

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

**Nádorová imunoterapie založená na mechanizmech vrozené imunity a její
optimalizace**

Bakalářská práce

Kamila Masáková

Školitel: RNDr. Jan Ženka, CSc.

České Budějovice 2016

Masáková, K., 2016: Nádorová imunoterapie založená na mechanismech vrozené imunity a její optimalizace. [Cancer immunotherapy based on mechanisms of innate immunity and its optimization. Bc. Thesis, in Czech.] – 48 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

The aim of this thesis was to study the effect of intratumoral application of various combinations of TLR agonist and compounds stimulating phagocytosis on reduction of tumor size. The effect of immunotherapy was studied using different models of tumors. The cytotoxic effect of activated neutrophils on melanoma cell was studied as well.

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 jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátorů.

V Českých Budějovicích, 18. 4. 2016

.....

Kamila Masáková

Poděkování:

Děkuji svému školiteli RNDr. Janu Ženkovi, CSc. za poskytnutí cenných rad, ochotu a přátelský přístup při vedení této bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat kolektivu Oddělení medicínské biologie za poskytnutí příjemného pracovního zázemí. Velké díky patří i celé mé rodině za jejich obětavou podporu a trpělivost, které se mi dostávalo po celou dobu studia.

OBSAH:

1 ÚVOD	1
2 PŘEHLED LITERATURY	2
2.1 Nádorové onemocnění	2
2.1.1 Klasifikace nádorů	2
2.1.2 Šíření nádorů organismem	2
2.1.3 Melanom	3
2.1.3.1 Myší melanom B16-F10	3
2.1.4 Karcinom pankreatu	4
2.1.4.1 Myší adenokarcinom pankreatu Panc02	4
2.1.5 Způsoby léčby nádorových onemocnění	4
2.1.5.1 Chirurgická léčba	5
2.1.5.2 Radioterapie	5
2.1.5.3 Farmakologická léčba	5
2.2 Nádorová onemocnění a imunitní systém	6
2.2.1 Základní mechanismy imunitního systému	6
2.2.1.1 Nespecifická imunitní odpověď	6
2.2.1.2 Specifická imunitní odpověď	7
2.2.2 Mechanismy imunitního systému v boji proti nádorům	7
2.2.2.1 Nádorové antigeny	7
2.2.2.2 Buňky imunitního systému	8
2.2.2.3 Cytokiny	9
2.2.3 Vztah imunitního systému a nádorových buněk	10
2.2.4 Způsoby úniku nádorových buněk imunitnímu systému	11
2.2.5 Terapie nádorových onemocnění stimulací nespecifické imunity	12
2.2.5.1 PRRs – Pattern recognition receptors	12
2.2.5.1.1 Toll-like receptory (TLR)	12
2.2.5.1.2 Manózoové receptory (MR)	12
2.2.5.1.3 Formyl peptidové receptory (FPR)	13
2.2.5.1.4 NOD-like receptory (NLR)	13
2.2.5.1.5 Rig-like receptory (RLR)	13
2.2.5.1.6 Lektiny vázající manózu (MBL)	14
2.2.5.2 Látky použité v bakalářské práci jako motivy PAMPs	14

2.2.5.2.1	Laminarin	14
2.2.5.2.2	Manan	14
2.2.5.2.3	N-formyl-methionyl-leucyl-fenylalanin (fMLF)	14
2.2.5.2.4	Resiquimod (R-848)	15
2.2.5.2.5	Kyselina lipoteichoová (LTA)	15
2.2.5.2.6	Limpet keyhole hemocyanin (KLH)	15
2.2.5.2.7	Kyselina polyinosinová:polycytidylová (Poly I:C)	15
3	CÍLE PRÁCE	17
4	MATERIÁL A METODY	18
4.1	Chemikálie	18
4.2	Laboratorní myši	18
4.3	Nádorové buněčné linie	19
4.4	Příprava nádorových buněk pro transplantaci a <i>in vitro</i> použití	19
4.5	Transplantace nádorových buněk	19
4.6	Příprava neutrofilů pro <i>in vitro</i> použití	20
4.6.1	Izolace buněk z kostní dřeně myši	20
4.6.2	Magnetická separace	20
4.6.3	Priming neutrofilů	21
4.7	Měření a výpočet velikosti nádorů	21
4.8	Počítání plicních metastáz melanomu B16-F10	21
4.9	Statistické vyhodnocení výsledků	21
4.10	Příprava terapeutických látek	22
4.10.1	Syntéza laminarinu-BAM	22
4.10.2	Syntéza mananu-BAM	22
4.10.3	Syntéza f-MLFKK-BAM	22
4.10.4	Syntéza R-848.HCl	22
4.11	Experimenty	23
4.11.1	Pulzní terapie melanomu B16-F10 pomocí R-848.HCl, laminarinu-BAM a jejich kombinací	23
4.11.2	Pulzní terapie melanomu B16-F10 pomocí R-848.HCl, f-MLFKK-BAM a jejich kombinací	23
4.11.3	Pulzní terapie melanomu B16-F10 směsí R-848.HCl + POLY I:C + manan-BAM v kombinaci s KLH nebo LTA	24

4.11.4 Pulzní terapie pankreatické adenokarcinomu Panc02 pomocí mananu kotveného BAM, směsí R-848.HCl + POLY I:C + LTA a jejich kombinací	24
4.11.5 Pozorování cytotoxického efektu neutrofilů aktivovaných LTA nebo GM-CSF + TNF α na melanomové buňky značené f-MLFKK-BAM. <i>In vitro</i> experiment	25
5 VÝSLEDKY	26
5.1.1 Pulzní terapie melanomu B16-F10 pomocí R-848.HCl, laminarinu-BAM a jejich kombinací	26
5.1.2 Pulzní terapie melanomu B16-F10 pomocí R-848.HCl, f-MLFKK-BAM a jejich kombinací	28
5.1.3 Pulzní terapie melanomu B16-F10 směsí R-848.HCl + POLY I:C + manan-BAM v kombinaci s KLH nebo LTA	30
5.1.4 Pulzní terapie pankreatické adenokarcinomu Panc02 pomocí mananu kotveného BAM, směsí R-848.HCl + POLY I:C + LTA a jejich kombinací	32
5.1.5 Pozorování cytotoxického efektu neutrofilů aktivovaných LTA nebo GM-CSF + TNF α na melanomové buňky značené f-MLFKK-BAM. <i>In vitro</i> experiment	33
6 DISKUSE	34
7 ZÁVĚR	37
8 SEZNAM ZKRATEK	38
9 LITERATURA	39

1 ÚVOD

Podle národního onkologického registru bylo v roce 2011 zaznamenáno 83 581 nových případů zhoubných novotvarů. Udává se, že pouze 5-10 % všech případů rakoviny mají za následek genetické změny. Kdežto životní prostředí a životní styl jedince způsobují až 90-95 % případů (Anand a kol., 2008). Nezanedbatelnou roli v prevenci proti rakovině hraje tedy v první řadě životní styl jedince. Mezi hlavní a velmi známé rizikové faktory patří kouření, alkohol, UV záření, nezdravá strava nebo nedostatek fyzické aktivity. Důležitou roli hraje samozřejmě i stres (Anand a kol., 2008). Navzdory těmto poznatkům nových případů přesto stále přibývá.

Nádorová onemocnění tvoří velmi různorodou a obsáhlou skupinu. Ačkoliv ve vývoji jejich léčby dochází k pokrokům, stále představují velikou hrozbu a jednu z hlavních příčin předčasného úmrtí. Proto každý nový krok ve vývoji účinnější terapie je velice cenný.

Tato bakalářská práce se zabývá terapií nádorových onemocnění zapojením nespecifické imunity a dává si za cíl přispět novými poznatky ve vývoji účinnější terapie.

2 PŘEHLED LITERATURY

2.1 Nádorové onemocnění

Nádor, také označován jako tumor, neoplazma, či novotvar, je abnormální tkáň charakteristická svou nekontrolovanou buněčnou proliferací. Předpokládá se, že vzniku nádoru předchází nahromadění somatických mutací, jež jsou zodpovědné i za celkovou agresivitu nádoru (Dahl a kol., 2007). Nádorová onemocnění se vyznačují svou vysokou heterogenitou (Beerenwinkel a kol., 2014). Ale i přesto vykazují specifické znaky, které mohou být rozeznány: soběstačnost v potřebě růstových signálů, necitlivost vůči inhibičním signálům, neomezený replikační potenciál, schopnost úniku apoptózy, angiogeneze, tkáňová invazivita a metastazování (Hanahan a Weinberg, 2000).

2.1.1 Klasifikace nádorů

Existuje mnoho typů novotvarů, proto je pro jejich snadnější rozpoznání velmi důležitá klasifikace. Základním kritériem je **tkáňový původ**. Podle tkáňového původu rozlišujeme 5 základních kategorií: nádory epitelové, mezenchymové, hematopoetické, zárodečné a smíšené (Sell, 2004).

Nádory můžeme také rozdělit podle **orgánové lokalizace**, např. nádory kůže, kolorekta, močového měchýře, prsu, nebo celosvětově nejčastěji se vyskytující nádory plic a průdušek (Siegel a kol, 2015).

Podle **biologických vlastností** lze rozlišit dva základní typy: **benigní** a **maligní** tedy nezahobné a zahobné. Benigní nádory se vyznačují ohraničeným růstovým potenciálem. Rostou pomalu a expanzivně, což může způsobit utlačování okolních orgánů. Naopak maligní nádory rostou podstatně rychleji a invazivně. Typickým znakem pro malignitu je zakládání vzdálených ložisek – metastáz.

2.1.2 Šíření nádorů organismem

Buněčné migrace jsou důležitou součástí mnoha buněčných procesů, jako jsou embryogeneze, či imunitní odpověď (Kovaříková a spol., 2004). Avšak v případě nádorových

buněk má buněčná migrace za následek vznik metastáz, které jsou nejčastější příčinou úmrtí na rakovinu (Chambers a kol., 2002).

Nádorové buňky se mohou šířit organismem třemi základními způsoby. Jednak se mohou rozšiřovat **tělními dutinami**, např. močovými cestami. Takto vzniklé metastázy se označují jako porogenní.

Dalším způsobem je **metastazování hematogenní cestou** (např. karcinom ledviny nebo tlustého střeva). Krevní cestou často vznikají i velmi vzdálené metastázy.

Třetí možností je šíření **cestou lymfatickou** typické např. pro melanom (Morton a kol., 1992). Dochází k vytváření metastáz v průběhu lymfatických cest. Ty však ústí do krevního systému, tak i lymfogenně šířící se rakovinné buňky se mohou dostat do krevního systému (Adam a kol., 2003).

2.1.3 Melanom

Melanom neboli melanoblastom je nádor neuroektodermový. Vzniká maligní transformací melanocytů, jejichž hlavní funkcí je tvorba pigmentu melaninu, jenž chrání před ultrafialovým (UV) zářením. Můžeme je nalézt především v kůži a vlasových folikulech, ale je možné je nalézt i ve sliznici urogenitálního, gastrointestinálního a dýchacího traktu, či v některých strukturách oka. Klinicky nejčastější variantou je kožní melanom, ale vzácně jej můžeme nalézt i ve výše zmíněných strukturách (Krajsová, 2015).

Přesná příčina vzniku melanoblastomu není známa, ale mezi prokázané rizikové faktory se řadí UV záření a genetické faktory. V některých případech může hrát jistou roli i potlačení imunity (Leiter a Garbe, 2008).

V této práci byl studován melanom pro jeho relativně vysokou terapeutickou rezistenci, agresivní klinické vlastnosti a predispozici k metastazování (Ha a kol., 2005). Konkrétně byl studován myší melanom B16-F10.

2.1.3.1 Myší melanom B16-F10

Melanom B16 se poprvé spontánně objevil v roce 1954 u myši C57BL/6 (Giavazzi a Decio, 2014), od kterého bylo později odvozeno několik submodelů s odlišnými

vlastnostmi, mezi nimi i B16-F10. Pro tento model je typické vysoce invazivní chování a metastazování do plic (Nakamura a kol., 2002).

2.1.4 **Karcinom pankreatu**

Karcinom slinivky břišní představuje onemocnění s velmi špatnou prognózou. Až do pozdního stádia se neprojevují téměř žádné zjevné symptomy. Je vysoce odolný jak vůči chemoterapii, tak cílené terapii (Schevchenko a kol., 2013). Pouze 20 % pacientů se dožije pěti let od stanovení diagnózy (Li a kol., 2004). U většiny případů se vyskytnou metastázy, a to především na játrech (Frohlich a kol., 1999). Prokázaným rizikovým faktorem je kouření, které zvyšuje riziko rakoviny až dvakrát (Lowenfels a kol., 2001).

Rozlišujeme **karcinomy endokrinní části pankreatu**, jež jsou vzácné. Dále pak **karcinomy exokrinní části**, které nejčastěji napadají hlavu pankreatu, méně často potom tělo a vzácněji ocas pankreatu. Především se jedná o maligní adenokarcinomy.

