházet mnoha infekčním nemocem. S imunoterapií se v současné době stále více shledáváme také na poli onkologie, v níž se snaží využít síly a specifity imunitního systému - s většími či menšími úspěchy. Ačkoli jsou rakovinné buňky méně imunogenní než patogeny, imunitní systém je schopen je rozpoznat a eliminovat. Avšak nádory často interferují s vývojem a funkcí imunitní odpovědi. Proto je imunoterapie spíše doplňující formou léčby ke zničení buněk, které v těle zbyly po chirurgickém zákroku, chemoterapii či ozařování. Využít plně výhod buněčné a molekulární imunologie a rozvinout strategie, jež efektivně a bezpečně zvýší protinádorovou odpověď, tedy zůstává velkou výzvou (Murphy, 2010).

Rozdělujeme dva základní typy imunoterapie v závislosti na efektorech, které zprostředkovávají imunitní odpověď. Jedná se protilátkovou (humorální) a buněčnou imunoterapii (Hořejší a Bartůňková, 2009).

#### **1.2.1.1. Humorální imunoterapie**

Hořejší a Bartůňková (2009) ve své knize uvádí, že tento druh terapie je založen na využití:

#### **a) monoklonálních protilátek**

Tyto protilátky (produkované jedním klonem B-lymfocytů - vykazující tak totožnou antigenní specifitu) konjugované s toxiny se vážou na nádorový antigen, čímž dopravují tyto látky přímo k nádorům. Mohou působit také samy o sobě – vazbou na TAA (antigeny asociované s nádory) působí programovanou buněčnou smrt, nádor opsonizují či indukují ADCC (na protilátkách závislou buněčnou cytotoxicitu). Problémem je možné poškození buněk v okolí nádoru a častá rezistence nádorových buněk, která vznikla dřívější imunoselekcí (Hořejší a Bartůňková, 2009)

#### **b) bispecifických protilátek**

Uměle syntetizované bispecifické protilátky se zároveň vážou jak na nádorový antigen, tak i na povrch T – lymfocytů nebo NK buněk. Jejich Fc oblasti mohou rovněž vazbou na příslušné receptory aktivovat fagocyty (Hořejší a Bartůňková, 2009).

### **1.2.1.2. Buněčná imunoterapie**

Zahájení imunoterapie zprostředkované buňkami může být provedeno:

#### **a) nespecifickou stimulací zánětu**

Do místa nádoru se injikuje cizorodá látka vyvolávající zánět a příliv imunitních buněk spolu s ní likviduje i nádorové buňky.

#### **b) pomocí LAK (*lymphokine activated killers*) a TIL (*tumor infiltrating lymphocytes*) buněk**

Pacientovi se odeberou určité imunocyty, které se následně stimulují *in vitro* cytokiny (=signální proteiny sloužící k regulaci imunitní odpovědi) za účelem zvýšení aktivity nádorově specifických buněk a poté se navrací zpět do oběhu.

#### **c) zlepšením antigen-prezentující funkce nádorových buněk**

*In vitro* je provedena genetická úprava nádorových buněk, jež pak exprimují kostimulační molekuly nebo produkují cytokiny a stávají se APC (antigen prezentujícími buňkami). Pomocí chemoterapie či radioterapie se zabrání jejich dalšímu dělení a navrátí se pacientovi, případně se kultivují společně s T-lymfocyty za účelem vybuzení nádorově specifických klonů, které ničí zároveň i původní, nezměněné rakovinné buňky.

#### **d) použitím nádorových vakcín**

Pomocí uměle vyrobených peptidů rozpoznávaných nádorově specifickými T-lymfocyty se uvnitř nebo vně onkologického pacienta stimulují Tc a Th1, které pak s nádory vcelku

úspěšně bojují. Tuto metodu však nelze využít na široký okruh pacientů a může vést k vedlejším účinkům při reakci lymfocytů se zdravými buňkami, které na svém povrchu daný peptid také nesou.

**e) pomocí dendritických buněk**

Ty se připraví z periferních monocytů jejich vystavením směsi vybraných cytokinů, jsou následně kultivované s nádorovými antigeny a po jejich navrácení do těla pacienta působí stimulačně na T-lymfocyty.

**f) pomocí T lymfocytů dárce (po alogenní transplantaci)**

Ačkoli imunitní buňky dárce nejsou za normálních okolností při transplantaci žádané a mohou vést k životu ohrožující reakci štěpu proti hostiteli, v případě transplantace kostní dřeně se jich využívá (v malém množství) pro zničení zbylých nádorových buněk pacienta.

**g) pomocí produktů imunitního systému**

Těmi jsou například interleukiny (IL-2), interferony (IFN- $\alpha$  a IFN- $\gamma$ ) nebo faktory stimulační kolonie (GM-CSF). Nevýhodou je, že při vyšším dávkování vykazují systémovou toxicitu (Hořejší a Bartůňková, 2009).

### **1.3. Rakovina a imunitní systém**

#### **1.3.1. Imunitní systém**

Imunitní systém přispívá k udržení stálého vnitřního prostředí organismu jeho ochranou před nebezpečím způsobeným cizorodými (mikroorganismy, jejich toxiny) i tělu vlastními elementy (poškozené a nádorové buňky). Rozlišujeme dvě hlavní skupiny mechanismů, které se podílí na rozpoznání a eliminaci škodlivin – mechanismy vrozené (nespecifické) a získané (specifické) imunity (Bartůňková a Vernerová, 2002).

První jmenované zahrnují komplementový systém (sadu enzymů přítomných v séru, které po aktivaci vyvolávají celou řadu zánětlivých účinků, lýzu bakterií, atd.) fagocytující buňky (makrofágy, neutrofilny, eosinofily – pohlcují cizorodá tělesa) a NK buňky (detaily uvedeny v kapitole 1.3.2.). Reakce na antigen je rychlá (minuty až hodiny) a uniformní. Děje se tak pomocí receptorů na buněčném povrchu, které rozpoznávají přímo bakteriální složky (lipopolysacharidy, lektiny,...) nebo nepřímo Fc části protilátky či složky komplementu (Bartůňková a Vernerová, 2002; Playfair a Chain, 2000).

Naproti tomu vývojově mladší (ale dokonalejší) systém získané imunity je založen na působení lymfocytů a protilátek. Reakce na přítomnost cizorodé látky trvá delší dobu (dny až týdny), dochází při ní mimo jiné k formaci paměťových buněk, které při opětovném setkání vyvolají rychlejší a účinnější odpověď. Lymfocyty mají na své membráně receptory rozpoznávající jeden určitý antigen, na nějž pak tyto buňky reagují (Bartůňková a Vernerová, 2002).

### **1.3.1.1.Imunitní dohled**

Před více než sto lety přišel Paul Ehrlich s myšlenkou, že imunitní systém může rozpoznávat a regulovat nádorové bujení. V té době však byla imunologie velmi mladým vědním oborem, zdravotnická obec proto na tuto teorii nahlížela s despektem. V padesátých a šedesátých letech 20. století Lewis Thomas a Macfarlane Burnet dali Ehrlichově představě formální podobu vytvořením termínu *imune surveillance* – imunitní dohled. Ani ten nebyl v následujících letech obecně přijímán, neboť pro něj neexistovaly dostatečné důkazy. Naštěstí diskuze o této teorii a experimentální testování její pravdivosti neustaly, a tak na počátku 21. století máme stále rostoucí počet důkazů o tom, že je imunita zahrnuta do procesu iniciace, růstu a metastázování nádorů (Smyth a Hayakawa, 2004; Cotran et al., 2010).

V současné době je myšlenka imunitního dohledu podporována například pozorováním přítomnosti lymfocytických infiltrátů okolo nádorů a v lymfatických uzlinách drenujících místa rakoviny, výsledky experimentů většinou s transplantovanými nádory, zvýšeným výskytem některých druhů rakovin u imunodeficientních jedinců (např. u pacientů s AIDS je výskyt rakoviny významně častější) a přímým důkazem tumor-specifických T-lymfocytů a protilátek u pacientů. V současné době se kromě ochranné role mluví také o vlivu imunitního dohledu selekci nádorových variant. Ty pak mají sníženou imunogenicitu, čímž mohou snadněji unikat imunoloické detekci a eliminaci. (Cotran et al., 2010; Jílek, 2002)

Z výskytu rakoviny u imunokompetentních jedinců vyplývá, že systém imunitního dohledu není dokonalý. Nádorové buňky tedy musely vyvinout mechanismy, jak obejít imunitní systém. Předpokládá se, že mu unikají těmito způsoby:

#### **a) selekcí antigen-negativních variant**

Zmíněno již výše - silně imunogenní subklony jsou eliminovány.



**b) ztrátou nebo redukcí exprese MHC molekul**

Tento stav vede k odvrácení útoku T-lymfocytů, avšak aktivuje makrofágy.

**c) nedostatečnou kostimulací**

Navození senzitivity T-lymfocytů vyžaduje dva signály, jeden od cizího peptidu prezetovaného MHC molekulami (bývá exprimován) a druhý od kostimulačních molekul (často chybí). Tento stav může dokonce vyústit v apoptózu T- buněk.

**d) imunosupresí**

Potlačení imunitního systému je způsobeno onkogenními látkami (např. ionizačním zářením), nebo přímo produkty nádorů (TGF-β).

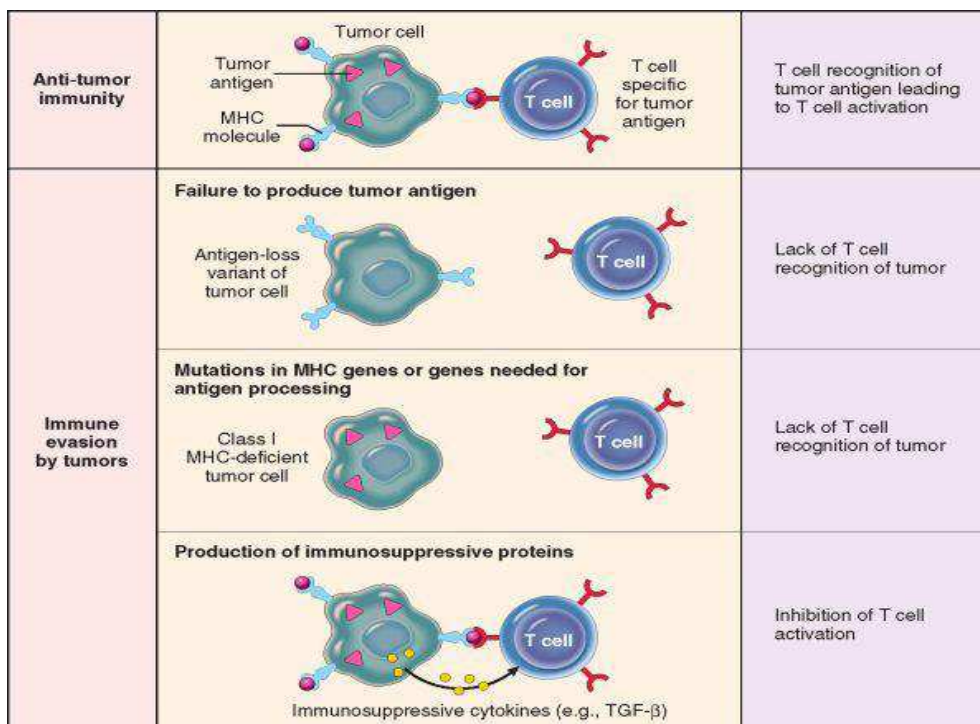
**e) maskováním antigenu**

Povrchové antigeny nádorů mohou být skryty či maskovány pomocí glykokalyxových molekul.