2.1.4.1 **Myší adenokarcinom pankreatu Panc02**

Myší model Panc02 představuje duktální adenokarcinom slinivky břišní. Jedná se o jeden z nejagresivnějších nádorů vůbec (Priebe a kol., 1992). Proto se stal předmětem studia této práce.

2.1.5 **Způsoby léčby nádorových onemocnění**

V léčbě nádorových onemocnění dochází k neustálým pokrokům a novým poznatkům, přesto dosud existuje mnoho nejasností a rakovina je považována za jednu z nejobávanějších chorob. Proto se také stává cílem mnoha studií.

V léčbě nádorů existují dva základní cíle. Jednak samotná léčba nádoru, tedy **protinádorová léčba**, která si dává za cíl úplné odstranění nádorových buněk, popřípadě jejich maximální redukci. Dále **podpůrná léčba**, jejímž cílem je zmírnění obtíží vyvolaných jak samotným nádorem, tak jeho léčbou.

2.1.5.1 Chirurgická léčba

Chirurgická léčba stále patří mezi základní pilíře v léčbě nádorových onemocnění. V současné době se obvykle kombinuje s chemoterapií a radiační terapií.

Onkochirurgie má mnoho úkolů. Jednak je využívána pro **stanovení diagnózy**, např.: zhodnocení stavu nádoru, či sběru materiálu pro histologii. Velmi důležité jsou tzv. **kurativní výkony**, od kterých se očekává úplné odstranění primárních nádorů, ale i některých zjištěných metastáz. Neméně důležitá je **paliativní chirurgie** prováděná ke zmírnění příznaků u neoperabilních nádorů nebo ke zmenšení, či zpomalení růstu tumorů (Nelson a kol., 2001).

2.1.5.2 Radioterapie

Radioterapie využívá fotonové či elektronové záření na destrukci buněk. Radiologické záření poškozuje řetězce DNA, buňka s takovýmto poškozením pak není schopná projít mitózou, to vede k zániku buněk. Nejvíce citlivé na radiologické záření jsou buňky v G2 a M fázi. Spousta buněk v nádoru se nachází v M fázi, radiace proto u nich vyvolává poškození (Vodička, 1998). Při terapii se nelze vyhnout i poškození okolní zdravé tkáně, tudíž tato terapie spíše doplňuje léčbu chirurgickou a chemoterapií (Hynková a Doležalová, 2008).

Různé nádory vykazují různou citlivost na radiační záření. Velmi citlivé na radioterapii jsou např. lymfomy nebo leukémie. Mezi středně citlivé řadíme karcinomy a za radiorezistentní se považují gliomy a sarkomy (Adam a kol., 2003).

2.1.5.3 Farmakologická léčba

Farmakologická léčba zaměřená proti nádorovým chorobám zahrnuje množství terapií využívajících farmakologických látek. Řadíme mezi ně např. chemoterapii, bioterapii, hormonální léčbu nebo léčbu retinoidy.

Chemoterapie je v současné protinádorové medicíně stále nepostradatelnou součástí (Klener, 2003). Její podstatou je podávání cytostatik – látek, které cytotoxicky působí na dělící se buňky. Princip chemoterapie je založen na faktu, že mnoho nádorových buněk se nachází ve fázi dělení. Velká nevýhoda této terapie je spatřována v její nespecifičnosti, omezuje proliferační pochody a zvyšuje citlivost k apoptóze i buněk zdravých tkání (Klener, 2008).

Bioterapie se zakládá na aplikaci látek chemicky podobným látkám, které produkují lidské buňky. Můžeme ji považovat za terapii cílenou, neboť využívá specifických inhibitorů různých fází karcinogeneze, např. inhibitory růstových faktorů, regulačních proteinů buněčného cyklu, a mnoho dalších. Do bioterapie můžeme zařadit i aplikaci monoklonálních protilátek (Klener, 2008).

2.2 Nádorová onemocnění a imunitní systém

Funkcí imunitního systému je ochrana organismu před nebezpečím jak vnějšího tak vnitřního prostředí. Rozpoznává cizorodé patogeny, likviduje poškozené a odumřelé buňky. Ale výraznou roli hraje i v obraně proti nádorům (Blattman a Greenberg, 2004). Obrovský problém však spočívá v podobnosti nádorových buněk buňkám fyziologicky normálním a v řadě mechanismů, kterými se nádorové buňky účinně brání imunitnímu útoku. Překonání těchto překážek je hlavním cílem protinádorové imunologické terapie.

2.2.1 Základní mechanismy imunitního systému

Imunitní systém se pro přehlednost rozděluje do dvou základních složek, přičemž obě jsou vzájemně propojeny na mnoha úrovních. Rozlišujeme imunitu nespecifickou – vrozenou a specifickou – získanou (Akira a kol., 2006).

2.2.1.1 Nespecifická imunitní odpověď

Obvykle první setkání vrozené imunity s patogeny probíhá na úrovních anatomické a chemické bariéry (kůže, enzymy, mastné kyseliny). V případě překonání těchto bariér a vstupu patogenů do organismu bojuje imunitní systém buněčnými složkami. Do skupiny buněk nespecifické imunity patří cytotoxické NK buňky (natural killers) a fagocytující buňky (monocyty, makrofágy, neutrofilů, bazofilů, eozinofilů, žírné buňky, dendritické buňky). Tyto fagocyty rozpoznávají povrchové struktury, označovány jako *pathogen associated molecular patterns* (PAMPs), mikroorganismů. Příkladem jsou lipopolysacharidy vlastní gramnegativním bakteriím či manany u kvasinek a plísní. Rozpoznávají je pomocí různých receptorů, souhrnně nazvaných *pattern recognition receptors* (PRRs). Navázání PAMPs na PRRs je signálem mimo jiné pro fagocytózu. Kromě fagocytů jsou PAMPs rozpoznávány i

humorální složkou nespecifické imunity, to vede k aktivaci komplementu (Beutler, 2004; Medzhotov a Biron, 2003).

2.2.1.2 **Specifická imunitní odpověď**

Odpověď specifické imunity přichází později, déle než u vrozené. Zato si však vyvinula důmyslnější mechanismy, jako jsou vysoká specifita a diverzita nebo imunitní paměť umožňující rychlejší sekundární odpověď.

Po setkání buněk adaptivní imunity (T-lymfocyty, B-lymfocyty) s antigenem, dochází k jejich aktivaci, tzn. tvorbě specifických protilátek, paměťových buněk a v případě cytotoxických T-lymfocytů (CTL) destrukci patogenů (Bonilla a Oettgen, 2010).

2.2.2 **Mechanismy imunitního systému v boji proti nádorům**

Aby imunitní systém mohl účinně bojovat proti nádorům, musí ho umět rozpoznat. Jedním z hlavních předpokladů pro rozpoznání nádorových buněk imunitním systémem je přítomnost antigenů na povrchu těchto buněk (Boon a Bruggen, 1996). Po jejich úspěšném rozpoznání zapojuje imunitní systém v boji proti nádorům jak složku nespecifickou (např.: NK buňky, makrofágy, neutrofilů, složky komplementu), tak i složku specifickou (protilátky, cytotoxické T-lymfocyty).

2.2.2.1 **Nádorové antigeny**

Známe dvě kategorie nádorových antigenů: nádorově specifické (TSA – tumor-specific antigens) a antigeny asociované s nádory (TAA – tumor-associated antigens).

Antigeny nádorově specifické jsou molekuly exprimované pouze na povrchu některých nádorových buněk, nikoliv na buňkách normálních. Existence TSA poskytuje potřebný rozdíl mezi buňkami normálními a maligními pro klinickou diagnózu některých nádorů (Schreiber a kol., 1988). Mezi TSA patří např. *komplexy MHC* (major histocompatibility complex) *molekul I. třídy s abnormálními fragmenty buněčných proteinů*, které se vyskytují převážně u chemicky indukovaných nádorů. U nádorů indukovaných viry můžeme nalézt *komplexy MHC molekul s fragmenty virových proteinů*. Jako TSA také fungují *abnormální formy glykoproteinů* (Hořejší, 2015).

Antigeny asociované s nádory se v onkologické diagnostice také využívají jako nádorové markery (Old a Chen, 1996). Nevýhodou je ovšem fakt, že se TAA nevyskytují pouze na nádorových buňkách, ale i na některých buňkách normálních. Mezi známé TAA patří například antigeny rodiny *MAGE*, *BAGE*, *GAGE*, typické především pro melanom, karcinom plic a močového měchýře nebo sarkomy. Jsou také exprimovány na normálních buňkách testikulární a placentární tkáně (Boon a Bruggen, 1996). *Onkofetální antigeny* exprimované na normálních embryonálních buňkách jsou detekovány jako markery hepatomů (alfa-fetoprotein) nebo karcinomů tlustého střeva (karcinoembrionální antigen), (Chism a kol., 1978). Dalším velmi důležitým tumorovým markerem je *prostatický specifický antigen* (PSA), který je produkován normálními buňkami prostaty. Zvýšená exprese PSA je detekována u mužů s karcinomem prostaty (Brawer, 2000).

2.2.2.2 Buňky imunitního systému

Makrofágy patří mezi fagocytární buňky, také se řadí mezi antigen prezentující buňky (APC), podílejí se na vzniku zánětu a produkují řadu cytokinů. V přítomnosti interferonu- γ (IFN- γ), prozánětlivého cytokinu, se makrofágy přeměňují na aktivní formy M1, které jsou důležitými fagocyty mikroorganismů, odumřelých normálních, ale i nádorových buněk (Mantovany, 2002). M1 makrofágy produkují interleukin-12 (IL-12), který aktivuje NK buňky a T-lymfocyty, a tím podporují zánět (Nathan, 1987). Pokud ale dojde ke stimulaci makrofágů IL-4 a IL-13, vznikají aktivní formy M2. Ty podporují regresí poškozených tkání a produkují protizánětlivé cytokiny. Jejich přítomnost v nádorové masě tedy spíše podporuje růst nádorů (Hořejší, 2015).

T lymfocyty tvoří velmi důležitou skupinu buněk v protinádorové imunitě. Zralé efektorové cytotoxické lymfocyty (CTL) mají schopnost destruovat buňky infikované virem nebo nádorové buňky (Bennett a kol., 1998). Buď procesem degranulace cytotoxických granulí, nebo vazbou Fas-ligandu (FasL) na apoptický receptor buňky, který aktivuje apoptózu (Alderson a kol., 1995). Tomu ale předchází složitý proces aktivace CTL, kdy prekurzory CTL rozpoznávají HLA komplexy s onkogenními fragmenty na povrchu APC - makrofázích, dendritických buněk, B-lymfocytů (Schoenberger a kol., 1998).

NK buňky (natural killers - „přirození zabijáci“) jsou neméně důležitou skupinou lymfocytů s cytotoxickou aktivitou. Mají schopnost přímo zabít abnormální buňky infikované virem nebo buňky nádorové (Herberman, 1986). Některé nádorové a virem infikované buňky

mají schopnost úniku T a B lymfocytům prostřednictvím snížené exprese MHC molekul I. třídy. Této skutečnosti však využívají NK buňky, které rozpoznávají abnormální buňky s deficitem exprese MHC I. třídy. MHC molekuly detekují svými inhibičními receptory (např. receptory rodiny KIR, killer inhibitor receptors), které spouštějí inhibici degranulace cytotoxických granul, tím uchrání zdravé buňky před svou cytotoxickou aktivitou. Kromě toho mají NK buňky na svém povrchu také aktivační receptory (např. NKG2D) rozpoznávající specifické povrchové proteiny přítomné na nádorových buňkách. Signály zprostředkované aktivačními receptory zahajují degranulaci cytotoxických látek a tím zabíjí nádorových buněk (Waldhauer a Steinle, 2008).

2.2.2.3 Cytokiny

Důležitou roli v protinádorové odpovědi hrají také cytokiny, jež regulují imunitní systém na mnoha úrovních. Jednou z funkcí cytokinů je aktivace efektorových mechanismů imunitního systému zahrnutých v boji proti nádorovým buňkám. Mohou ale i pozitivně podporovat růst nádorů, jejich maligní transformaci nebo metastazování (Smyth a kol., 2004). Pro příklad je uvedeno několik typů cytokinů.

IFN- α (interferon alfa) stimuluje fagocytární vlastnosti makrofágů, zvyšuje aktivitu cytotoxických lymfocytů a NK buněk. Také se podílí na inhibici angiogeneze (Brierlei a kol., 2004; Tigl, 1997).

TNF- α (katechin, tumor necrosis factor alfa) je prozánětlivý cytokin. Má cytotoxické účinky a lokálně působí nekrózu nádorových buněk. Je produkován např.: NK buňkami, aktivovanými lymfocyty nebo buňkami některých nádorů (Beutler a Cerami, 1987; Smyth a kol., 2004).

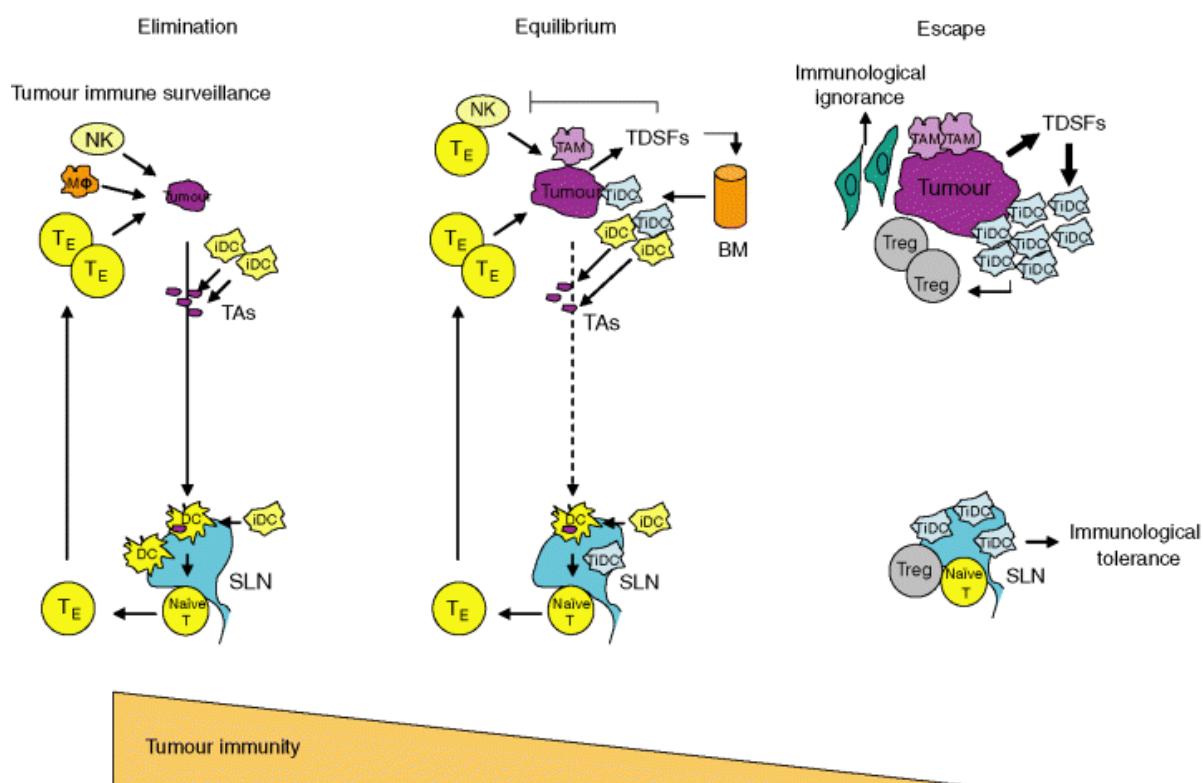
GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulating factor) aktivuje hlavně makrofágy, granulocyty a fibroblasty. Zvyšuje jejich fagocytární a cytotoxické vlastnosti (Shi a kol., 2004).

IL-2 (interleukin-2) funguje jako růstový faktor T-lymfocytů a NK buněk (Taniguchi a Minami, 1993).

2.2.3 Vztah imunitního systému a nádorových buněk

Vztah mezi nádorovými buňkami a imunitním systémem prochází třemi fázemi: eliminace, rovnováhy a úniku (elimination, equilibrium, escape), znázorněno na obrázku 1.

Ve fázi eliminace dochází za spolupráce nespecifické a specifické imunity k detekci abnormálních buněk a jejich likvidaci. Přesto může dojít k přežití některých nádorových buněk, které se tak dostanou do fáze rovnováhy s imunitním systémem. V této fázi imunitní systém likviduje více imunogenní buňky, naopak méně imunogenní nádorové buňky imunitnímu systému unikají. Nedochází k úplnému odstranění nádorových buněk, ale jejich růst je držen pod kontrolou. Fáze rovnováhy proto může trvat různě dlouhou dobu. Ve třetí fázi buňky nabývají schopností aktivního úniku imunitnímu systému a aktivní obrany (Mittal a kol., 2014).



Obr. 1: Schéma nádorové imunoeditace (Kim a kol., 2007).

iDC, nezralé dendritické buňky; Mφ, makrofág; NK, natural killer (přirození zabíječi); T_E, efektorové T buňky; TAs, nádorové antigeny; SLN, lymfatická uzlina; TiDC, antigeny asociované s nádory; TAM, makrofágy asociované s nádory; TDSFs, rozpustné nádorové faktory; Tregs, regulační T buňky; BM, kostní dřeň.

2.2.4 Způsoby úniku nádorových buněk imunitnímu systému

Imunitní systém chrání organismus před nebezpečnými patogeny a jinými nežádoucími vlivy, ale také rozeznává vlastní od cizího. Této vlastnosti využívají některé nádorové buňky k úniku před imunitním dozorem.

Nádorové buňky podléhají během jejich expanzivního růstu řadě mutací. V důsledku těchto mutací mohou ztrácet nádorové antigeny a pro imunitní systém se tak stát neviditelnými. Nádorové buňky exprimující antigeny se mohou chránit překrytím svého povrchu molekulami glykokalyxu a zamaskovat tak své antigeny (Šťastný a Říhová, 2015).

Další možností nádorových buněk k uniknutí před imunitním systémem je nízká nebo dokonce žádná exprese MHC I molekul, jež prezentují antigen T-lymfocytům na jejich povrchu. Kromě snížení syntézy celých MHC molekul se mohou nádorové buňky vyhnout T buněčné odpovědi snížením syntézy jen součástí této molekuly např. $\beta 2$ mikroglobulinu (Restifo a kol., 1993).

Mnoho nádorových buněk samo produkuje faktory inhibující imunitní odpovědi. Příkladem je protizánětlivý IL-10 (interleukin 10) inhibující diferenciaci T-lymfocytů nebo TGF- β (transforming growth factor beta), který podporuje diferenciaci regulačních T buněk (Lin a Karin, 2007).

Nemalou úlohu v regulaci protinádorové imunitní odpovědi mají také regulační T-lymfocyty (Treg). Treg buňky moduluji intenzitu imunitní odpovědi a předcházejí tak vzniku autoimunitních chorob. Inhibují různými faktory (produkcí inhibičních cytokinů, expresí inhibičních receptorů) efektorové T lymfocyty, čímž mohou podporovat růst nádorů. Mezi hlavní inhibiční cytokiny produkované Treg buňky patří např. TGF- β , IL-10 nebo IL-6 (Klasbusay, 2015).

Důležitou roli v úniku před imunitním systémem sehrává také snížená exprese Fas proteinu na povrchu nádorových buněk. Fas receptor je membránový protein exprimovaný mnoha buňkami, hojně jej prezentují hlavně aktivované T-lymfocyty a NK buňky. Navázání Fas ligandu (FasL) na Fas receptor indukuje apoptózu buněk a umožňuje tak autoregulaci imunitní odpovědi. Snížená exprese Fas tak umožňuje nádorovým buňkám vyhnout se apoptóze. Na druhé straně mohou nádory zvýšeně exprimovat FasL, čímž indukují programovanou smrt v infiltrujiících T-lymfocytech (Gastman a kol., 1999).

2.2.5 Terapie nádorových onemocnění stimulací nespecifické imunity

Jak bylo již výše zmíněno, buňky nespecifické imunity rozpoznávají patogeny pomocí svých receptorů (PRRs) vázající se na specifické molekuly (PAMPs) exprimované na jejich povrchu. Jednou z možností terapie nádorů je využití těchto poznatků, aplikovat PAMPs na nádorové buňky a tím je učinit lépe rozpoznatelné pro imunitní systém.

2.2.5.1 PRRs – Pattern recognition receptors

Rozlišujeme tři základní třídy PRRs podle jejich výskytu: **membránové** (např.: Toll-like receptory, manózu vázající receptor nebo formyl peptidové receptory), **cytoplazmatické** (NOD-like receptor, RIG-1-like receptor) a **sekretované**, mezi které patří např. lektin vázající manózu (Elfeil a kol., 2013).

2.2.5.1.1 Toll-like receptory (TLR)

Toll-like receptory jsou transmembránové proteiny hrající klíčovou roli v aktivaci vrozené imunity. Charakteristické jsou pro ně leucinové repetice na extracelulárním N-konci (LRT doména) a TIR (Toll/IL-1 receptor) cytoplazmatická doména. Patří mezi hlavní receptory rozpoznávající vysoce konzervované molekuly řady mikrobů (bakterií, virů, plísní, prvoků). Např. TLR3 interaguje s dsRNA virů, či sytetickou dsRNA - Poly I:C (Polyinosinic:polycytidylic acid). TLR4 receptor detekuje LPS (lipopolysacharid) přítomný ve stěně gramnegativních bakterií, TLR7 detekuje ssRNA a syntetický resiquimod. TLR jsou exprimované především na povrchu monocytů, makrofágů a dendritických buněk. Výsledkem jejich aktivace je produkce řady cytokinů vyvolávajících zánět, maturaci buněk imunitního systému a zvýšení jejich fagocytární aktivity (Moresco a kol., 2013; Elfeil a kol., 2013).

2.2.5.1.2 Manózové receptory (MR)

Manózový receptor je membránový protein exprimovaný makrofágy, dendritickými buňkami a některými endotelovými buňkami. Stimuluje jejich funkci fagocytózy a endocytózy patogenních buněk (Gordon, 2002). MR má na extracelulární straně tři různé domény. Doménu bohatou na cystein (CR doménu), fibronectin II (FNII) doménu (Taylor a kol., 1990) a Ca²⁺-dependentní karbohydrátovou doménu (CRD), která váže vybrané sacharidy obsahující manózu. Ligandy vázané manózovým receptorem jsou prezentovány mnoha bakteriemi

(např. *Streptococcus pneumoniae*), virem napadenými buňkami či parazity (Zamze a kol. 2002).

2.2.5.1.3 **Formyl peptidové receptory (FPR)**

Formyl peptidové receptory patří mezi transmembránové proteiny spřažené se signální dráhou G-proteinu. Vyskytují se převážně na povrchu lymfocytů a fungují jako jejich chemotaktické a aktivační receptory (Prossnitz a Ye, 1997). FPR rozeznávají formylové peptidy přítomné na povrchu řady patogenů nebo mitochondrií (Lee, 2002). Po ligaci FPR formylovými proteiny dochází k degranulaci a uvolnění proteolytických enzymů, ke zvýšení fagocytárních vlastností a chemotaxi buněk do místa zánětu (Murphy a kol., 1992).

2.2.5.1.4 **NOD-like receptory (NLR)**

NOD-like receptory (NLR) jsou intracelulární proteiny rozpoznávající PAMPs, které se dostaly skrz membránu až do cytoplazmy. Pro NLR je charakteristická přítomnost konzervované NOD domény (nucleotide-binding oligomerization domain) a leucinové repetice. NOD-1 receptory rozeznávají iE-DAP (γ -D-glutamyl-meso-diaminopimelová kyselina) přítomné v mnoha gramnegativních a v některých grampozitivních bakteriích (např. rodu *Listeria*). NOD-2 váží MDP (muramyldipeptid) nacházející se ve všech grampozitivních i gramnegativních bakteriích. Navázání ligandů na NLR spouští konformační změnu (oligomerizaci) prostřednictvím NOD domény a aktivaci faktorů stimulujících prozánětlivé molekuly (Franchi a kol., 2008).

2.2.5.1.5 **RIG-like receptory (RLR)**

RIG (retinoic acid-inducible gene)-like receptory (např. RIG-1, MDA5, LGP2) patří mezi cytoplazmatické PRRs. Rozpoznávají virovou DNA a vyvolávají intracelulární antivirovou imunitní odpověď. Výraznou roli v obraně proti virům hrají především v myeloidních a epitelových buňkách (Loo a Gale, 2011).

2.2.5.1.6 **Lektiny vázající manózu (MBL)**

Lektin vázající manózu je sérový protein vylučovaný jaterními buňkami. Obsahuje cysteinové repetice následované kolagenovými repeticemi a lektinovou doménu, která váže řadu cukrů např. manózu, fruktózu, glukosu nebo N-acetylglukosamin (Turner, 2003). To umožňuje detekovat široké spektrum mikroorganismů (bakterie, viry, kvasinky, parazity).

MBL po ligaci aktivuje komplementový systém za pomoci MASP (MBL-associated serine protease) komplexů. Mimo to komplex MBL s navázaným patogenem se může rovnou vázat na fagocytární buňky prostřednictvím kolektinového receptoru a podpořit tak fagocytózu bez aktivace komplementu (Takahashi a Ezekowitz, 2005).

2.2.5.2 **Látky použité v bakalářské práci jako motivy PAMPs**

2.2.5.2.1 **Laminarin**

Laminarin je polysacharid složený z jednotek D-glukózy spojených $\beta(1, 3)$ -glykosidickou vazbou. Vyskytuje se v hnědých řasách (*Phaeophyceae*). Získávají se dvě formy laminarinu (nerozpustný ve vodě a ve vodě rozpustný). Nerozpustný laminarin se nejčastěji izoluje z *Laminaria clustoni*, rozpustný laminarin z *Laminaria digitalia* (Read a kol., 1996). Váže se na β -glukanový receptor Dectin-1 na povrchu leukocytů, zprostředkovává produkci TNF- α a aktivuje funkci leukocytů (Brown a kol., 2003).