**f) apoptózou cytotoxických T buněk**

Některé melanomy a hepatocelulární karcinomy exprimují Fas ligand (bližší informace v kapitole 1.3.2.). Rakovinné buňky tak mohou eliminovat tumor-specifické nádorové T buňky, které s nimi přijdou do kontaktu (Cotran et al., 2010).

Přehled mechanismů, jimiž nádorové buňky unikají T buněčné imunitě, je uveden na Obr. 1.



**Obr.1** Znárodnění mechanismů úniku nádorových buněk T lymfocytům (Cotran et al., 2010)

### **1.3.2. Efektory přirozených protinádorových mechanismů**

Buněčná imunita je hlavním *in vivo* mechanismem boje organismu proti rakovině (Cotran et al. 2010). Podílí se na něm:

#### **a) Cytotoxické T lymfocyty (CTL, Tc)**

T lymfocyty jsou buněčnými efekty získané imunity vyvíjející se ze svých prekurzorů v brzlíku. Zralé T buňky se vyskytují v krvi a tvoří 60 – 70 % všech lymfocytů. Každý z těchto imunocytů nese specifický T buněčný receptor (TCR), který rozpoznává antigenní peptid vázaný hlavním histokompatibilním komplexem (MHC I) na povrchu antigenprezentujících buněk. K vyvolání proliferace a diferenciaci prekurzů je však třeba dalších signálů zprostředkovaných právě APC; pokud je T buňka nedostane, vede to k jejímu utlumení.

Zralým cytotoxickým T lymfocytům pak stačí signál pouze od TCR a specializují se na eliminaci napadených (intracelulárními parazity) a abnormálních (poškozených stresem, nádorových) buněk. Jejich reakce vyžaduje velmi blízký kontakt s nežádoucí buňkou a bývá velmi radikální, s poměrně vysokým rizikem poškození okolní tkáně. Usmrcení „vadné“ buňky probíhá třemi možnými způsoby: pomocí **perforinu** (tvoří póry v buněčné membráně – osmotická lýza, průnik proteáz) a **granzymů** (proteázy startující proces apoptózy) obsažených v cytotoxických granulách CTL. Dále pomocí **Fas ligandu** (FasL), proteinu na povrchu CTL, který se váže na „apoptický receptor“ FasR přítomný na mnoha buňkách, včetně CTL, díky němuž může být imunitní odpověď CTL regulována. Posledním mechanismem je sekrece **lymfotoxinu** (LT; TNF- $\beta$ ) se stejným účinkem jako má FasL, je však nejméně specifický a při rozsáhlé aktivaci CTL může způsobit vážné škody na okolní zdravé tkáni (Hořejší a Bartůňková, 2009; Jílek, 2005).

Protinádorové účinky CTL jsou dobře prokázány v experimentálně vyvolaných nádorech. CD8 + CTL vykazují ochrannou funkci před nádory spjatými s viry (např. nádory vyvolané EBV nebo HPV) a byly zjištěny v krevních a nádorových infiltrátech pacientů s rakovinou (Cotran et al., 2010).

#### **b) Natural killers buňky (přirození zabíječi):**

Tvoří 10 – 15 % lymfocytů periferní krve. Morfologicky se jedná o velké granulární lymfocyty, které neexprimují TCR ani imunoglobuliny. Rozpoznávají však buňky s abnormálně nízkým počtem MHC I na svém povrchu. V tomto ohledu spadají spíše k mechanismům vrozené imunity, tedy antigenně nespecifické obrany organismu. Jsou

schopné ničit infikované a nádorové buňky bez předešlé senzitivizace, čímž zajišťují první obrannou linii proti nežádoucím buňkám. Nástroje cytotoxicity se však velmi podobají CTL (Cotran et al., 2010; Hořejší a Bartůňková, 2009).

Po aktivaci mohou NK buňky lyzovat široké spektrum lidských nádorů včetně těch, které se nezdály být imunogenní pro T buňky. Zdá se, že T a NK buňky poskytují doplňující protinádorové mechanismy. Nádory bránící se tomu, aby byly rozpoznány cytotoxickými lymfocyty, exprimují molekuly MHC I ve snížené míře, čímž paradoxně mohou aktivovat NK buňky, které jsou právě těmito molekulami inhibovány. Aktivační receptory na NK buňkách jsou velmi odlišné a patří do několika genových rodin. NKG2D proteiny exprimované na NK a některých T buňkách jsou důležitými spouštěcími receptory. Rozpoznávají stresem indukované antigeny, jež se nacházejí na nádorových buňkách a buňkách s poškozenou DNA, kde hrozí nebezpečí neoplastické transformace (Cotran et al., 2010).

### **c) Makrofágy**

Tvoří 5 – 10 % leukocytů myeloidního původu, jedná se o fagocytující buňky vrozené imunity a buňky zánětlivé reakce. Aktivované makrofágy vykazují cytotoxicitu proti nádorovým buňkám *in vitro*, podílejí se na fagocytóze vlastních apoptických buněk a buněk infikovaných nitrobuněčnými agens. T a NK buňky produkují interferon- $\gamma$  a cytokiny, které aktivují makrofágy – všechny buňky tak mohou spolupracovat při protinádorové reakci. Aktivované makrofágy mohou zabíjet nádory podobnými mechanismy, jako ničí mikroby (např. produkcí reaktivních kyslíkových metabolitů) nebo sekrecí TNF – *tumor necrosis factors* - cytokinů schopných vyvolat smrt nádorových buněk (Cotran et al., 2010).

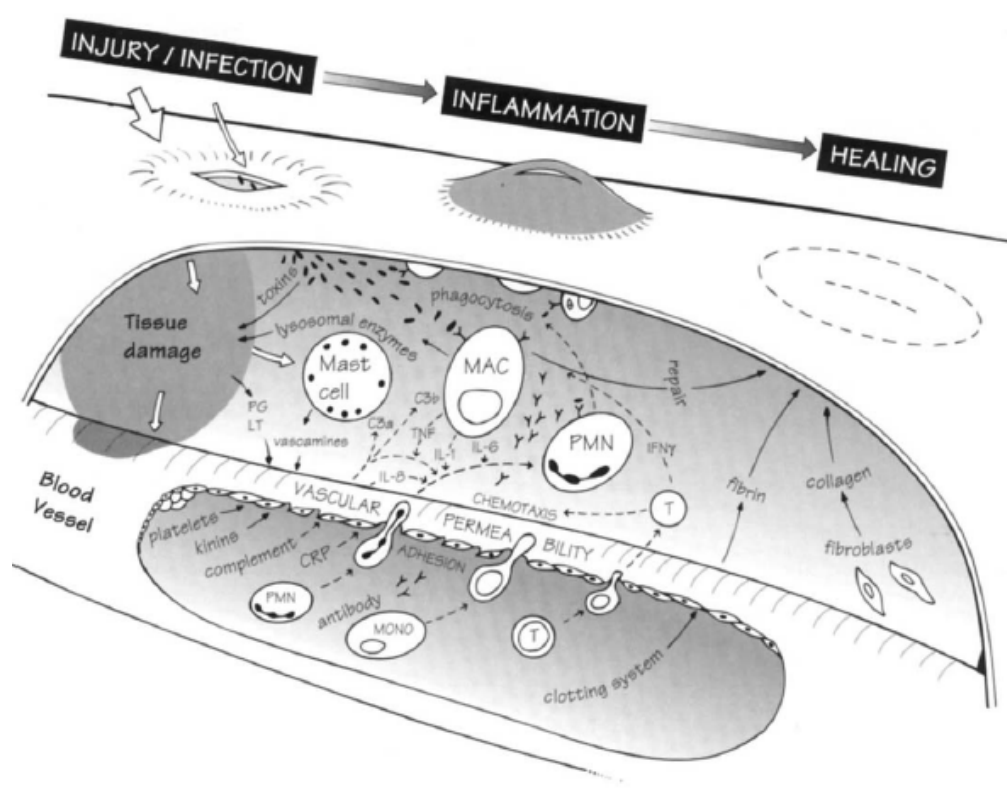
## **1.4. Terapie nádorů založena na stimulaci nespecifické imunity**

### **1.4.1. Akutní zánět**

Zánět je jedním z hlavních a velmi účinných nástrojů vrozené imunity. Můžeme jej definovat jako složitou řadu fyziologických reakcí na poškození (mechanické, fyzikální, ischemií, mikroorganismy) vaskularizované tkáně v určitém místě. Tyto reakce vedou k lokalizaci poškození, ochraně proti infekci eliminací patogenu a škodlivin, a následné regeneraci tkáně. Akutní zánět trvá zpravidla krátkou dobu, po jeho odeznění je tkáň zcela zhojená (Hořejší a Bartůňková, 2009).

Zánětlivý proces začíná uvolněním prozánětlivých látek z degranulovaných žírných buněk, fagocytů a poškozených buněk v místě narušení tkáně. Ty pak vyvolají vyšší permeabilitu kapilár (plazmatická tekutina s různými makromolekulami z nich uniká ven za vzniku otoku – tumoru), expresi adhezních molekul u endoteliálních buněk (umožní přilnutí a vstup fagocytujících buněk a lymfocytů do tkáně), aktivaci koagulační, fibrinolytické, kininové a komplementové kaskády, bolestivost (dolor), zvýšení teploty (calor). Spolu s porušenou funkcí (functio laesa) a zarudnutím (rubor) jsou výše zmíněné projevy hlavními znaky zánětu. Hromadí se makrofágy a polymorfonukleáry pak sekretují cytokiny a další mediátory, které děje zesilují a při dlouhodobějším zánětu napomáhají jako APC aktivaci buněk specifické imunity. Jejich zralé efekторы se podílejí na eliminaci patogenu produkcí protilátek napomáhajících opsonizaci a aktivaci komplementu, cytotoxicitou či zpětnou stimulací makrofágů (Hořejší a Bartůňková, 2009; Mačák a Mačáková, 2004).

Výše zmíněné imunologické a fyziologické děje podílející se na akutním zánětu jsou znázorněny na Obr. 2.



**Obr. 2** Schéma imunologických a fyziologických procesů při akutním zánětu (Playfair a Chain, 2000)

### **1.4.2. Fagocytóza**

Fagocytóza se významnou částí podílí na zánětlivém procesu. Jedná se o vývojově velmi starý mechanismus založený na pohlcování částic z okolního prostředí buňky. V rámci imunitního systému můžeme tento proces rozdělit do následujících kroků: chemotaxe - putování za patogenem, škodlivou látkou, jeho/její rozpoznání, pohlcení, v případě cizorodého mikroorganismu usmrcení, zpracování a vylučování látek, které stimulují ostatní složky imunity. Na tento děj se specializuje hned několik populací leukocytů nespecifické imunity. Patří mezi ně polymorfonukleární leukocyty, které v závislosti na jejich barvitelnosti a morfologii dělíme na **neutrofilní**, **eosinofilní** a basofilní **granulocyty** (poslední jmenované však nefagocytují). U zdravého člověka zastupují 62 – 75 % bílých krvinek. Za běžného stavu neexprimují MHC molekuly třídy II, nejsou tedy profesionálními antigen prezentujícími buňkami. Receptory krátce žijících (poločas v krvi 6 - 12 h) neutrofilů rozpoznávají zejména extracelulární patogeny - bakterie, eosinofilní granulocyty pak chrání organismus před parazitárními infekcemi. Neutrofilny jsou cílem i zdrojem řady různých prozánětlivých cytokinů, chemokinů a růstových faktorů, například IL-1 (stimulace T lymfocytů), IL-8 (chemotaxe a aktivace granulocytů), TNF- $\alpha$  (cytotoxické a regulační účinky), GM-CSF (stimulace růstu kolonií granulocytů, makrofágů) (Hořejší a Bartůňková, 2009; Witko-Sarstat et al., 2000).