2.2.5.2.2 **Manan**

Hlavní řetězec tohoto polysacharidu je složený z podjednotek D-manóz (případně manóz a glukóz) spojených $\beta(1, 4)$ -glykosidickou vazbou. Někdy může být substituován postranními řetězci $\alpha(1, 6)$ -galaktóz. Můžeme rozlišit manany lineární, galaktomanany, glukomanany a galaktoglukomanany (Moreira, 2008). Je vázán manózovým receptorem a sérovým lektinem vázajícím manózu. Můžeme ho nalézt v buněčné stěně vyšších rostlin nebo kvasinkách (Moreira, 2008; Cawley a Ballou, 1972).

2.2.5.2.3 **N-Formyl-methionyl-leucyl-fenylalanin (fMLF)**

N-formylové peptidy, mezi které patří i N-Formyl-methionyl-leucyl-fenylalanin (fMLF), jsou jedni z nejsilnějších chemoatraktantů fagocytárních lymfocytů a makrofágů

(Prossnitz a Ye, 1997). Jsou přítomné v grampozitivních i gramnegativních bakteriích. Vážou je formyl peptidové receptory (FRP1, FRP2), po jejichž aktivaci dochází ke zvýšení produkce kyslíkových radikálů, degranulaci granulocytárních cytotoxických vezikulů, stimulaci fagocytózy a chemotaxi buněk do místa zánětu (Sato a kol., 2012).

2.2.5.2.4 **Resiquimod (R-848)**

Imidazolový derivát resiquimod (také R-848) je syntetická molekula ligující u lidí TLR7 a TLR8, u myši pouze TLR7. Navázáním na příslušné Toll-like receptory aktivují dendritické buňky a makrofágy, zvyšují produkci TNF- α , IL-6, IFN- α . Tím se řadí mezi antivirové a protinádorové substance (Bowie, 2007).

2.2.5.2.5 **Kyselina lipoteichoová (LTA)**

Kyselina lipoteichoová (LTA) je součástí buněčných stěn grampozitivních bakterií (Ryu a kol., 2009). Funguje jako imunostimulační PAMPs rozeznávaný imunitním systémem TLR2 receptory. Vazba LTA na TLR2 aktivuje transkripční faktory NF- κ B (nukleární faktorr kappa B), který reguluje produkci prozánětlivých cytokinů a chemokinů, také hraje roli v aktivaci leukocytů (Lawrence, 2009).

2.2.5.2.6 **Limpet keyhole hemocyanin (KLH)**

Tento hemocyanin je respirační glykoprotein izolovaný z mořského plže *Megathura crenulata* (Swerdlow a kol., 1996). Existují dvě izoformy: KLH1 a KLH2. Patří mezi vysoce imunogenní molekuly. Využívá se jako proteinový nosič málo imunogenních nádorových antigenů (např.: ve vakcínách proti folikulárním lymfomům, melanomům, karcinomům prostaty). Indukuje odpověď Th1 buněk (Musselli a kol., 2001). Také stimuluje dozrávání dendritických buněk reakcí s manózoovým receptorem (Presicce a kol., 2008).

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

Poly I:C je syntetický analog dvouřetězcové RNA. Jedno vlákno tvoří polymer kyseliny inosinové, druhý tvoří polymer kyseliny cytidylové. Poly I:C je používán jako agonista TLR3 a RIG-1 receptorů. Aktivuje makrofágy, NK buňky,

B-lymfocyty (Qu a kol., 2002). Dále stimuluje uvolňování cytokinů IL-6 a IL-8. Aktivace TLR3 a RLR signalizací může také přímo vyvolat apoptózu některých nádorových buněk (Cheng a Xu, 2010).

3 CÍLE PRÁCE

- Ověření možnosti použití kotveného laminarinu a f-MLF v synergii s resiquimodem pro nádorovou imunoterapii.
- Možnost zesílení protinádorové terapie založené na R-848, Poly (I:C) a mananu-BAM.
- Ověření univerzálnosti terapie – studium imunoterapie na pankreatickém adenokarcinomu Panc02.
- Ověření možnosti použití LTA v aktivaci neutrofilů.

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Chemikálie

- BAM, *Biocompatible anchor for cell membranes* (NOF Europe)
- D-MEM, *Dulbecco's modified eagle medium* (Biowest)
- DMSO, *Dimethylsulfoxide* (Sigma-Aldrich)
- EDTA, *ethylenediaminetetraacetic acid* (Sigma-Aldrich)
- f-MLFKK, *N-formyl methionyl leucyl phenylalanine + lysine, lysine* (N-Schafer)
- FCS, *Fetal calf serum* (Biowest)
- GM-CSF, *Granulocyte-macrophage colony stimulating factor* (Sigma-Aldrich)
- KLH, *Keyhole limpet hemocyanin* (Enzo)
- Laminarin (Sigma-Aldrich)
- LTA, *Lipoteichoic acid from Bacillus subtilis* (Sigma-Aldrich)
- MACS Mouse Neutrophil Isolation Kit, (Miltenyi, Biotec)
- Manan (Sigma-Aldrich)
- PBS, *Phosphate buffered saline* (Sigma-Aldrich)
- Poly I:C, *Polyinosinic:polycytidylic acid* (Sigma-Aldrich)
- Resiquimod, *R-848* (Tocris)
- RPMI 1640 (Biowest)
- TNF α , *Tumor necrosis factor alfa* (Sigma-Aldrich)
- Trypanová modř (Sigma-Aldrich)
- Trypsin (Sigma-Aldrich)

4.2 Laboratorní myši

Ve všech experimentech byly použity samice kmene C57BL/6N z chovu Charles River Laboratories. K pokusům byly použity po dosažení 8 týdnů života a váhy 18-20 g. Chovány byly za standardních podmínek v místnosti se stálou teplotou 22 °C, relativní vzdušnou vlhkostí 65 % a fotoperiodou 12/12 hodin. Myši měly neomezený přístup ke sterilní vodě a granulované potravě.

4.3 Nádorové buněčné linie

V pokusech byly použity 2 typy nádorových buněčných linií. Myší melanom B16-F10 zakoupen u American Type Culture Collection a pankreatický adenokarcinom Pan02, který byl darem Larse Iva Pardeckla (University of Greifswald).

Buňky melanomu B16-F10 byly kultivovány v RPMI 1640 s přidavkem 10% FCS, 1 % antibiotik, 1 % glutaminu a 0,1 % merkaptotetanu při teplotě 37 °C v atmosféře nasycené vodními parami a 5 % CO₂.

Buňky pankreatického adenokarcinomu Panc02 byly kultivovány v D-MEM s přidavkem 10 % FCS, 1 % antibiotik a 1 % glutaminu při teplotě 37 °C v atmosféře nasycené vodními parami a 5 % CO₂.

4.4 Příprava nádorových buněk pro transplantaci a *in vitro* použití

Narostlá linie buněk B16-F10 byla zbavena kultivačního média a třikrát šetrně promyta sterilním pufovaným fyziologickým roztokem (PBS). K uvolnění adheovaných buněk byla provedena trypsinizace směsí 0,25% trypsinu a 0,02% EDTA v PBS po dobu dvou minut, a sice v termostatu při teplotě 37 °C. Trypsinizační proces byl zastaven přidavkem RPMI 1640 s 10% FCS. Následně byly buňky rozsuspendovány pomocí Pasteurovy pipety a spočítány. Aktuální koncentrace byla počítána v Bürkerově komůrce. K rozlišení mrtvých buněk od živých byla použita trypanová modř, a to v poměru 1:1. Následně byla suspenze centrifugována (5 minut, při teplotě 4 °C, 160 g). Po slítí supernatantu byl pelet šetrně rozsuspendován a naředěn pomocí RPMI 1640 bez séra na požadovanou koncentraci.

Při kultivaci a zpracování nádorových buněk Panc02 bylo místo RPMI 1640 použito D-MEM, vše ostatní probíhalo za stejných podmínek jako v případě buněk melanomových.

4.5 Transplantace nádorových buněk

Transplantace nádorových buněk byla prováděna subkutánně do předem vyholené pravé části zad myši.

Melanomové buňky B16-F10 byly injikovány v množství 4×10^5 v 0,1 ml RPMI 1640 bez séra na myš.

Nádorové buňky Panc02 byly transplantovány v množství 5×10^5 v 0,1 ml D-MEM bez séra na myš.

4.6 Příprava neutrofilů pro *in vitro* použití

4.6.1 Izolace buněk z kostní dřeně myši

Myším usmrčenými stržením vazů byla stažena kůže z dolních končetin. Následně byly končetiny odděleny od těla a kosti zbaveny veškeré svaloviny. S kostmi se zacházelo šetrně tak, aby nedošlo k jejich poškození, a tím ke kontaminaci kostní dřeně. Kostí zbavené svaloviny byly vloženy do RPMI bez séra. Následovalo sterilní odstříhnutí kloubních hlavic kostí a vytlačení kostní dřeně za pomoci stříkačky s 26 G jehlou do čistého RPMI bez séra. Získaná kostní dřeň byla rozsuspendována v RPMI bez séra pipetou a přefiltrována přes BD filtr do centrifugační zkumavky. Buňky byly spočítány v Bürkerově komůrce za pomoci trypanové modři a centrifugovány (10 minut, 4 °C, 160 g).

4.6.2 Magnetická separace

Ke stočeným buňkám získaných dle předchozího postupu byl přidán MACS pufr (PBS + 2% FCS + 2mM EDTA) v množství 200 μ l na každých 5×10^7 buněk. Následně bylo ke směsi přidáno 50 μ l (na každých 5×10^7 buněk) primární protilátky (*MACS Neutrofil isolation kit mouse, Myltenyi Biotec*) a nechala se inkubovat 10 minut v lednici. Po uplynutí inkubační doby byly buňky promyty MACS pufr (5-10 ml na 5×10^7 buněk), poté centrifugovány (10 min, 160 g). Stočený pelet byl rozsuspendován v pufru (400 μ l na 5×10^7 buněk) a bylo přidáno 100 μ l (na 50×10^7 buněk) sekundární protilátky (*MACS Neutrofil isolation kit mouse, Myltenyi Biotec*). Následovala inkubace v lednici (15 min). Po uplynutí 15 minut byly buňky opět promyty 5-10 ml MACS pufru na každých 5×10^7 buněk a stočeny (10 min, 160 g).

Samotná separace neutrofilů byla provedena pomocí Midi MACS separátoru a magnetické separační kolonky (*Myltenyi Biotec*). Kolonka umístěná na separátoru byla nejdříve propláchnuta 3 ml MACS pufru. Poté se do kolonky nalila suspenze buněk a propláchnula 3 x 3 ml pufru. Proteklý pufr, jež byl sbírán do centrifugační zkumavky, obsahoval vyseparované neutrofilů. Suspenze neutrofilů byla opět centrifugována (10 min, 160 g),

převedená do RPMI 1640 s 10% FCS, spočítána pomocí Bürkerovy komůrky a naředěna na požadovanou koncentraci.

4.6.3 Priming neutrofilů

Neutrofilů v RPMI 1640 s 10% FCS byly primovány dvěma typy primingů: LTA (výsledná koncentrace 0,05 mg/ml) a směsí cytokinů TNF α (2,5 ng/ml) s GM-CSF (12 ng/ml). Inkubace při teplotě 37 °C v 5% CO₂ trvala 20 min.

4.7 Měření a výpočet velikosti nádorů

Velikosti nádorů byly během léčby měřeny za pomoci kaliperu každý druhý den, po ukončení léčby jednou týdně. Měřen byl vždy největší rozměr (A) a nejmenší rozměr (B) v milimetrech. Objemy byly vypočítány podle vzorce $V = \pi/6 AB^2$ (Inaba a kol., 1986).

4.8 Počítání plicních metastáz melanomu B16-F10

Myším předem usmrcenými stržením vazů byly vypitvány plíce a vloženy do Petriho misky s RPMI. Plíce byly ihned prohlíženy pod binokulární lupou, pod kterou byla spočítána všechna metastatická ložiska (černé tečky v jinak růžové plicní tkáni).

Ze zjištěných hodnot byl vypočten průměrný počet metastáz na jednu myš (pro myši léčené stejnou terapií), a to podle vzorce:
$$\frac{\text{celkový počet metastáz všech myší stejné skupiny}}{\text{počet myší ve skupině}}$$

Dále byla vypočtena prevalence:
$$\frac{\text{počet myší stejné skupiny s metastázami}}{\text{počet myší ve skupině}}$$

4.9 Statistické vyhodnocení výsledků

Data získaná z experimentů byla vyhodnocena pomocí programů Statistica 12 (ANOVA) a MS Excel. V grafech je použita střední chyba průměru (SEM).

4.10 Příprava terapeutických látek

4.10.1 Syntéza laminarinu-BAM

Při přípravě laminarinu-BAM byla nejprve provedena pětidenní redukce laminarinu kyanoborohydridem sodným za přítomnosti octanu amonného při teplotě 50 °C a pH 7,5. Vzniklý roztok byl přes noc podroben dialýze proti PBS po dobu 12 hodin přes dialyzační membránu (MWCO 3500, Serva). Samotná vazba molekuly BAM (její N-hydroxysuccinimidové skupiny) na aminoskupinu laminarinu probíhala při pH 7,3 během dvouhodinové inkubační doby (při pokojové teplotě). Získaný roztok (v PBS) byl až do použití skladován při teplotě -20 °C. (Janotová a kol., 2014)

4.10.2 Syntéza mananu-BAM

Příprava mananu-BAM probíhala stejně jako v případě syntézy laminarinu-BAM (viz kapitola 4.10.1), redukční aminace mananu, dialýza proti PBS a následná vazba molekuly BAM na aminoskupinu mananu. Skladování při teplotě -20 °C.

4.10.3 Syntéza f-MLFKK-BAM

Molekula BAM byla vázána na f-FMLFKK v prostředí o pH 7,3 a pokojové teplotě. V průběhu jedné hodiny došlo ke zreagování N-hydroxysuccinimidové skupiny molekuly BAM s ϵ -aminoskupinou lysinu na molekule f-FMLFKK. Získaný roztok v PBS byl skladován za teploty -20 °C (Janotová a kol., 2014).

4.10.4 Syntéza R-848.HCl

Resiquimod.HCl byl připraven smícháním R-848 s ekvivalentem 3,5% HCl. HCl se na resiquimod váže z důvodu zvýšení rozpustnosti R-848 ve vodě.

4.11 Experimenty

4.11.1 Pulzní terapie melanomu B16-F10 pomocí R-848.HCl, laminarinu-BAM a jejich kombinací.

Pokus byl proveden na 24 myších, které byly rozděleny do 4 skupin po 6 podle druhu terapeutika (viz Tab. I). Myším bylo transplantováno 4×10^5 melanomových buněk. Léčba byla započata dvanáctý den po transplantaci (den 0). Ve dnech 0, 1, 2, 8, 9, 10, 16, 17, 18, 24, 25 a 26 jim bylo intratumorálně injikováno 50 μ l terapeutické látky. Měření nádorů bylo prováděno vždy každý druhý den před aplikací léčby. Po ukončení léčby (tj. 30. den) byly myši usmrceny a byla provedena analýza plicních metastáz.

Tab. I: Rozdělení myší do skupin dle terapeutické látky.

Skupina	Terapeutikum
A	0,2 mM laminarin-BAM v PBS
B	0,5 mg resiquimodu.HCl/ml PBS
C	0,5 mg resiquimodu.HCl /ml 0,2 mM laminarinu-BAM v PBS
K	PBS

4.11.2 Pulzní terapie melanomu B16-F10 pomocí R-848.HCl, f-MLFKK-BAM a jejich kombinací.

Experiment byl proveden podle stejného schéma jako předchozí experiment (viz kapitola 4.11.1). Myši byly rozděleny do 4 skupin po 6 podle druhu terapeutika (Tab. II). Dvanáctý den po transplantaci byla zahájena léčba (den 0). Aplikace terapeutické látky byly provedeny ve dnech: 0, 1, 2, 8, 9, 10, 16, 17, 18, 24, 25 a 26. Měření nádorů probíhalo každý druhý den. Po ukončení léčby (30. den) byly myši usmrceny a byla provedena analýza plicních metastáz.

Tab. II: Rozdělení myší do skupin dle terapeutické látky.

Skupina	Terapeutikum
A	0,5 mM f-MLF-BAM v PBS
B	0,5 mg resiquimodu.HCl/ml PBS
C	0,5 mg resiquimodu.HCl /ml 0,5 mM f-MLF-BAM v PBS
K	PBS

4.11.3 Pulzní terapie melanomu B16-F10 směsí R-848.HCl + POLY I:C + manan-BAM v kombinaci s KLH nebo LTA.

V tomto experimentu bylo použito 24 myší, které byly rozděleny do 4 skupin po 6 podle druhu terapeutika (viz Tab. III). Myším bylo transplantováno 4×10^5 melanomových buněk. Léčba byla započata dvanáctý den po transplantaci (den 0). Ve dnech 0, 1, 2, 8, 9, 10, 16, 17, 18, 24, 25 a 26 jim bylo intratumorálně injektováno 50 μ l terapeutické látky. Měření nádorů probíhalo každý druhý den od začátku terapie (den 0) až do ukončení terapie (den 30) vždy před aplikací léčby. Po ukončení léčby bylo jednou týdně kontrolováno přežívání myší až do stého dne. Přeživším myším bylo sto dvacátý den od započetí terapie retransplantováno na stejné místo stejné množství tj. 4×10^5 melanomových buněk. Myši byly kontrolovány 14., 21. a 29. den od retransplantace.

Tab. III: Rozdělení myší do skupin dle terapeutické látky.

Skupina	Terapeutikum
A	0,5 mg R-848.HCl + 0,5 mg Poly I:C + 0,5mg KLH/ml 0,2 mM mananu-BAM v PBS
B	0,5 mg R-848.HCl + 0,5 mg Poly I:C + 0,5 mg LTA/ml 0,2 mM manan-BAM
C	0,5 mg R-848.HCl + 0,5 mg Poly I:C/ml 0,2 mM manan-BAM
K	PBS

4.11.4 Pulzní terapie pankreatické adenokarcinomu Panc02 pomocí mananu kotveného BAM, směsí R-848.HCl + POLY I:C + LTA a jejich kombinací.

Experiment byl proveden na 24 myších, které byly rozděleny do 4 skupin po 6 podle druhu terapeutika (Tab. IV). Myším bylo transplantováno 5×10^5 buněk linie Panc02. Léčba byla započata dvanáctý den po transplantaci (den 0). Ve dnech 0, 1, 2, 8, 9, 10, 16, 17, 18, 24, 25 a 26 jim bylo intratumorálně injektováno 50 μ l terapeutické látky. Měření nádorů bylo prováděno vždy každý druhý před aplikací léčby až do třicátého dne od zahájení terapie.

Tab. IV: Rozdělení myší do skupin dle terapeutické látky.

Skupina	Terapeutikum
A	0,5 mg R-848.HCl + 0,5 mg Poly I:C + 0,5 mg LTA/ml 0,2 mM manan-BAM v PBS
B	0,5 mg R-848.HCl + 0,5 mg Poly I:C + 0,5 mg LTA/ml v PBS
C	0,2 mM manan-BAM v PBS
K	PBS

4.11.5 Pozorování cytotoxického efektu neutrofilů aktivovaných LTA nebo GM-CSF + TNF α na melanomové buňky značené f-MLF α -BAM. *In vitro* experiment.

Pro pokus byly použity nádorové buňky B16-F10 a dvě myši kmene C57BL/6N. Myši byly usmrceny a z jejich kostní dřeně byly vyizolovány neutrofilů. Neutrofilů byly přečištěny magnetickou separací a naředěny na koncentraci 2,5 milionů buněk na 1 ml. Melanomové buňky byly ošetřeny podle kapitoly 4.4 a naředěny na koncentraci 1 milion buněk na 1 ml. Následně byl připraven roztok ligandu (0,1 mM f-MLF α -BAM v RPMI s 10% FCS).

Suspenze melanomových buněk byla napipetována do mikrotitrační destičky s „U“ dnem v množství 100 μ l na jamku (tj. 10^5 buněk na jamku). Do jamek k nádorovým buňkám bylo přidáno 100 μ l ligandu (výsledná koncentrace byla 0,05 mM f-MLF-BAM v RPMI s 10% FCS), případně medium (v kontrolních skupinách). Kombinace nádorových buněk a ligandu je znázorněna v tabulce V. Pro navázání ligandu na nádorové buňky byla destička 30 minut inkubována v termostatu (37 °C, 5 % CO₂). Po ukončení inkubace byla destička centrifugována (2 min, 4 °C, 424 g) a supernatant opatrně, ale důkladně odsát. Všechny jamky byly promyty 200 μ l RPMI s 10% FCS, destička opět centrifugována (2 min, 4 °C, 424 g) a supernatant kompletně odsát.

V době inkubace destičky probíhal priming neutrofilů (kapitola 4.6.3). Naprimované neutrofilů byly v množství 200 μ l na jamku (5×10^5 neutrofilů na jamku) napipetovány do příslušných jamek k nádorovým buňkám a ligandům (viz Tab. V). Poté byla destička ponechána inkubaci (2 h, 37 °C, 5% CO₂).

Ve všech experimentálních skupinách bylo po 3 jamkách.

Po uplynutí inkubační doby byly pomocí Trypanové modři spočítány živé nádorové buňky.

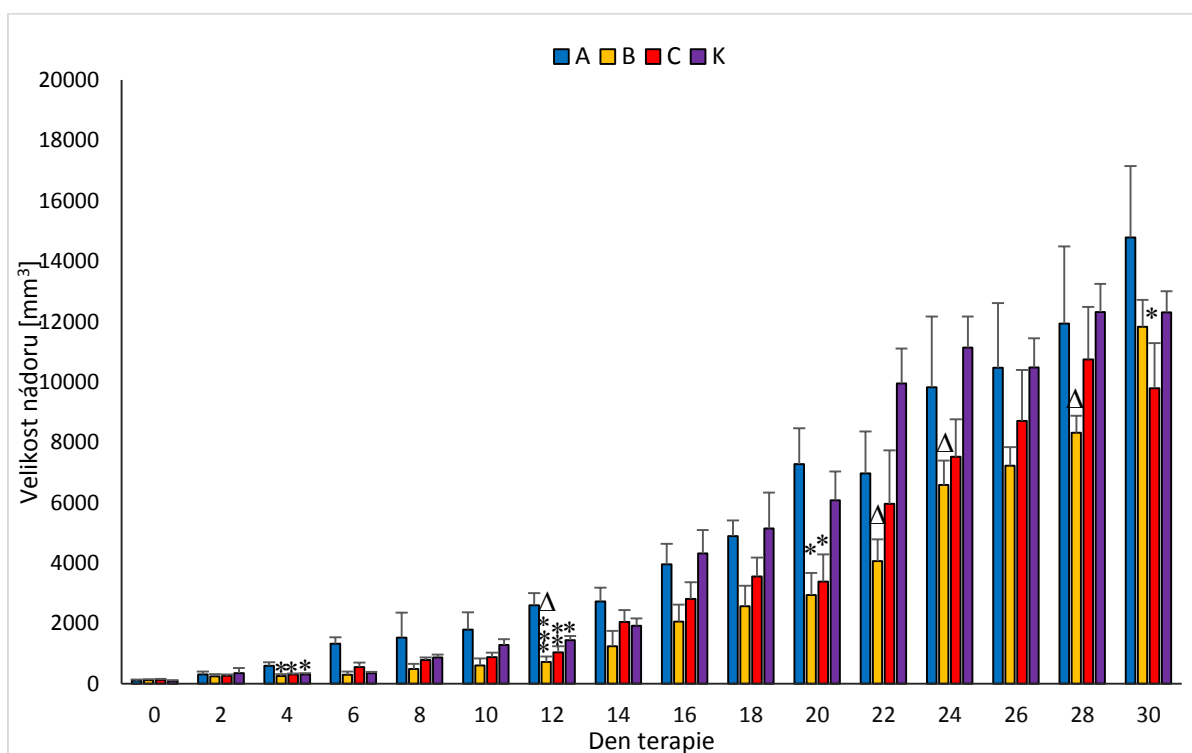
Tab. V: Kombinace nádorových buněk, ligandu a různě primovaných neutrofilů ve skupinách.

Skupina	Obsah jamky
I.	B16-F10 + f-MLF α -BAM
II.	B16-F10 + f-MLF α -BAM + neutrofilů primované GM-CSF a TNF α
III.	B16-F10 + neutrofilů primované GM-CSF a TNF α
IV.	B16-F10 + f-MLF α -BAM + neutrofilů primované LTA
V.	B16-F10 + neutrofilů primované LTA
VI.	B16-F10 + f-MLF α -BAM + nenaprimované neutrofilů

5 VÝSLEDKY

5.1.1 Pulzní terapie melanomu B16-F10 pomocí R-848.HCl, laminarinu-BAM a jejich kombinací.

Cílem tohoto pokusu bylo srovnání účinku samotného laminarinu kotveného BAM a laminarinu-BAM v kombinaci s R-848.HCl na redukci nádorového růstu. Z grafu (Obr. 2) je patrné, že samotný laminarin-BAM (skupina A, modrá barva) neměl na redukci nádorového růstu žádný vliv. Ve spojení s resiquimodem (skupina C, červená barva) pozorujeme mírné zpomalení růstu nádorů.