**Dendritické buňky** se vyskytují téměř ve všech orgánech a tkáních, nejvíce však v těch na pomezí okolního prostředí a organismu - v kůži a sliznicích dýchacího, trávicího ústrojí tvoří 1 – 2 % celkového počtu buněk. Tyto buňky mají mezi fagocyty ústřední roli ve zpracování a předkládání antigenu (nejvýznamnější APC), spojují tak vrozenou imunitu s imunitou získanou. Podílí se také na zachování imunotolerance (Hořejší a Bartůňková, 2009).

Dalším typem fagocytů jsou **monocyty**, jejichž tkáňovou formou jsou **makrofágy**. Širší charakteristika je uvedena v kapitole 1.3.3. (Hořejší a Bartůňková, 2009; Bartůňková a Vernerová, 2002).

#### **1.4.2.1. Rozpoznávací mechanismy fagocytů**

Vrozená schopnost detekovat patogeny je pro existenci mnohobuněčných organismů zcela nutná a zajišťuje ji přítomnost PRRs (*Pattern Recognition Receptors*). Jejich přehled je

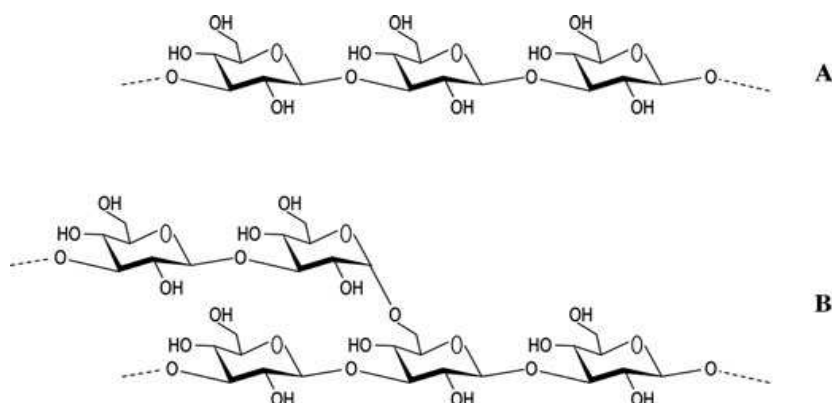
uveden v Tab. I. Jedná se o membránové proteiny a lektiny - bílkoviny vázající sacharidy (Toll-like receptory – TLR, manózoový receptor, galaktózoový receptor) a cytoplazmatické receptory Nod. PRRs ve většině případů rozeznávají tělu cizí struktury, které se nazývají PAMPs (*Pathogen Associated Molecular Patterns*). Ty jsou pravděpodobně pro mikrobiální patogeny nutné k přežití, narozdíl od živočichů, u kterých se nevyskytují. Nejlépe popsané PAMPs zahrnují lipopolysacharidy (endotoxiny produkované gramnegativními bakteriemi), peptidoglykany a lipoteichoové kyseliny (typické pro grampozitivní bakterie), glukany a mannany (houby - kvasinky a plísňe). Rozpoznání těchto struktur spouští odpověď nespecifické imunity určenou k ochraně hostitele před invadujícím patogenem – exprese prozánětlivých cytokinů, některých molekul aktivujících APC (Brown a Gordon, 2005; Hořejší a Bartůňková, 2009).

Table 1. PRRs and Their Ligands			
PRRs	Localization	Ligand	Origin of the Ligand
<b>TLR</b>			
TLR1	Plasma membrane	Triacyl lipoprotein	Bacteria
TLR2	Plasma membrane	Lipoprotein	Bacteria, viruses, parasites, self
TLR3	Endolysosome	dsRNA	Virus
TLR4	Plasma membrane	LPS	Bacteria, viruses, self
TLR5	Plasma membrane	Flagellin	Bacteria
TLR6	Plasma membrane	Diacyl lipoprotein	Bacteria, viruses
TLR7 (human TLR8)	Endolysosome	ssRNA	Virus, bacteria, self
TLR9	Endolysosome	CpG-DNA	Virus, bacteria, protozoa, self
TLR10	Endolysosome	Unknown	Unknown
TLR11	Plasma membrane	Profilin-like molecule	Protozoa
<b>RLR</b>			
RIG-I	Cytoplasm	Short dsRNA, 5' triphosphate dsRNA	RNA viruses, DNA virus
MDA5	Cytoplasm	Long dsRNA	RNA viruses (Picornaviridae)
LGP2	Cytoplasm	Unknown	RNA viruses
<b>NLR</b>			
NOD1	Cytoplasm	iE-DAP	Bacteria
NOD2	Cytoplasm	MDP	Bacteria
<b>CLR</b>			
Dectin-1	Plasma membrane	$\beta$ -Glucan	Fungi
Dectin-2	Plasma membrane	$\beta$ -Glucan	Fungi
MINCLE	Plasma membrane	SAP130	Self, fungi

**Tab. I** Přehled pattern recognition receptorů a jejich ligandů (Takeuchi a Akira, 2010)

### 1.4.3. $\beta$ -glukany

$\beta$ -glukany jsou v přírodě běžně se vyskytující polysacharidy, které můžeme nalézt u hub, rostlin a některých bakterií. Mohou být krátké nebo dlouhé, větvené či nevětvené, rozpustné i nerozpustné. Literatura týkající se imunitních odpovědí na glukany může být poněkud matoucí, neboť to, co je pozorováno u jednoho preparátu glukanu, bývá často nepřesně vztaženo na všechny glukany. V této souvislosti se však nejčastěji hovoří o  $\beta$ -glukanech hub. Ty tvoří v podobě glukózových polymerů s vazbou  $\beta$ 1->3 a postranními řetězci různé délky a rozložení, spojenými vazbou  $\beta$  1->6, hlavní stavební složku buněčné stěny (Tsoni a Brown, 2008). Základní struktura je zachycena na Obr. 3.



**Obr. 3** Základní struktura lineárních (A) a větvených (B)  $\beta$ -glukanů (Tsoni a Brown, 2008)

Glukany se nachází v buněčné stěně (celulóza) a dalších strukturách rostlin (obilná zrna), kde se mohou objevovat také jako polymery s vazbami  $\beta$ 1->3 a  $\beta$ 1->4. Pouze malé množství bakterií (půdní organismy jako *Agrobacterium* a patogeny jako *Streptococcus*) mohou vytvářet  $\beta$ -glukany, které jsou umístěné v periplasmě či kapsule (Goodridge et al., 2009).

Běžným zdrojem experimentálně používaného  $\beta$ -1,3-glukanu jsou kvasinky (typicky *Saccharomyces cerevisiae*), houby (*Sclerotium gluconicum* a další), bakterie (*Alcaligenes faecalis*) a mořské řasy (laminarin z *Laminaria digitata*).

U obratlovců i bezobratlých jsou rozpoznávány jako PAMPs spouštějící imunitní odpověď. Následky rozpoznání  $\beta$ -glukanu pravděpodobně závisí na typu buňky a účastnících se receptorů (Tsoni a Brown, 2008; Goodridge et al., 2009).

### **1.4.3.1. Účinky na imunitní systém**

Imunostimulační vlastnosti glukanů jsou přímo známy již po desetiletí, nepřímo pak po celá staletí. Blahodárné účinky spojené s vystavením se purifikovaným glukanům jsou různé. Pohybují se od absurdních (léčba plešatosti), po vědecky opodstatněné – pro antitumorový efekt glukanů hovoří moderní klinická šetření (Goodridge et al., 2009).

V současné době lze dohledat značné množství publikací přibližujících účinky těchto uhlovodíků, nacházíme v nich však mnoho nesrovnalostí a rozporů. Ty pramení z nedostatečného porozumění základním molekulárním mechanismům, z použití velmi odlišných, často nečistých  $\beta$ -glukanů, z analýzy různých buněčných typů a modelových systémů. Avšak identifikace Dectinu-1 i dalších PRRs a poznání způsobu, jakým tyto receptory interagují s  $\beta$ -glukany a spouští buněčnou odpověď, začínají poskytovat celistvější náhled pro pochopení účinků těchto karbohydrátů. Částečně tak pomohly vysvětlit určité nesrovnalosti v literatuře (Tsoni a Brown, 2008).

Schopnost  $\beta$ -glukanů modulovat imunitu je ovlivněna délkou polymeru, stupněm větvení a terciární strukturou. Víme, že tyto atributy ovlivňují způsob, kterým uhlovodíky interagují s jejich receptory, hlavně dectinem-1, ačkoli není jasné jak. Velké nerozpustné  $\beta$ -glukany jako kurdlan a zymosan jsou obecně schopné aktivovat leukocyty přímo, spouštějíce fagocytózu, antimikrobiální pochody a produkci cytokinů, chemokinů a mediátorů zánětu. Glukany střední velikosti, jako glukanfosfát, jsou aktivní *in vivo*, zatím se ovšem nezdá, že by spouštěly reakci leukocytů *in vitro*. Nicméně existují důkazy, že mohou aktivovat transkripční faktory, navodit produkci malého množství cytokinů a modulovat zánět stimulací dráhy fosfoinositid-3-kinázy.  $\beta$ -glukany s nízkou molekulární hmotností jsou biologicky neaktivní jak *in vitro*, tak *in vivo* (Tsoni a Brown, 2008).

### **1.4.3.2. $\beta$ -glukanové fagocytární receptory**

**Komplementový receptor 3 (CR3)** je integrinový dimer skládající se z  $\alpha_M\beta_2$  řetězců a je široce exprimován myeloidními buňkami, jako jsou monocyty, makrofágy, dendritické buňky, neutrofilny a NK buňky. CR3 váže složku komplementu iC3b a je hlavním receptorem zodpovědným za fagocytózu komplementem opsonizované částice. CR3 má extrémně rozlišnou škálu ligandů, kromě komplementu zahrnuje fibriogen, koagulační faktor X, ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule* – protein exprimovaný na povrchu endoteliálními



buňek, umožňující vstup leukocytů z krve do tkáně), stejně tak množství povrchu houbových, parazitických a bakteriálních buněk. Toto široké rozmezí ligandů popsaných pro CR3 vedlo k domněnce, že kromě své schopnosti vázat specifický ligand může pomáhat koordinovat hromadění dalších receptorů s nízkou afinitou a jejich vazbu k cytoskeletu.  $\alpha_M$  řetězec CR3 má vysokou afinitu ( $5 \times 10^{-8}$  M) k vazání  $\beta$ -glukanu (Goodridge et al., 2009; Hořejší a Bartůňková, 2009).