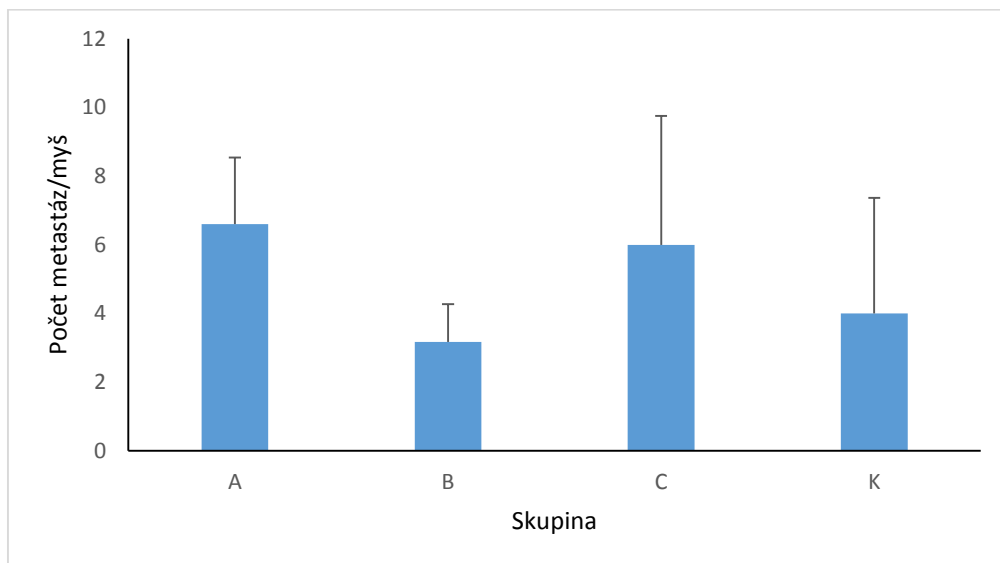


Obr. 2: Vliv kotveného laminarinu ve spojení s resiquimodem na redukci nádorového růstu.

A – 0,2 mM laminarin-BAM v PBS, **B** – 0,5 mg resiquimodu.HCl/ml PBS, **C** – 0,5 mg resiquimodu.HCl /ml 0,2 mM laminarinu-BAM v PBS, **K** – PBS

* $P \leq 0,05$ vzhledem ke skupině A, ** $P \leq 0,001$ vzhledem ke skupině A, *** $P \leq 0,0005$ vzhledem ke skupině A, $\Delta P \leq 0,05$ vzhledem ke skupině K

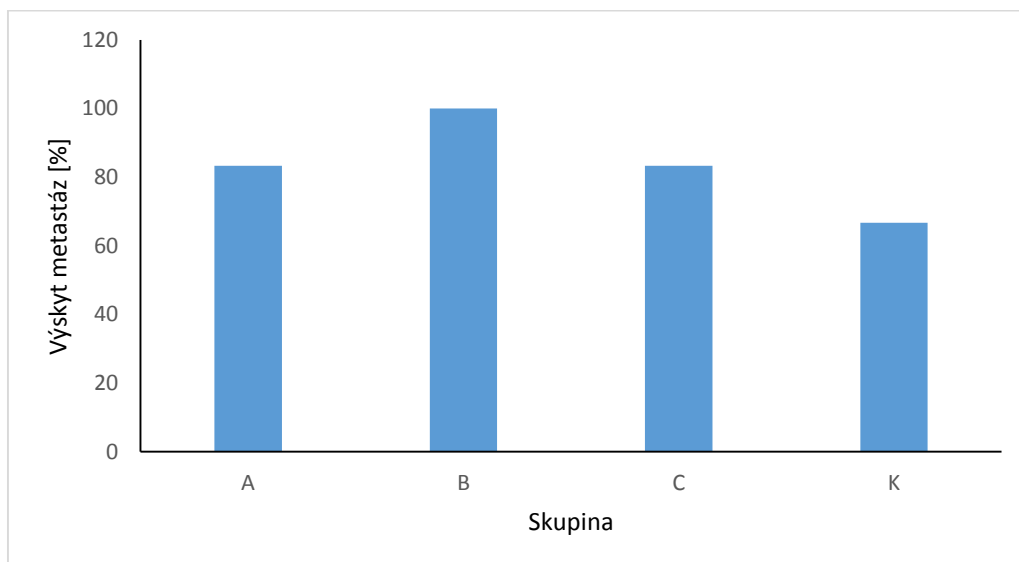
Z obrázku 3 je patrné, že ani laminarin-BAM samotný ani ve spojení resiquimodem neměli žádný vliv na snížení výskytu metastáz.



Obr. 3: Vliv kotveného laminarinu ve spojení s resiquimodem na průměrný počet metastáz.

A – 0,2 mM laminarin-BAM v PBS, **B** – 0,5 mg resiquimodu.HCl/ml PBS, **C** – 0,5 mg resiquimodu.HCl /ml 0,2 mM laminarinu-BAM v PBS, **K** – PBS

Obrázek 4 znázorňuje procentuální výskyt metastáz u myši v jednotlivých skupinách.

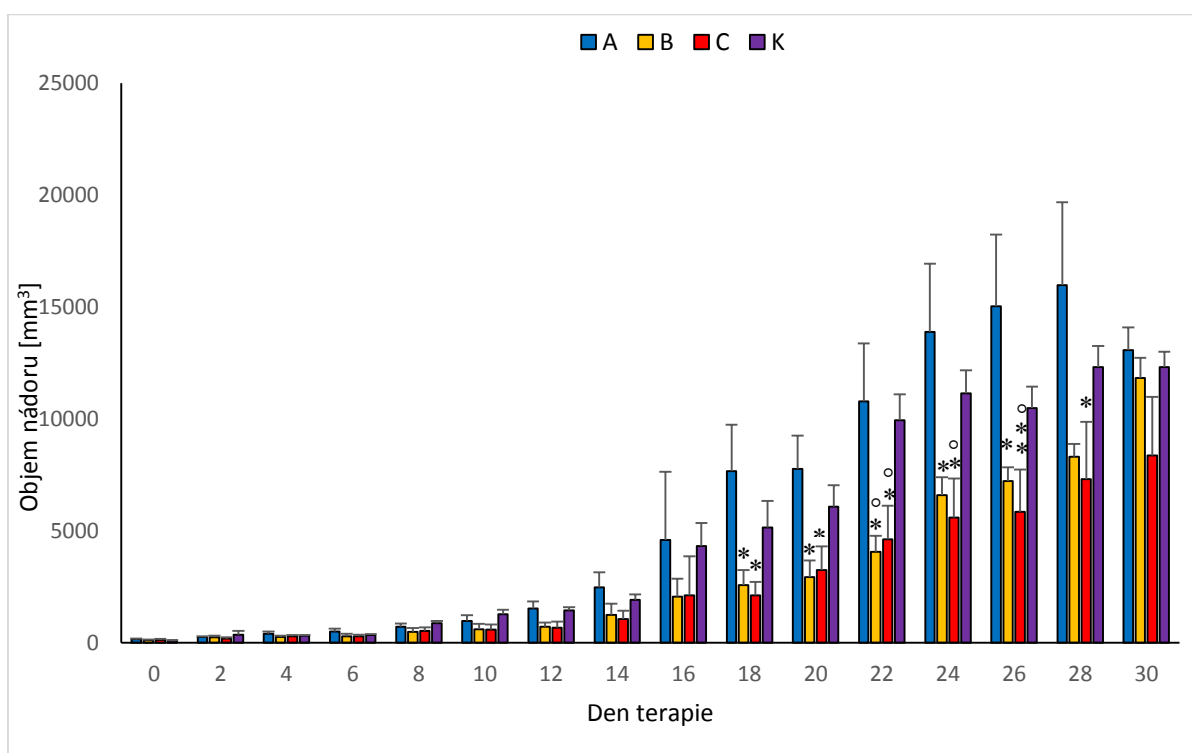


Obr. 4: Vliv kotveného laminarinu ve spojení s resiquimodem na prevalenci metastáz.

A – 0,2 mM laminarin-BAM v PBS, **B** – 0,5 mg resiquimodu.HCl/ml PBS, **C** – 0,5 mg resiquimodu.HCl /ml 0,2 mM laminarinu-BAM v PBS, **K** – PBS

5.1.2 Pulzní terapie melanomu B16-F10 pomocí R-848.HCl, f-MLFKK-BAM a jejich kombinací.

Cílem tohoto experimentu bylo srovnat účinek samotného f-MLFKK kotveného BAM a f-MLFKK-BAM v kombinaci s R-848.HCl na redukci nádorového růstu. Z grafu (Obr. 5) je patrné, že samotný f-MLFKK-BAM (skupina A, modrá barva) neměl na redukci nádorového růstu žádný vliv, dokonce měl horší výsledky než kontrola (skupina K, fialová barva). Ve spojení s resiquimodem (skupina C, červená barva) pozorujeme statisticky významné zpomalení nádorového růstu oproti kontrole.

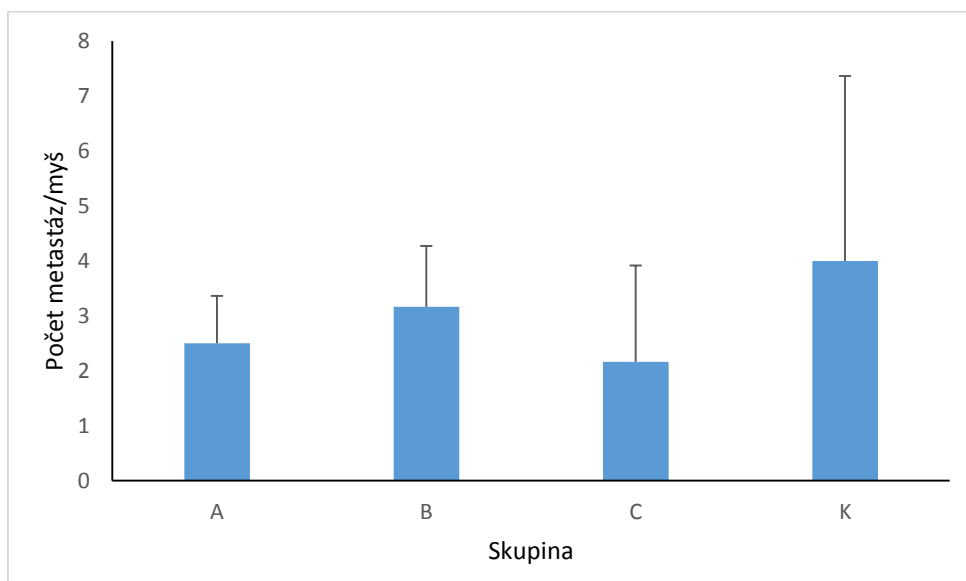


Obr. 5: Obr. 1: Vliv kotveného f-MLFKK ve spojení s resiquimodem na redukci nádorového růstu.

A – 0,5 mM f-MLF-BAM v PBS, **B** – 0,5 mg resiquimodu.HCl/ml PBS, **C** - 0,5 mg resiquimodu.HCl /ml 0,5 mM f-MLF-BAM v PBS, **K** – PBS

* $p \leq 0,05$ vzhledem ke skupině A, ** $p \leq 0,01$ vzhledem ke skupině A, ° $p \leq 0,05$ vzhledem ke skupině K

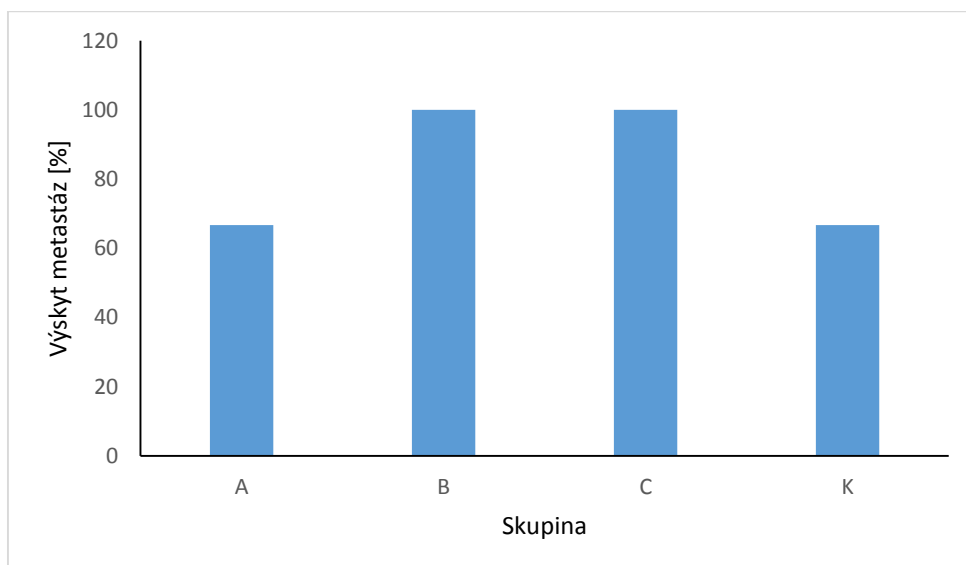
Z grafu na obrázku 6 je patrné, tato terapie neměla statisticky významný vliv na redukci metastazování.



Obr. 6: Vliv kotveného f-FMLFKK ve spojení s resiquimodem na průměrný počet metastáz.

A – 0,5 mM f-MLF-BAM v PBS, **B** – 0,5 mg resiquimodu.HCl/ml PBS, **C** - 0,5 mg resiquimodu.HCl /ml 0,5 mM f-MLF-BAM v PBS, **K** – PBS

Na obrázku 7 je znázorněn procentuální výskyt metastáz u myši v jednotlivých skupinách.

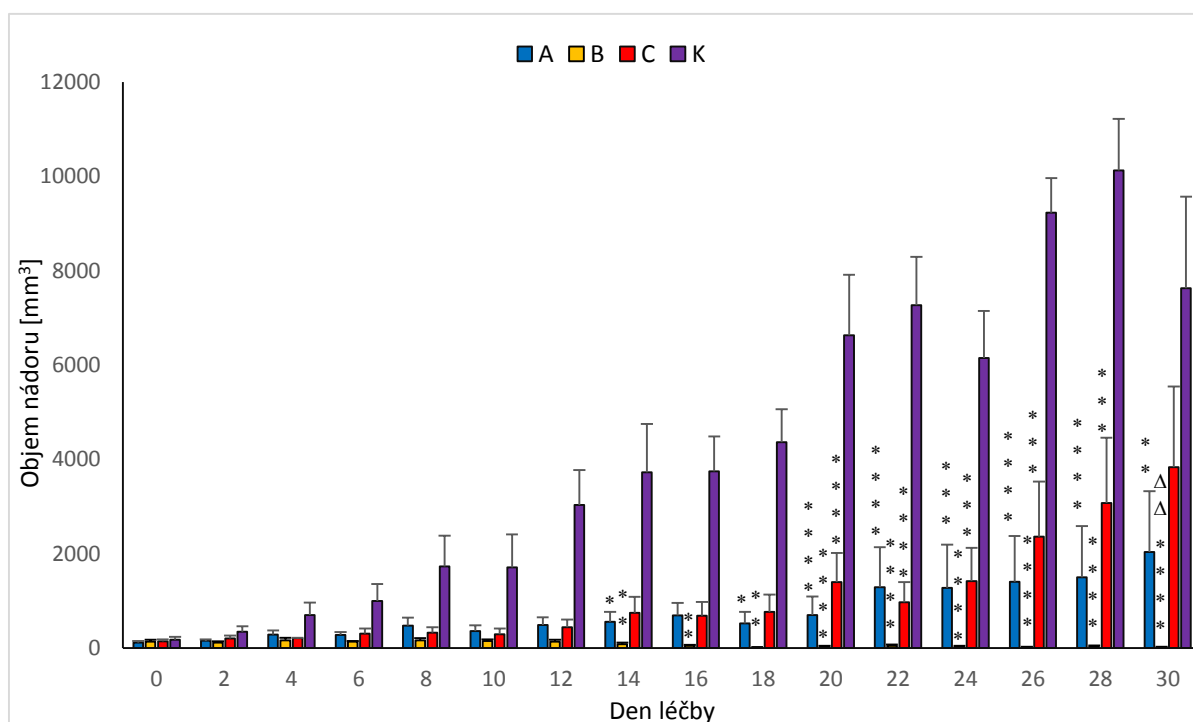


Obr. 7: Vliv kotveného f-MLFKK ve spojení s resiquimodem na prevalenci metastáz.

A – 0,5 mM f-MLF-BAM v PBS, **B** – 0,5 mg resiquimodu.HCl/ml PBS, **C** - 0,5 mg resiquimodu.HCl /ml 0,5 mM f-MLF-BAM v PBS, **K** – PBS

5.1.3 Pulzní terapie melanomu B16-F10 směsí R-848.HCl + POLY I:C + manan-BAM v kombinaci s KLH nebo LTA.

Cílem pokusu bylo zjistit účinky LTA a KLH ve směsi s R-848.HCl + POLY I:C + manan-BAM. Jak lze vyčíst z obrázku 8 terapie obohacená o KLH (skupina A, modrá barva) měla statisticky signifikantní pokles nádorového růstu oproti kontrole. Avšak terapie obohacená o LTA (skupina B, žlutá barva) způsobila téměř úplné vymizení nádorové masy myši.



Obr. 8: Vliv terapie založené na R-848.HCl + POLY I:C + manan-BAM v kombinaci s KLH a LTA.

A - 0,5 mg R-848.HCl + 0,5 mg Poly I:C + 0,5mg KLH/ml 0,2 mM mananu-BAM v PBS,

B - 0,5 mg R-848.HCl + 0,5 mg Poly I:C + 0,5 mg LTA/ml 0,2 mM manan-BAM,

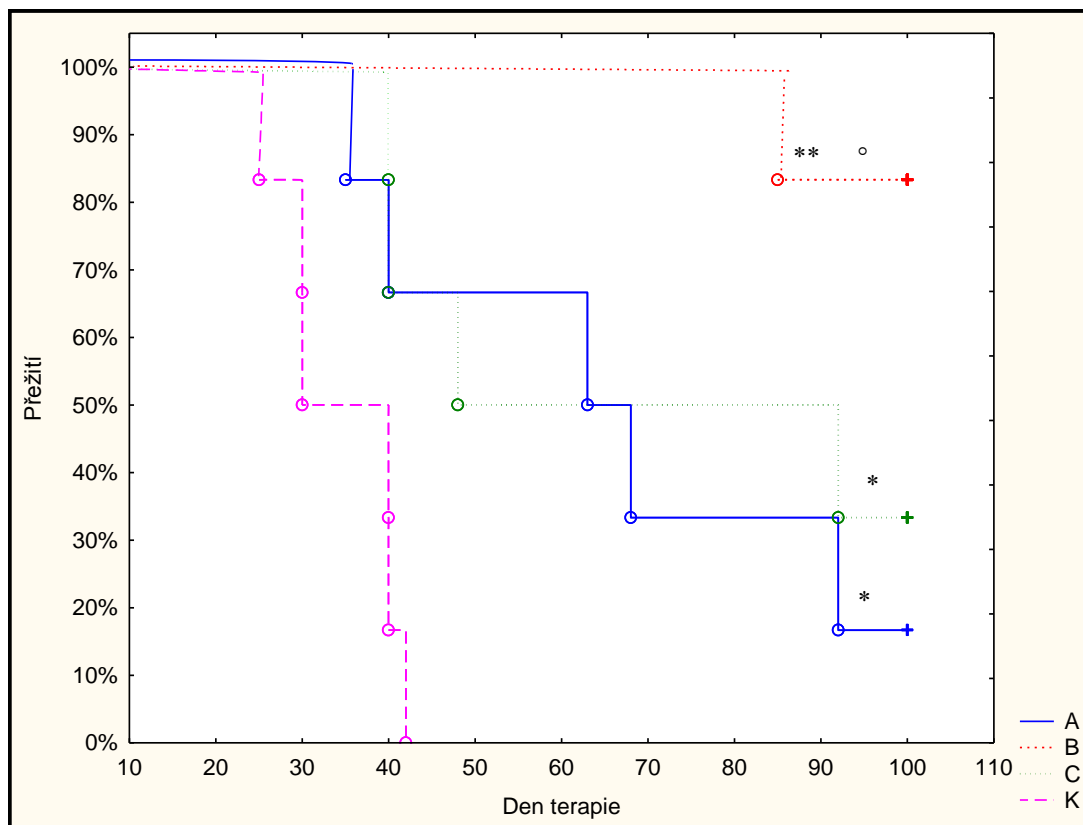
C - 0,5 mg R-848.HCl + 0,5 mg Poly I:C/ml 0,2 mM manan-BAM, **K** - PBS

* $p \leq 0,05$ vzhledem ke skupině K, ** $p \leq 0,01$ vzhledem ke skupině K, *** $p \leq 0,005$ vzhledem ke skupině K,

**** $p \leq 0,0005$ vzhledem ke skupině K, $\Delta\Delta$ $p \leq 0,01$ vzhledem ke skupině C

U myši byla dále sledována délka přežití (viz Obr. 9). Z grafu je zřejmé, že nejvýraznější vliv na prodloužení doby přežití měla terapie obohacená o LTA (skupina B, červená barva). U této skupiny přežilo pozorovanou hranici 100 dní 5 myši. Naopak u skupiny

s R-848.HCl + Poly I:C + mannan-BAM ve směsi s KLH (skupina A, modrá barva) přežila pozorovanou hranici pouze 1 myš. Ve skupině pouze s R-848.HCl + Poly I:C + mannan-BAM přežily pozorovanou hranici 2 myši. V kontrolní skupině se 100 dní nedožila žádná myš.



Obr. 9: Vliv terapie založené na R-848.HCl + Poly I:C + mannan-BAM ve směsi s LTA a KLH na přežívání myši.

A - 0,5 mg R-848.HCl + 0,5 mg Poly I:C + 0,5mg KLH/ml 0,2 mM mannanu-BAM v PBS,

B - 0,5 mg R-848.HCl + 0,5 mg Poly I:C + 0,5 mg LTA/ml 0,2 mM mannan-BAM,

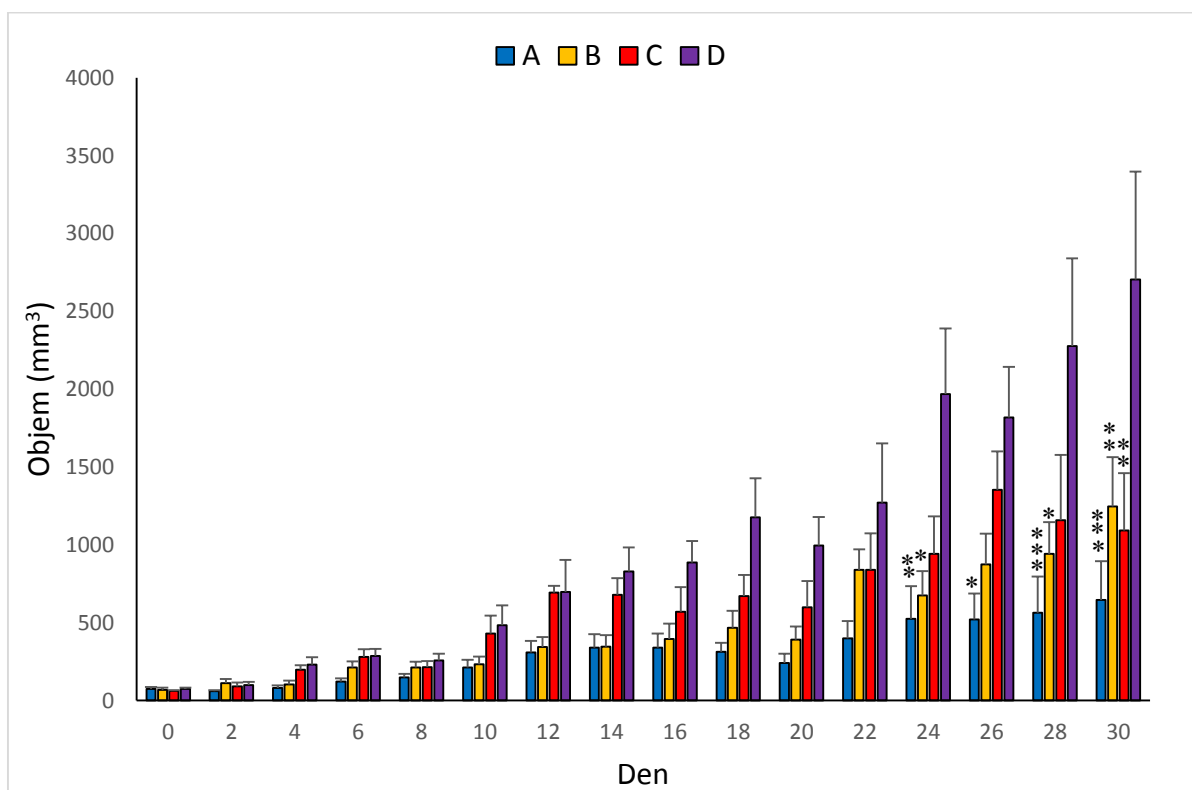
C - 0,5 mg R-848.HCl + 0,5 mg Poly I:C/ml 0,2 mM mannan-BAM, **K** - PBS

* $p \leq 0,05$ vzhledem ke skupině K, ** $p \leq 0,005$ vzhledem ke skupině K, ° $p \leq 0,05$ vzhledem ke skupině C

V experimentu přežilo hranici 100 dní celkem 8 myši (1 myš ze skupiny A, 5 myši skupiny B a 2 myši ze skupiny C). Těmto myším byly 120. den od započetí terapie retransplantovány nádorové buňky B16-F10. Nádory nevznikly u žádné myši.

5.1.4 Pulzní terapie pankreatického adenokarcinomu Panc02 pomocí mananu kotveného BAM, směsí R-848.HCl + POLY I:C + LTA a jejich kombinací.