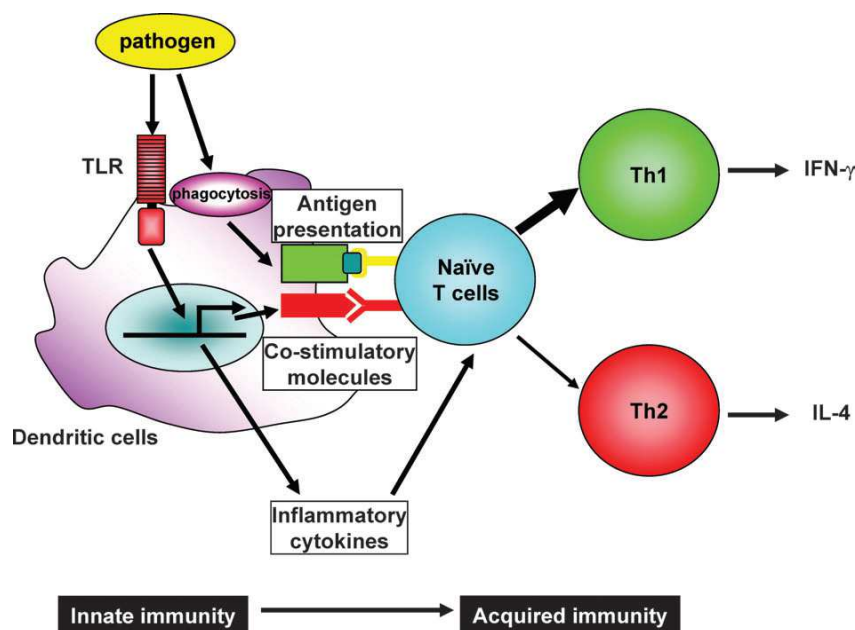
**Dectin-1** je membránový receptor II. typu, jenž patří k C-tykové lektinové rodině receptorů, obsahující extracelulární C-koncovou C-tykovou lektinovou doménu, krátkou oblast stopky, jedinou transmembránovou doménu a krátký intracelulární chvost zakončený 40 aminokyselinami. Tento receptor je u myši exprimován zejména buňkami myeloidního původu, makrofágy, dendritickými buňkami a neutrofily. Dectin-1 byl také detekován pomocí průtokové cytometrie na podmožině B a T lymfocytů, ovšem jeho funkce u těchto buněk není zcela zřejmá. Signály dectinu-1 přispívají k různorodé odpovědi makrofágů, dendritických buněk a neutrofilů, jako jsou fagocytóza, oxidativní vzplanutí, degranulace neutrofilů, zabíjení hub a produkce lipidových mediátorů zánětů, cytokinů a chemokinů, které rekrutují a koordinují aktivitu dalších imunitních buněk (Goodridge et al., 2009).

#### **1.4.3.3. TLR 2 a jeho spolupráce s fagocytárními $\beta$ -glukanovými receptory**

TLR 2 je člen proteinové skupiny Toll like receptorů obratlovců. Ty po rozpoznání určitých PAMPs indukují expresi genů kostimulačních molekul a zánětových cytosinů, jako je IL-12, hemopoetinový heterodimer stimulující Th1 a NK buňky, a TNF- $\alpha$ , trimer indukující lokální zánět a aktivující endotelie (Takeda a Akira, 2005; Hořejší a Bartůňková, 2009). Schéma vlivu TLR na vrozenou a získanou imunitu můžete vidět na Obr. 4.

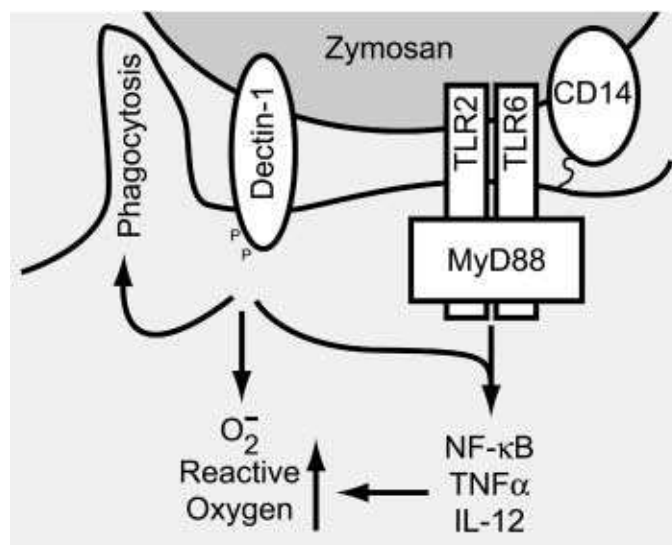
TLR 2 tvoří extracelulární doména obsahující 18 až 20 na leucin bohatých repetitivních (LRR) a motivy podobné LRR. Intracelulární část pak obsahuje Toll/IL-1 receptor (TIR) doménu (Kirschning a Schumann, 2002).

TLR2 rozpoznává širokou paletu mikrobiálních složek. Ty zahrnují lipoproteiny/lipopeptidy různých patogenů, peptidoglykany a lipoteichoovou kyselinu gram pozitivních bakterií, lipoarabinomannan mykobakterií, glykosyl fosfatidyl inositolovou kotvu *Trypanosom cruzi*, zymosan z hub a LPS některých druhů bakterií (Takeda a Akira, 2005).



**Obr. 4** Schéma vlivu TLR na vrozenou a získanou imunitu (Takeda a Akira, 2005)

V mnohých pokusech bylo zjištěno, že dectin-1 je u makrofágů a dendritických buněk důležitým partnerem TLR2 pro produkci zánětvých cytokinů v rámci odpovědi na stimuly obsahující  $\beta$ -glukany. Jejich spolupráce v řízení imunitní reakce poskytuje cenný model pro objasnění mechanismů interakce mezi četnými rozpoznávacími receptory náležejícími vrozené imunitě. Při rozpoznávání zymosanu makrofágy či dendritickými buňkami se dectin-1 i TLR2 objevují na fagosomech, kde se dectin-1 váže na  $\beta$ -glukany, zatímco TLR rozpoznává odlišné složky buněčné stěny kvasnic (Gantner et al., 2003).

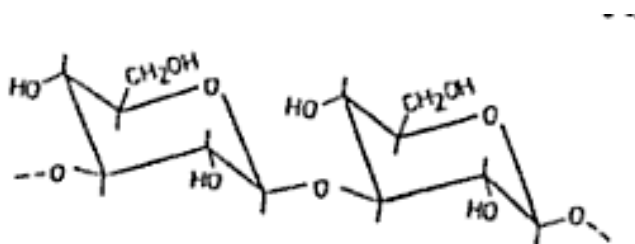


**Obr. 5** Spolupráce receptorů po rozpoznání zymosanu (Gantner et al., 2003)

Na Obr. 5 můžeme vidět spolupráci těchto dvou receptorů. Částice zymosanu je rozpoznána současně dectinem-1, TLR a CD14. Dohromady usnadňují zánětovou odpověď. Dectin-1 spouští přímo fagocytózu a stimuluje produkci ROS, přispívá tedy k mikrobiálnímu zabíjení. TLR vyvolávají signalizaci skrze NF- $\kappa$ B, která vede k produkci zánětových cytokinů, přičemž je tato reakce zesilována dectinem-1. Stejně tak TLR signalizace umocňuje produkci ROS, která byla původně spuštěna dectinem-1 (Gantner et al., 2003).

#### 1.4.3.4. Laminarin

Laminarin je zásobní polysacharid velké části hnědých řas. V současné době se nejčastěji získává z druhu *Laminaria digitata*. Jedná se o hydrofilní  $\beta$ -1,3- s občasnými  $\beta$ -1,6- postranními řetězci. (Copping a Duke, 2007). Jeho strukturní vzorec je na Obr. 6.



**Obr. 6** Strukturní vzorec laminarinu (Southgate et al., 1990)

Zatímco existuje mnoho studií na účinky vysokomolekulárních  $\beta$ -glukanů, informací o  $\beta$ -glukanech s nízkou molekulární hmotností je k dispozici podstatně méně, ačkoli díky jejich vyšší rozpustnosti jsou pro klinické využití vhodnější (Pang et al., 2005). Je dokázáno, že rozpustný laminarin působí jako inhibitor dectinu 1 (Frasnelli et al., 2005). Zdroje také uvádí, že efekt laminarinu na imunitní systém je mizivý nebo žádný (Tsoni a Brown, 2008; Pang et al., 2005).

## 2. Cíle práce

- *In vivo* terapie melanomu B16-F10 založená na instalaci laminarinu na povrch nádorových buněk.
- Ověření možnosti zesílení terapeutického účinku laminarinu kombinací s LPS a LTA.

## **3. Materiál a metody**

### **3.1. Materiál**

#### **3.1.1. Chemikálie**

- RPMI 1640 (Sigma-Aldrich)
- Fetal Calf Serum (FCS) (Sigma-Aldrich)
- laminarin, z *Laminaria Digitata* (Sigma-Aldrich)
- octan amonný (Sigma Aldrich)
- kyanoborohydrid sodný NaBH<sub>3</sub>CN (Sigma-Aldrich)
- BAM - Biocompatible Anchor for cell Membrane, Mw 4000 (NOF Corporation)
- LPS, z *E. coli* 0111.B4 (Sigma-Aldrich)
- LTA, z *B. subtilis* (Sigma-Aldrich)

#### **3.1.2. Experimentální zvířata**

Pokusy se prováděly na samicích myší C57BL/6N od Charles River Laboratories, 8 týdnů starých, s váhou 18–20 g.

Byly chovány při fotoperiodě 12/12, přístup k vodě a standardní potravě nebyl omezen.

#### **3.1.3. Buněčná linie**

V pokusech bylo použito buněk myšího melanomu B16-F10, dar prof. Říhové (MBÚ, Praha). Ty byly kultivovány v RPMI 1640 s 10% FCS, antibiotiky, glutaminem a merkaptoethanolem při teplotě 37° C v atmosféře nasycené vodními parami obsahující 5 % CO<sub>2</sub>.

## **3.2. Metody**

### **3.2.1. Příprava buněk melanomu B16-F10 pro užití in vivo**

Po odstranění kultivačního média byly buňky 2x propláchnuty sterilním PBS. Byla provedena trypsinizace (0,02% trypsin a 0,02% EDTA v PBS) a poté se buňky vložily na 1-5 minut do termostatu (37° C). Malé množství média (RPMI 1640 s 10% FCS) bylo následně přidáno k buňkám, které v něm byly rozvolněny pomocí Pasteurovy pipety. Suspenze byla přelita do zkumavky, doplněna na 20 ml objemu a centrifugována po dobu 10 minut při přetížení 150G. Po centrifugaci se médium vylilo a zcentrifugované buňky byly naředěny RPMI 1640 na 3 ml. Pomocí Pasteurovy pipety se buňky opět rozvolnily a do připravené zkumavky bylo napipetováno 30  $\mu$ l této suspenze a 30  $\mu$ l trypanové modři. Směs se promíchala a nechala přibližně minutu kultivovat. V Bürknerově komůrce se počítal počet buněk, podle něj pak byla suspenze naředěna na potřebnou koncentraci.

### **3.2.2. Transplantace nádorových buněk B16-F10**

Po oholení srsti na spodní části zad myši bylo na pravé straně subkutánně aplikováno 400 tisíc melanomových buněk v 0,1 ml RPMI 1640.

### **3.2.3. Měření velikosti nádoru**

Měření bylo prováděno v průběhu terapie jednou za dva dny. K měření velikosti nádorů byl používán kaliper.

Ze získaných rozměrů se počítal objem pomocí vzorce  $V = \pi/6 AB^2$ , v němž A odpovídá délce nádoru a B jeho výšce.

### **3.2.4. Měření teploty nádoru a myši**

Teplota byla měřena pomocí teploměru pro hlodavce IR RODENT THERMOMETER 153 IRB firmy BIOSEB před zahájením terapie, 6, 12, 24 hodin po zahájení terapie a každý druhý den terapie. Teploměr se přikládal se na vzdálenost 2 mm od nádoru pravé části zad (teplota nádoru), a na stejnou vzdálenost od kůže levé části zad bez nádoru (teplota myši).

### **3.2.5. Vyhodnocení počtu metastáz**

Po dobu nejméně jednoho týdne byly plíce pokusných myší naloženy do 4 % formaldehydu a následně se pod binolupou počítaly metastázy (černé tečky).

### **3.2.6. Statistické vyhodnocení dat**

Statistické vyhodnocení výsledků měření bylo provedeno pomocí Studentova t-testu v programu MS Excel.

Přežívání myši bylo vyhodnoceno pomocí testu Kaplan-Meier v programu MedCalc.

### **3.2.7. Příprava laminarin - BAM**

Aminovaný laminarin byl získán redukční aminací laminarinu metodou dle Torosantucci et al., 2005. Roztok laminarinu v prostředí octanu amonného byl redukován kyanoborohydridem sodným při pH 7,5 a 50° C po dobu pěti dnů. Následovala dialýza ve střeově MWCO 3500 proti PBS při 4° C přes noc (stálé míchání).

Navázání molekuly BAM na aminoskupinu laminarinu bylo provedeno při pH 7,3 metodou dle Kato et al., 2004. Následovala dialýza ve střeově MWCO 3500 proti PBS při 4° C přes noc (stálé míchání).

### **3.2.8. Pokus č. 1: Působení laminarinu samotného i ve směsi s LPS na růst melanomů**

Experiment byl prováděn na 21 samicích myší C57BL/6N chovaných jednotlivě, které byly 12. den po transplantaci 400 tisíc buněk melanomu B16-F10 rozděleny do 3 skupin A, B, C po 5 kusech a do skupiny K s 6 kusy. Ve stejný den byla změřena teplota a velikost nádorů, poté se zahájila nádorová terapie, která spočívala v šesti injikacích ve dnech 0, 2, 4, 6, 8, 10.

Schéma dávkování a doby aplikace:

- Skupina K: obden 6x intratumorální aplikace 50  $\mu$ l PBS (kontrolní)
- Skupina A: obden 6x intratumorální aplikace 50  $\mu$ l 0,5 mM laminarinu v PBS
- Skupina B: obden 6x intratumorální aplikace 50  $\mu$ l 0,5 mM laminarinu v PBS in LPS 0,5 mg/ml
- Skupina C: obden 6x intratumorální aplikace 50  $\mu$ l LPS (0,5 mg/ml PBS)

Po 6, 12 a 24 hodinách od zahájení léčby byla měřena teplota nádoru a teplota referenčního bodu na druhém boku myši. Každý druhý den po dobu 14 dnů od počátku terapie se pak měřila velikost nádorů a teplota nádoru + referenční bod.

### **3.2.9. Pokus č. 2: Studium vlivu kotvení laminarinu na povrch nádorových buněk na jeho protinádorovou účinnost a řešení otázky synergie s LPS**

Experiment byl prováděn na 30 samicích myší C57BL/6N chovaných jednotlivě, které byly 12. den po transplantaci 400 tisíc buněk melanomu B16-F10 rozděleny do 5 skupin K, A, B, C, D po 6 kusech. Ve stejný den byla změřena teplota a velikost nádorů, poté se zahájila nádorová terapie, která spočívala v šesti injikacích ve dnech 0, 2, 4, 6, 8, 10.

Schéma dávkování a doby aplikace:

- Skupina K: obden 6x intratumorální aplikace 50  $\mu$ l PBS (kontrolní)
- Skupina A: obden 6x intratumorální aplikace 50  $\mu$ l 0,5 mM aminovaného laminarinu
- Skupina B: obden 6x intratumorální aplikace 50  $\mu$ l 0,5 mM laminarin-BAM



- Skupina C: obden 6x intratumorální aplikace směsi 0,5 mM laminarin-BAM in LPS (0,5 mg/ml)
- Skupina D: obden 6x intratumorální aplikace LPS (0,5 mg/ml PBS)

Po 6, 12 a 24 hodinách od zahájení léčby byla měřena teplota nádoru a teplota referenčního bodu na druhém boku myši. Každý druhý den po dobu 14 dnů od počátku terapie se pak měřila velikost nádorů a teplota nádoru + referenční bod. Poslední den terapie byly myši usmrceny, jejich plíce vypitvány a naloženy do 4% formaldehydu. Po 14 dnech byly počítány metastázy.

### **3.2.10. Pokus č. 3: Synergie působení kotveného laminarinu (laminarin-BAM) s LPS/LTA**

Experiment byl prováděn na 30 samicích myší C57BL/6N chovaných jednotlivě, které byly 12. den po transplantaci 400 tisíc buněk melanomu B16-F10 rozděleny do 6 skupin K, A, B, C, D, E po 5 kusech. Ve stejný den byla změřena teplota a velikost nádorů, poté se zahájila nádorová terapie.

Schéma dávkování a doby aplikace:

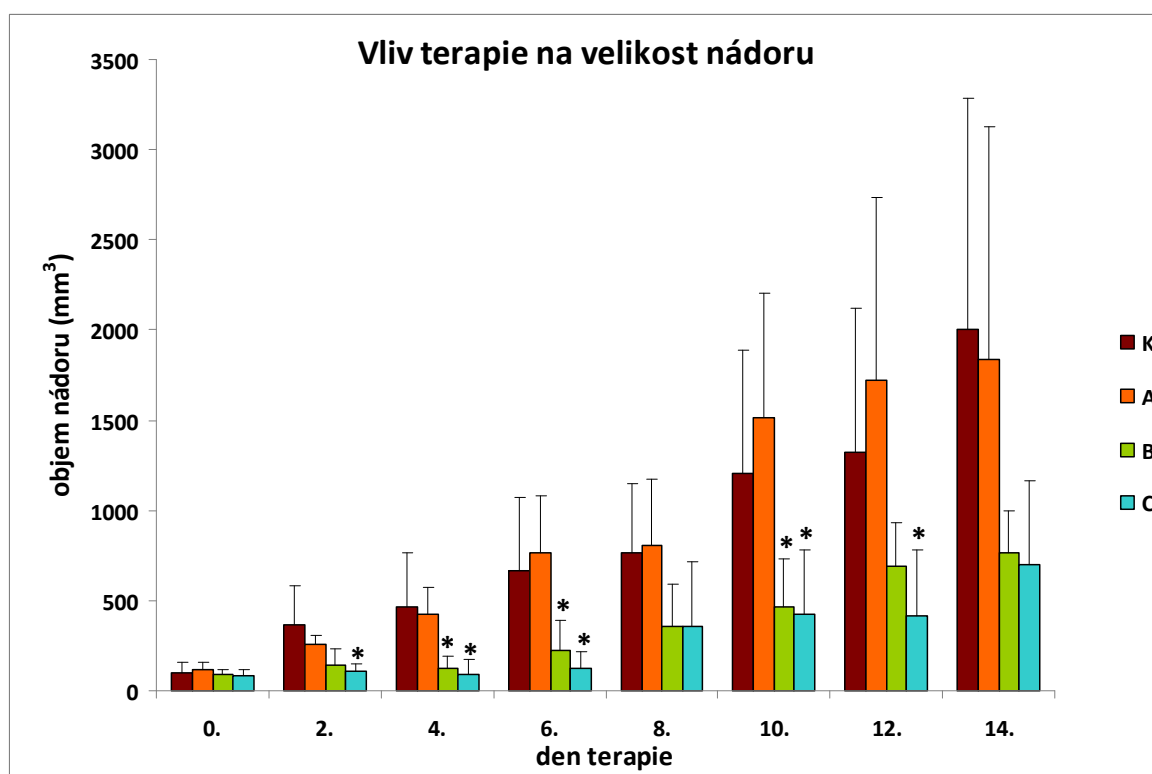
- Skupina K: obden 6x intratumorální aplikace 50  $\mu$ l PBS (kontrolní)
- Skupina A: obden 6x intratumorální aplikace 50  $\mu$ l 0,5 mM laminarin-BAM
- Skupina B: obden 6x intratumorální aplikace 50  $\mu$ l LPS (0,5 mg/ml PBS)
- Skupina C: obden 6x intratumorální aplikace 50  $\mu$ l 0,5 mM laminarin-BAM in LPS (0,5 mg/ml)
- Skupina D: obden 6x intratumorální aplikace 50  $\mu$ l LTA (3 mg/ml PBS)
- Skupina E: obden 6x intratumorální aplikace 50  $\mu$ l 0,5 mM laminarin-BAM, in LPS (0,5 mg/ml) in LTA (3 mg/ml)

Po 6, 12 a 24 hodinách od zahájení léčby byla měřena teplota nádoru a teplota referenčního bodu na druhém boku myši. Každý druhý den po dobu 14 dnů od počátku terapie se pak měřila velikost nádorů a teplota nádoru + referenční bod. Následně byla sledována doba přežití.

## 4. Výsledky

### 4.1. Pokus č. 1: Působení laminarinu samotného i ve směsi s LPS na růst melanomů

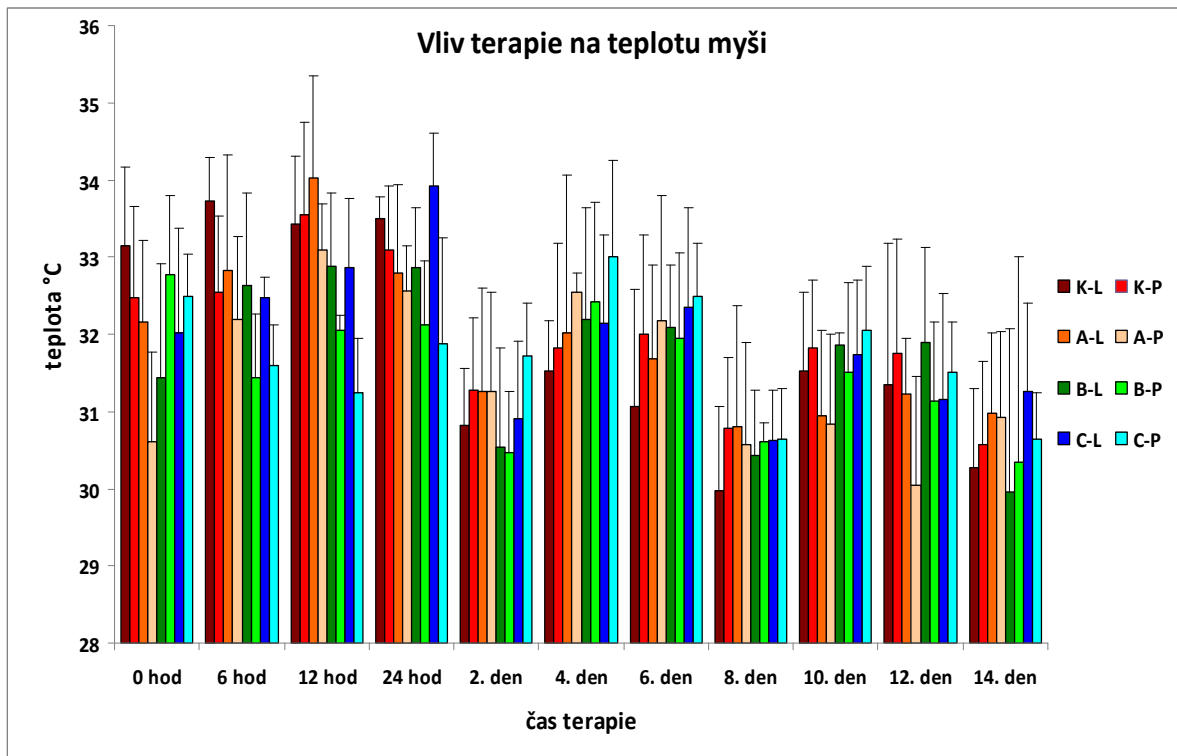
Výsledky jsou uvedeny na Obr. 7. Z grafu je patrné, že statisticky významnou redukci nádorového růstu vykazují terapie směsí LPS a laminarinu a samotné LPS. Samotný volný laminarin růst nádoru neovlivňuje. Redukce růstu nádorů směsí laminarin/LPS je dána pouze přítomností LPS. LPS a laminarin nevykazují žádné známky aktivity či synergie.



**Obr. 7** Vliv terapie na velikost nádoru (skupina K- kontrolní - PBS, skupina A- laminarin, skupina B - LPS+laminarin, skupina C – LPS)

\* =  $P \leq 0,05$

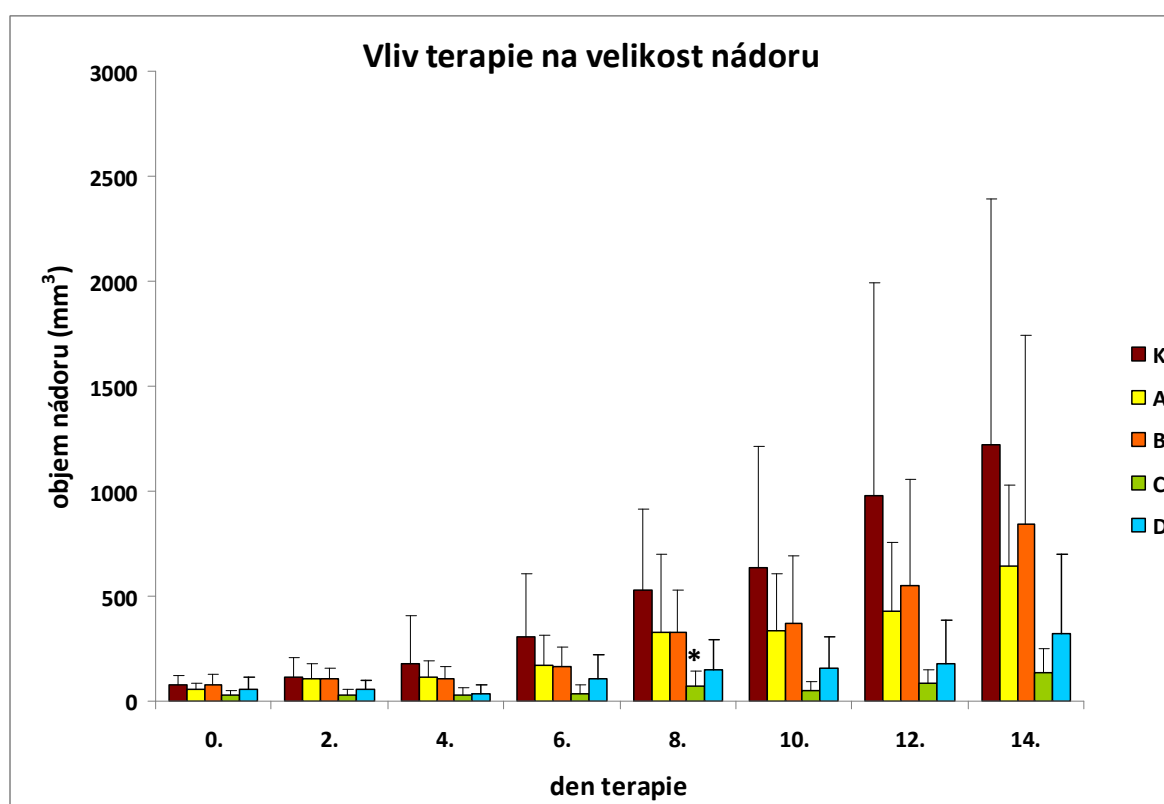
Na Obr. 8 je znázorněna povrchová teplota nádoru (P) a teplota referenčního bodu na druhém boku myši (L). V průběhu experimentu dochází k postupnému snižování všech teplot. Teploty nikterak neodrážejí druh a průběh terapie.



**Obr. 8** Vliv terapie na teplotu myši (L – levá strana bez nádoru, P- pravá strana s nádorem; skupina K – kontrolní - PBS, skupina A – laminarin, skupina B- LPS + laminarin, skupina C – LPS)

## 4.2. Pokus č. 2: Studium vlivu kotvení laminarinu na povrch nádorových buněk na jeho protinádorovou účinnost a řešení otázky synergie s LPS

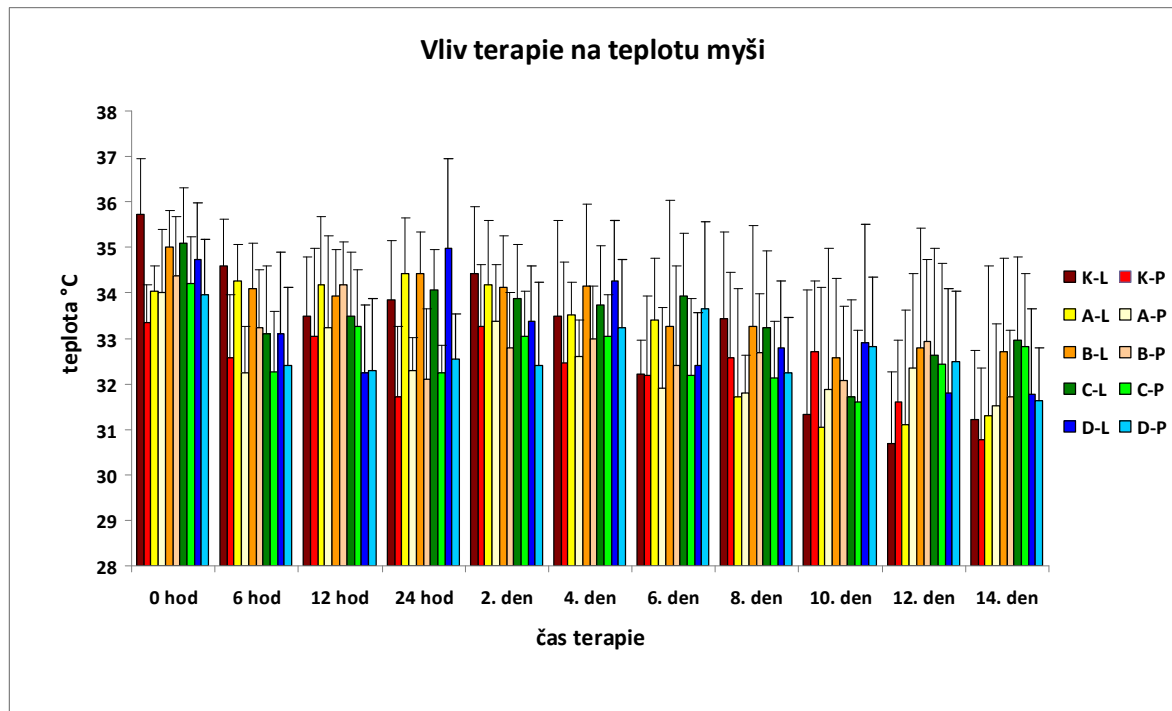
Výsledky jsou uvedeny na Obr. 9. Z grafu je patrné, že statisticky významnou redukci nádorového růstu vykazuje terapie směsí LPS a laminarinu kotveného pomocí BAM. Aminovaný laminarin a laminarin-BAM způsobily srovnatelnou statisticky nevýznamnou redukci nádorového růstu.



**Obr. 9** Vliv terapie na velikost nádoru (skupina K – kontrolní - PBS, skupina A – aminovaný laminarin, skupina B- laminarin-BAM, skupina C – LPS + laminarin-BAM a skupina D – LPS)

\* =  $P \leq 0,05$

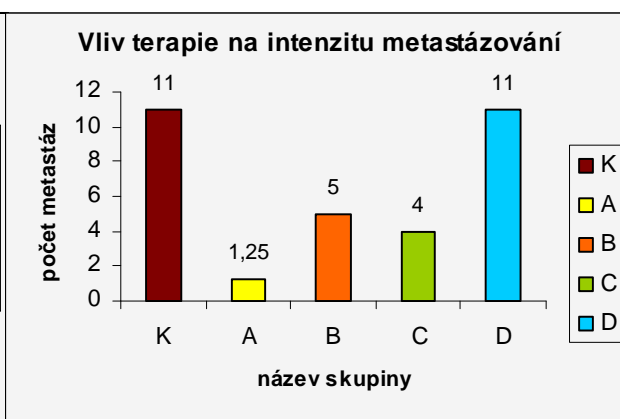
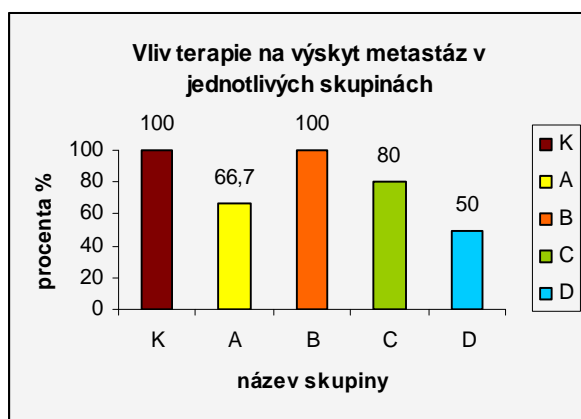
Na Obr. 10 je znázorněna povrchová teplota nádoru (P) a teplota referenčního bodu na druhém boku myši (L). V průběhu experimentu dochází k postupnému snižování všech teplot. Teploty nikterak neodrážejí druh a průběh terapie.



**Obr. 10** Vliv terapie na teplotu myši (L – levá strana bez nádoru, P – pravá strana s nádorem; skupina K – kontrolní - PBS, skupina A – aminovaný laminarin, skupina B- laminarin-BAM, skupina C – LPS + laminarin-BAM a skupina D – LPS)

Na dalších grafech je znázorněn vliv léčby na výskyt a intenzitu metastázování nádorů.

Z Obr. 11 je patrný vliv terapie na výskyt metastáz v jednotlivých léčebných skupinách. Terapeutický vliv jednotlivých preparátů nebyl příliš výrazný, nejlépe působil LPS. Vliv terapie na intenzitu metastázování je znázorněn na Obr. 12. Jedná se o průměrný počet metastáz na myš s metastázemi. V tomto ohledu vykazoval nejlepší výsledky aminovaný laminarin.

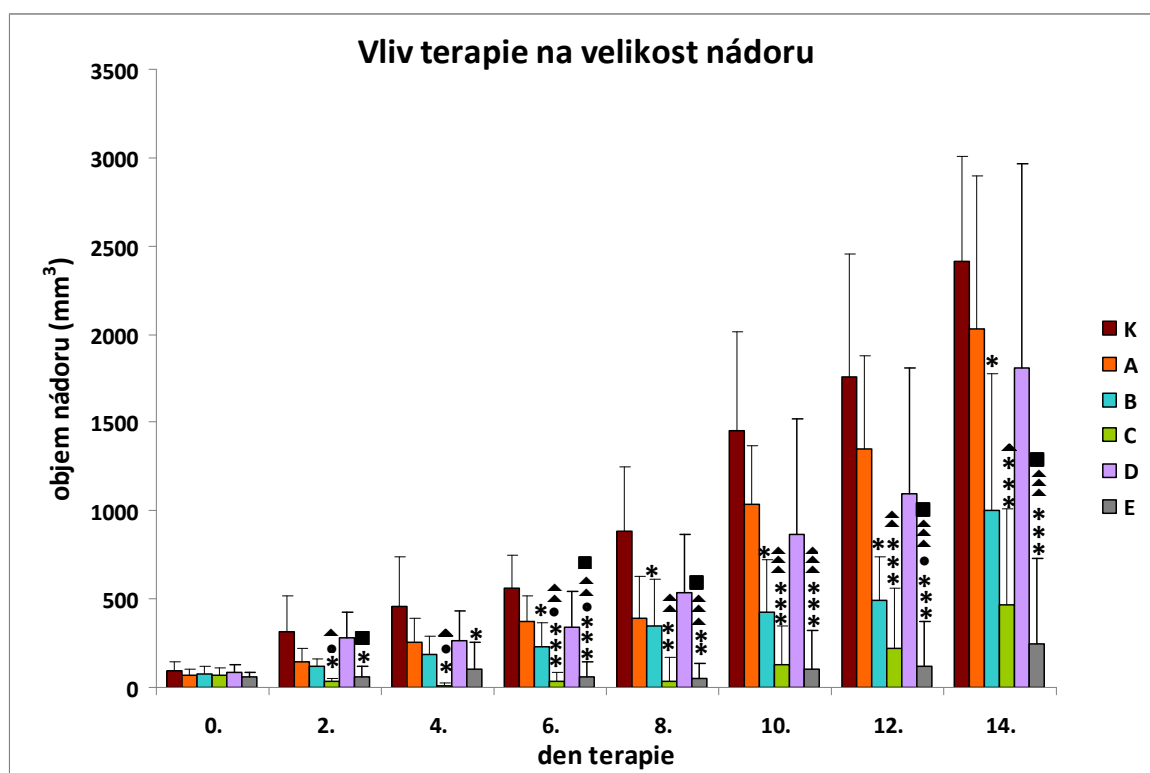


**Obr. 11** Vliv terapie na výskyt metastáz v jednotlivých skupinách (skupina K – kontrolní- PBS, skupina A – aminovaný laminarin, skupina B- laminarin-BAM, skupina C – LPS + laminarin-BAM a skupina D – LPS)

**Obr. 12** Vliv terapie na intenzitu metastázování (skupina K – kontrolní- PBS, skupina A – aminovaný laminarin, skupina B- laminarin-BAM, skupina C – LPS + laminarin-BAM a skupina D – LPS)

### 4.3. Pokus č. 3: Synergie působení kotveného laminarinu (laminarin-BAM) s LPS/LTA

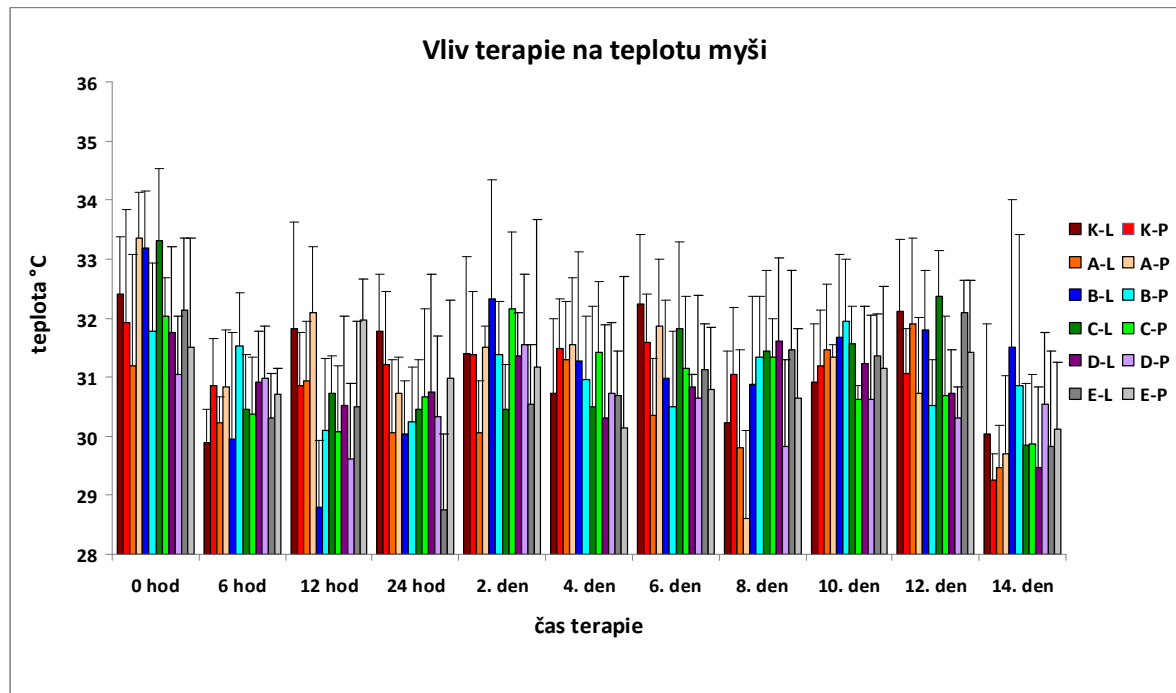
Výsledky jsou uvedeny na Obr. 13. Z grafu vyplývá, že statisticky významnou redukcí nádorového růstu vykazuje hned několik léčebných látek. Nejúčinnější se jeví směs LTA, LPS a laminarin-BAM, dále pak směs LPS a laminarin-BAM a pak samotný LPS. Účinnost směsí byla v obou případech statisticky významně vyšší než účinnost jejich jednotlivých složek.



**Obr. 13** Vliv terapie na velikost nádoru (skupina K- kontrolní - PBS, skupina A- laminarin-BAM, skupina B – LPS, skupina C – LPS+laminarin-BAM, skupina D – LTA, skupina E – LTA+LPS+laminarin-BAM)

- \* =  $P \leq 0,05$       \*\* =  $P \leq 0,01$       \*\*\* =  $P \leq 0,005$       ku K (kontrola)
- ▲ =  $P \leq 0,05$       ▲▲ =  $P \leq 0,01$       ▲▲▲ =  $P \leq 0,005$       ku A (laminarin-BAM)
- =  $P \leq 0,05$       ku B (LPS)
- =  $P \leq 0,05$       ku D (LTA)

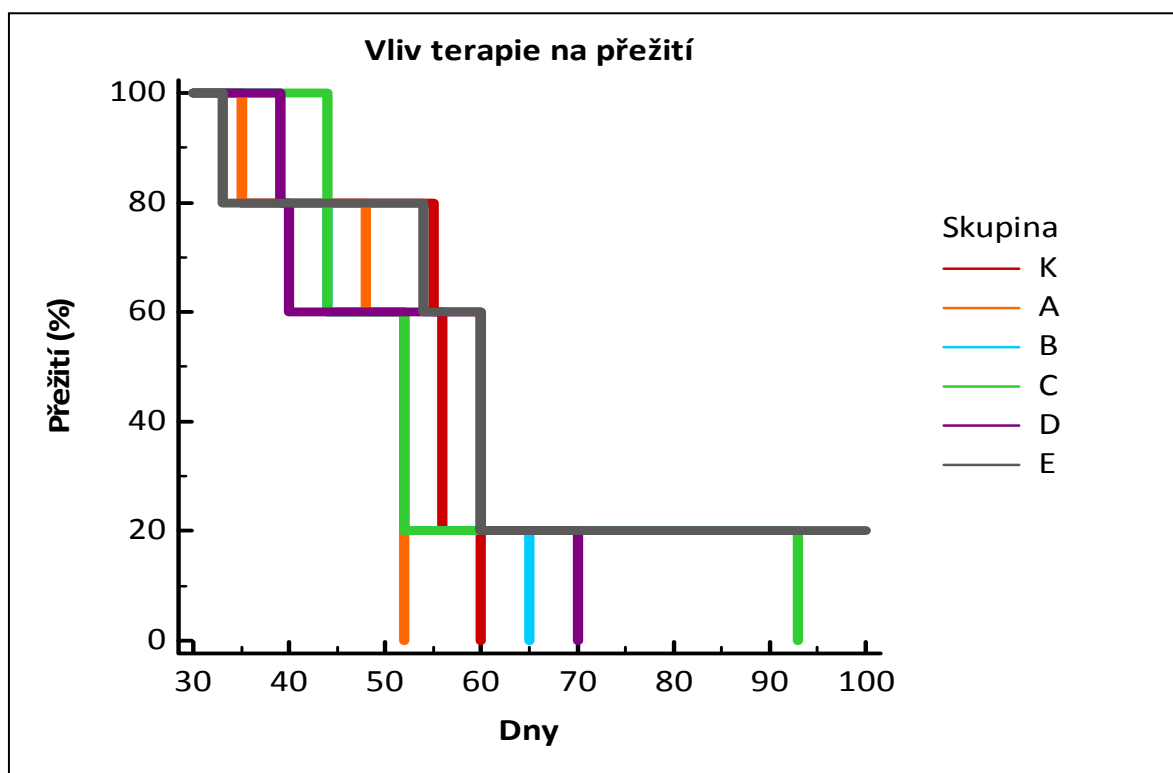
Na Obr. 14 je znázorněna povrchová teplota nádoru (P) a teplota referenčního bodu na druhém boku myši (L). Z tohoto měření opět nelze vyvodit žádné závěry týkající se korelace terapie a naměřených teplot.



**Obr. 14** Vliv terapie na teplotu myši: (L –levá strana bez nádoru, P- pravá strana s nádorem; Skupina K – kontrolní-PBS, skupina A – laminarin-BAM, skupina B- LPS, skupina C – LPS + laminarin-BAM, skupina D – LTA, skupina E – LTA+LPS+laminarin-BAM)



Obr. 15 zachycuje graf vlivu terapie na přežití. Žádná z léčebných látek zatím nevykazuje statisticky významné prodloužení doby přežití. Myš ze skupiny léčené směsí LTA, LPS a laminarin-BAM však stále přežívá.



**Obr. 15** Vliv terapie na přežití myší (skupina K – kontrolní - PBS, skupina A – laminarin-BAM, skupina B- LPS, skupina C – LPS + laminarin-BAM, skupina D – LTA, skupina E – LTA+LPS+laminarin-BAM)

## 5. Diskuse

Jak již bylo uvedeno, samotný a volný laminarin působí jako inhibitor dectinu-1 (Frasnelli et al., 2005). Proto nebylo překvapivé, že jeho i.t. aplikace nikterak nádorový růst neovlivnila, a to ani v přítomnosti LPS. Ten sice nádorovou redukcí způsoboval, což odpovídá práci Mariani et al., 2007, ale přítomnost laminarinu tuto aktivitu jen mírně snižovala.

Beta glukany, mezi něž laminarin patří, mohou působit na třech úrovních. První je uvedená interakce s fagocytárním receptorem dectin-1, která je v případě laminarinu inhibiční, tudíž nemůžeme očekávat vliv na nádorové buňky. Druhá spočívá v aktivaci TLR2, což vede ke kaskádě končící stimulací produkce prozánětlivých cytokinů (Gantner et al., 2003). Rozvoj zánětu, byť by nebyl cílen proti nádorům, by mohl růst nádorů potlačovat, jak se s tím setkáváme u Coley toxinu (Tsung a Norton, 2006). K tomu pravděpodobně také nedošlo. Třetí cestou je aktivace CR3 (Goodridge et al., 2009). Nenastal ovšem ani tento případ, možná proto, že nádorové buňky nebyly nikterak opsonizovány.

V našich experimentech vycházíme ze studie Underhilla a Gantnera (2004). Ti zdůrazňují nutnost synergie aktivace signálních PRR s aktivací fagocytárních receptorů. Pro aktivaci fagocytárních receptorů je ale nutné, aby ligandy byly umístěny na povrchu buněk (v přírodě zpravidla mikroorganismů). Fagocytární receptory fagocytujících buněk jsou totiž slabé a vyžadují existenci určitého pole ligandů o vhodné hustotě. Rozhodli jsme se proto toto pole vytvořit kotvením laminarinu na povrch nádorové buňky. Tím nejen vznikne signál pro dectin-1 fagocytujících buněk, ale jejich atak bude rovněž přímo nasměrován žádoucím směrem, a to proti nádorovým buňkám.

Úspěchu jsme dosáhli již s použitím aminovaného laminarinu. Jeho aminoskupina zřejmě přispěla k správné orientaci molekul laminarinu, neboť pravděpodobně interagovala se záporným nábojem nádorových buněk. Obdobný efekt vyvolal laminarin-BAM, tedy laminarin nesoucí přes PEG spacer alifatický řetězec olejové kyseliny, který mu umožňuje kotvení se do buněk, díky přímé aplikaci převážně nádorových.

Pro další studium jsme vybrali laminarin-BAM, jelikož na základě obdobných prací s manosou (Kumžáková *in prep.*) a formylovými peptidy (Vlčková, Čunátová, *in prep.*) víme, že kotvení pomocí alifatických řetězců je mnohem stabilnější než kotvení pomocí nábojových interakcí.

Kombinace laminarin-BAM s LPS (TLR4 agonist) a zejména kombinace laminarin-BAM s LPS a LTA (TLR2 agonist) přinesla velmi vysokou redukci nádorového růstu a je spojena i s úplným byť ojedinělým odstraněním nádoru, které se zatím jeví jako trvalé. To plně odpovídá úvahám Underhilla a Gantnera, 2004 o spolupráci signálních a fagocytárních receptorů. Ta je v daném případě doložena např. prací Yadav a Schorey (2012) dokumentující spolupráci dectinu-1 s TLR2, nebo prací Ferwerda et al., (2008), pojednávající o synergii dectinu-1 s TLR2 a TLR4. Zda se jedná o synergii různých receptorů na úrovni jedné fagocytující buňky, nebo zda je její podmínkou synergická spolupráce při zajištění mohutné infiltrace nových monocytů a neutrofilů, je jednou z otázek, které si klademe.

## 6. Závěr

- Intratumorální aplikace laminarinu nemá vliv na nádorový růst, volný laminarin v kombinaci s LPS nevykazuje žádnou aditivitu či synergii
- Laminarin-BAM v kombinaci s LPS a především v kombinaci s LPS/LTA působil velmi výraznou redukcí nádorového růstu vedoucí ojediněle k úplnému vymizení nádoru a k dlouhodobému, pravděpodobně trvalému uzdravení myši
- Měření teploty nádoru a myši není vhodné pro monitorování tohoto typu experimentů.

## 7. Seznam použité literatury

- BARTŮŇKOVÁ, J.; VERNEROVÁ, E. *Imunologie a alergologie*. Praha: Nakladatelství Triton, 2002. 83 s.
- BROWN, G. D.; GORDON, S. *Immune recognition of fungal  $\beta$ -glucans*. Cellular Microbiology. 2005, 7, s. 471-479.
- COPPING, L.G.; DUKE, S.O. *Natural products that have been used commercially as crop protection agents*. Pest Management Science. 2007, 63, s. 524-554.
- COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. *Pathologic Basis of Disease*. 6. vydání. USA: W. B. Saunders Company, 1999, s. 1425.
- DAMSKY, J.R.; BOSENBERG M. *Mouse melanoma models and cell lines*. Pigment Cell & Melanoma Research. 2010, 23, s. 853-859.
- FERWERDA, G.; MEYER-WENTRUP, F.; KULLBERG, B.J.; NETEA, M.G.; ADEMA, G.J. *Dectin-1 synergizes with TLR2 and TLR4 for cytosine production in human primary monocytes and macrophages*. Cellular Microbiology. 2008, 10, 10, s. 2058-2066.
- FRASNELLI, M.E.; TARUSSIO, D.; CHOBAN-PÉCLAT, V.; BUSSO, N.; SO, A. *TLR2 modulates inflammation in zymosan-induced arthritis in mice*. Arthritis Research & Therapy. 2005, 7, 2, s. 370-379.
- GANTNER, B. N.; SIMMONS, R. M.; CANAVERA, S. J.; AKIRA, S.; UNDERHILL D. M. *Collaborative Induction of Inflammatory Responses by Dectin-1 and Toll-like Receptor 2*. The Journal of Experimental Medicine. 2003, 197, s. 1107-1117.
- GOODRIDGE, H.S.; WOLF, A.J.; UNDERHILL, D. M.  *$\beta$ -glucan Recognition by the Innate Immune System*. Immunological Reviews. 2009, 230, s. 38-50.
- HAJDU, S. I. *A Note From History: Landmarks in History of Cancer, Part I*. Cancer. 2011, 117, s.1097-102
- HIURA, Y.; NAKANISHI, T.; TANIOKA, M.; TAKUBO, T.; MORIWAKI, S. *Identification of Autoantibodies for  $\alpha$  and  $\gamma$ -Enolase in Serum from a Patient with Melanoma*. Japanese Clinical Medicine. 2011, 2, s. 35-41.
- HOŘEJŠÍ, V.; BARTŮŇKOVÁ, J. *Základy imunologie*. 4. vydání. Praha: Nakladatelství Triton, 2009. 316 s.
- JEMAL, A.; BRAY, F.; CENTER, M. M.; FERLAY, J.; WARD, E.; FORMAN, D. *Global cancer statistics*. CA: A Cancer Journal for Clinicians. 2011, 61, s. 69-90
- JÍLEK, P. *Základy imunologie*. Praha: Anyway, s. r. o. : Ewopharma, 2002. 75 s.

- KASPER, D. L.; BRAUNWALD, E.; FAUCI, A. S.; HAUSER, S. L.; LONGO, D. L.; JAMESON, J. L. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 16. vydání. USA: The McGraw-Hill Companies, Inc., 2004. 2680 s.
- KATO, K.; ITOH, C.; YASUKOUCHI, T.; NAGAMUNE, T. *Rapid protein anchoring into the membranes of mammalian cells using oleyl chain and poly(ethylene glykol) derivatives*. *Biotechnology Progress*. 2004, 20, s. 897-904
- KIRSCHNING, C. J.; SCHUMANN R. R. *TLR2: cellular sensor for microbial and endogenous molecular patterns*. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 2002, 270, s. 121-144.
- KNOWLES, M. A.; SELBY P. J. *Introduction to the Cellular and Molecular Biology of the Cancer*. 4. vydání. UK: Oxford University Press, 2005. 532 s.
- MAČÁK, J.; MAČÁKOVÁ, J. *Patologie*. Praha: GRADA Publishing s.r.o., 2004. 347 s.
- MAČÁK, J. *Obecná patologie*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2002. 189 s.
- MARIANI, C.L.; RAJON, D.; BOVA, F.J.; STREIT, W.J. *Nonspecific immunotherapy with intratumoral lipopolysaccharide and zymosan A but not GM-CSF Leads to an effective anti-tumor response in subcutaneous RG-2 gliomas*. *Journal of Neurooncology*. 2007, 85, s. 231-240.
- MIŘEJOVSKÝ, P.; BEDNÁŘ, B. *Obecná patologie*. Praha: Karolinum, 1994. 84 s.
- MURPHY, J.F. *Trends in Cancer Immunotherapy*. *Clinical Medicine Insights: Oncology*. 2010, 4, s. 67–80.
- PANG, Z.; OTAKA, K.; MAOKA, T.; HIDAKA, K.; ISHUIIMA, S.; ODA, M.; OHNISHI, M. *Structure of  $\beta$ -Glucan from Laminarin and Its Effect on Human Monocytes to Inhibit the Proliferation of U937 Cell*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2005, 69, 3, s. 553-558.
- PLAYFAIR, J.H.L.; CHAIN, B.M. *Immunology at a Glance*. 7.vydání. UK: Blackwell Publishing. 2001, 96 s.
- SMYTH, M.J.; HAYAKAWA, Y. *Evidence for the Existence of Cancer Immunosurveillance*. *Annals of Cancer Research and Therapy*. 2004, 12, s. 9-32.
- SOUTHGATE, D.A.T.; WALDRON, K.; JOHNSON, I. T.; FENWICK, G.R. *Dietary Fibre: Chemical and Biological Aspects*. UK: Royal Society of Chemistry, 1990. 386 s.
- TAICHER, B.A., ALVAREZ, E., ANG, K.K. *Tumor Models in Cancer Research*. 2.vydání. USA: Humana Press, 2011. 693 s.

- TAKEDA, K.; AKIRA, S. *Toll-like receptors in innate immunity*. International Immunology. 2005, 17, s. 1-14.
- TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. *Pattern Recognition Receptors and Inflammation*. Cell. 2010, 140, s. 805-820.
- TOROSANTUCCI, A.; BROMURO, C.; CHIARI, C., DE BERNARDIS, F.; BERTI, F.; GALLI, CH.; NORELLI, F.; BELLUCCI, C.; POLONELLI, L.; CONSTANTINO, P.; RAPPUOLI, R.; CASSONE, A. *A novel glyco-conjugate vaccine against fungal pathogens*. Journal of Experimental Medicine. 2005, 202, 5, 597-606.
- TRNKA, F. *O nádorech pro zdravě zvidavé*. České Budějovice: INPRESS a.s., 2008. 82 s.
- TSONI, S. V.; BROWN, G. D.  *$\beta$ -glucans and Dectin-1*. Annals of the New York Academy of Science. 2008, 1143, s. 45-60.
- TSUNG, K.; NORTON, J.A. *Lessons from Coley's Toxin*. Surgical Oncology. 2006 15, 1, s. 25-28.
- UNDERHILL, D.M.; GANTNER, B.; *Integration of Toll-like receptor and phagocytic signaling for tailored immunity*. Microbes and Infection. 2004, 6, s.1368-1373.
- WALLACE, H. C., Jr.; FROM, L.; BERNARDINO, E. A.; MIHM, M.C. *The Histogenesis and Biologic Behavior of Primary Human Malignant Melanomas of the Skin*. Cancer Research. 1969, 29, s. 705-726.
- WEINBERG, R. A. *Jediná odrodilá bunka (Ako vzniká rakovina)*. Bratislava: Kalligram, 2000. 177 s.
- WITKO-SARSAT, V.; RIEU, P.; DESCAMPS-LATSCHA, B.; LESAVRE, P.; HALBWACHS-MECARELLI, L. *Neutrophils: Molecules, Functions and Pathophysiological Aspects*. Laboratory Investigation. 2000, 5, 80, s. 617-653.
- YADAV, M.; SCHOREY, J.S. *The  $\beta$ -glucan receptor dectin-1 functions together with TLR2 to mediate macrophage activation by mycobacteria*. Blood. 2006, 108, 9: s. 3168-317.