U tohoto experimentu se sledoval vliv terapie založené na R-848.HCl + POLY I:C + LTA + manan-BAM na redukci růstu pankreatického adenokarcinomu. Z obrázku 10 je patrné, že použití této terapie (skupina A, modrá barva) mělo již od dvacátého čtvrtého dne statisticky významný vliv na redukci růstu buněčné hmoty nádorů.



Obr. 10: Vliv terapie založené na R-848.HCl + POLY I:C +LTA + manan-BAM na redukci nádorového růstu.

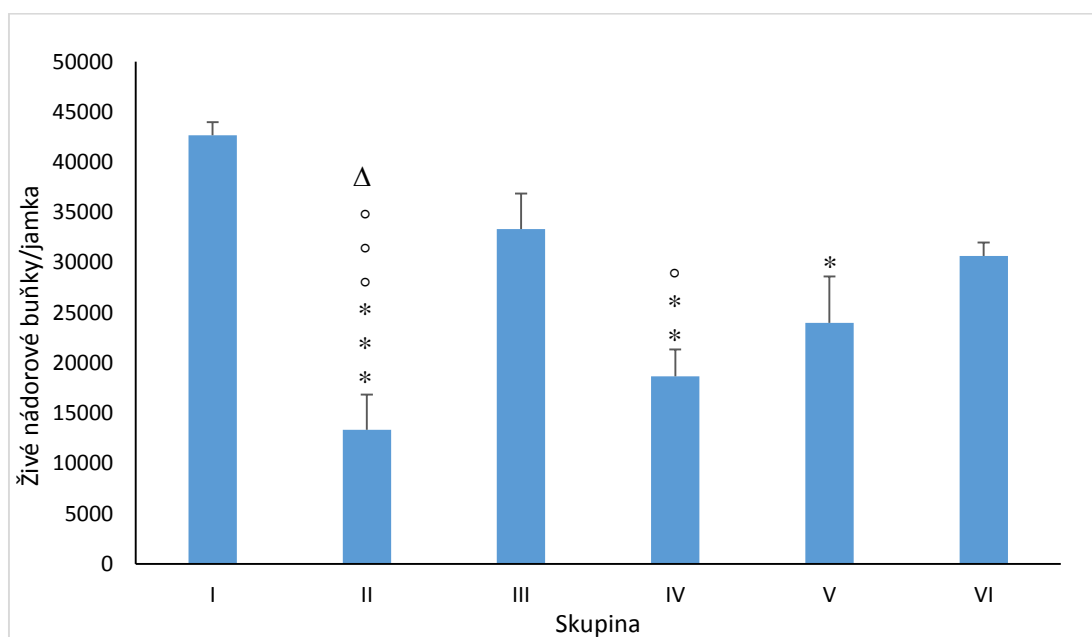
A - 0,5 mg R-848.HCl + 0,5 mg POLY I:C + 0,5 mg LTA/ml 0,2 mM manan-BAM v PBS,
B - 0,5 mg R-848.HCl + 0,5 mg POLY I:C + 0,5 mg LTA/ml v PBS, **C** - 0,2 mM manan-BAM v PBS, **K** – PBS

* $P \leq 0,05$ vzhledem ke skupině K, ** $P \leq 0,005$ vzhledem ke skupině K, *** $P \leq 0,0005$ vzhledem ke skupině K

5.1.5 Pozorování cytotoxického efektu neutrofilů aktivovaných LTA nebo GM-CSF + TNF α na melanomové buňky značené f-MLFKK-BAM. *In vitro* experiment.

V tomto experimentu byl studován vliv neutrofilů aktivovaných různými typy primingů na melanomové buňky v závislosti na přítomnosti ligandu stimulujícího fagocytózu. Výsledky pokusu jsou shrnuty na obrázku 11. Jak je patrné z obrázku, stimulované neutrofilily vykazovaly větší cytotoxický efekt než neutrofilily neaktivované. Pokud byly nádorové buňky značené f-MLFKK-BAM, byla cytotoxicita aktivovaných neutrofilů zvýšena.

Statisticky nejvýznamnější cytotoxický efekt vykazovaly neutrofilily stimulované směsí cytokinů GM-CSF a TNF α , a to na nádorové buňky značené f-MLFKK-BAM (skupina II) Neutrofilily stimulované LTA působily na nádorové buňky značené f-MLFKK-BAM (skupina IV) méně cytotoxicky než směs cytokinů, přesto statisticky velmi významně.



Obr. 11: Cytotoxické působení různě aktivovaných neutrofilů na nádorové buňky.

I - B16-F10 + f-MLFKK-BAM, **II** - B16-F10 + f-MLFKK-BAM + neutrofilily primované GM-CSF a TNF α , **III** - B16-F10 + neutrofilily primované GM-CSF a TNF α , **IV** - B16-F10 + f-MLFKK-BAM + neutrofilily primované LTA, **V** - B16-F10 + neutrofilily primované LTA, **VI** - B16-F10 + f-MLFKK-BAM + nenaprimované neutrofilily

* $P \leq 0,05$ vzhledem ke skupině I, *** $P \leq 0,001$ vzhledem ke skupině I, ° $P \leq 0,05$ vzhledem ke skupině III, °° $P \leq 0,001$ vzhledem ke skupině III, Δ $P \leq 0,05$ vzhledem ke skupině VI

6 DISKUSE

Imunoterapie se díky možnosti využití mechanismů vlastních lidskému organismu a specifického zacílení na nádorové buňky jeví jako vhodná a šetrnější alternativa dusud používané chemoterapie a radiologie. Tato bakalářská práce v návaznosti na předchozí práce vedené RNDr. Janem Ženkou, Csc. snaží přispět v oblasti terapie nádorů stimulací nespecifické imunity.

Bylo zjištěno, že k nejsilnější nespecifické odpovědi dochází při současném použití TLR ligandů a ligandů stimulujících fagocytózu (Underhill a Ganter, 2004). Významným TLR agonistou se ukázal LPS (lipopolysacharid), jež vykazoval výraznou redukci nádorového růstu v synergii s ligandy stimulujícími fagocytózu kotvenými na nádorové buňky, a to hlavně s f-MLF, laminarinem a mananem (Janotová a kol., 2014). Ovšem LPS, hlavní složka vnější membrány gramnegativních bakterií, je pro člověka toxický (Pålsson-McDermott a O'Neill, 2004). Nastala tedy otázka, čím zmíněný LPS nahradit. V pracích Švecové (Švecová, 2013) a Glaserové (Glaserová, 2015) byla diskutována náhrada LPS za MPLA (monofosforyl lipid A), v práci Husníkové (Husníková, 2014) se řešila možnost náhrady LPS β -glukanem a kolegyně Jačková (Jačková, 2015) studovala možnost náhrady LPS imiquimodem. Ovšem MPLA, β -glukan ani imiquimod nevykazovali dostatečný efekt. Jako vhodná náhrada se nakonec prokázal resiquimod v synergické kombinaci s kotveným mananem (Kumžáková, 2015). Jelikož je manan rozeznáván MBL, který zhruba u 10 % populace chybí (Kilpatrick, 2002), je tato práce zaměřena na zjištění synergických kombinací resiquimodu s jinými ligandy stimulujícími fagocytózu a další optimalizaci terapie.

Na základě velmi úspěšných výsledků terapie kotveným laminarinem v kombinaci s LPS (Auerová, 2012), byl v prvním pokusu zkoumán vliv laminarinu-BAM s resiquimodem. Samotný laminarin nemá na redukci nádorového růstu žádný vliv, to potvrzuje ve své práci i Auerová (Auerová, 2012). Samotný resiquimod podle Schöna a kol. nevykazuje přímé protinádorové účinky (Schön a kol., 2002), v experimentu jsme ale pozorovali statisticky významnou redukci růstu. Překvapením ale bylo, že kombinace kotveného laminarinu s resiquimodem nevykazovala očekávanou synergii a neměla na redukci růstu výraznější vliv. Růst metastáz tato terapie nijak neovlivnila.

N-Formyl-methionyl-leucyl-fenylalanin patří mezi jedny z nejsilnějších chemoatraktantů fagocytárních lymfocytů a makrofágů (Prossnitz a Ye, 1997). Jak zjistila Čunátová, kotvením f-MLF na nádorové buňky lze dosáhnout nádorové redukce

(Čunátová, 2012). Ve druhém pokusu byl proto monitorován účinek f-MLF kotveného BAM s resiquimodem. Samotný f-MLF-BAM žádnou redukci však neprokázal, ale v kombinaci s resiquimodem působila terapie velmi účinně. V případech, kdy nelze použít manan v důsledku absence MBL, je tedy možné náhradit manan-BAM za f-MLF v kombinaci s resiquimodem. Výskyt metastáz byl u všech skupin srovnatelný, z toho vyplývá, že na redukci jejich růstu neměla terapie vliv.

Ve třetím pokusu byly zkoumány další možnosti náhrady toxického LPS. Jako vhodná náhrada v terapii kotveným mananem v kombinaci s resiquimodem se ukázala grampozitivní bakterie *Listeria monocytogenes* kotvená na nádorové buňky (Kumžáková, 2015). Jak zjistila Glaserová, Poly I:C prodlužuje dobu přežití (Glaserová, 2015), proto bylo Poly I:C použito i v této terapii. Na základě úspěšných výsledků s *Listeria monocytogenes* jsme se rozhodli vyzkoušet kyselinu lipoteichoovou přítomnou ve stěně grampozitivních bakterií. Druhou studovanou látkou byl Limpet keyhole hemocyanin, což není TLR agonist, ale rozhodli jsme se ho pro jeho silné imunostimulační účinky vyzkoušet také.

KLH v experimentu určitý vliv na redukci nádorového růstu prokázal, ale dobu přežití neprodloužil. Doba přežití jedinců ve skupině s kotveným mananem v kombinaci s KLH, R-848 a Poly I:C byla srovnatelná s dobou přežití myši ve skupině pouze s kotveným mananem, R-848 a Poly I:C.

Naopak LTA velmi zvýšila redukci nádorového růstu. Ve čtyřech případech ze šesti způsobila úplné vymizení nádorů již v době terapie a po ukončení terapie došlo ke zmizení nádorů u zbývajících dvou jedinců (v jednom případě se nádor později znovu objevil). Na přežití měla také velmi pozitivní účinky, sto dní se dožilo pět jedinců ze šesti. Terapie s LTA se ukázala účinná i v odolnosti vůči retansplantaci, u žádné myši se nádorové buňky znovu neujaly. Podobných výsledků bylo dosaženo i s použitím kotvené *Listerie monocytogenes* (Kumžáková, 2015). LTA stejně jako *Listeria monocytogenes* jsou TLR2 agonisti a stimulují sekreci prozánětlivých cytokinů, např. IL12 nebo TNF α (Cleveland a kol., 1996). Úspěch terapie je spatřován v současné stimulaci TLR2 (LTA), TLR3 (Poly I:C) a TLR7 (R-848), která vede ke komplexnější aktivaci imunitního systému. Všechny tři TLR ligandy stimulují tvorbu IL12. Podporují tak navození silnější Th1 efektorové odpovědi (Hessle a kol., 2000), tím i prolyferaci cytotoxických T-lymfocytů, NK buněk a zvýšení jejich cytotoxické aktivity (Gately a kol., 1992). Významný je zřejmě i fakt, že R-848 a především Poly I:C výrazně stimulují dozrávání dendritických buněk a tím i propojení s imunitou získanou (Ahonen a kol.,

1999; Verdijk a kol., 1999). Zapojení specifické imunity se projevilo získáním odolnosti vůči retransplantaci (navozením imunologické paměti).

Jelikož terapie založená na kombinaci kotveného mananu, R-848, Poly I:C a LTA měla velmi úspěšné výsledky, rozhodli jsme se aplikovat tuto terapii i na jiný model nádoru než je melanom, a sice na adenokarcinom pankreatu. Pankreatický karcinom patří mezi nádory s velmi špatnou prognózou, pouze 20 % pacientů se dožije pěti let od stanovení diagnózy (Li a kol., 2004). Je vysoce odolný chemoterapii i cílené léčbě (Schevchenko a kol., 2013). Přesto terapie směsí mananu-BAM, R-848, Poly I:C a LTA dokázala významnou redukci nádorové masy. Výsledky dokazují synergii látek a univerzálnost imunologické terapie.

Neutrofilý tvoří první linii v obraně proti infekcím, mají schopnost fagocytózy, produkce cytokinů a chemokinů. Proto také neutrofilý exprimují většinu TLR (všechny dosud popsané kromě TLR3), jejichž stimulací se zvyšuje jejich schopnost fagocytózy, podporuje oxidativní vzplanutí a produkci cytokinů (Hayashi a kol., 2003). Cílem posledního pokusu bylo zjistit, zda LTA (jakožto TLR2 agonist) působí při terapii také jako stimulátor primingu neutrofilů. Výsledky tuto domněnku potvrzují. Neutrofilý se v prostředí s LTA aktivovaly a snížily počet nádorových buněk v jamkách. Část naivních neutrofilů byla pro porovnání aktivována směsí cytokinů GM-CSF a TNF α . Tato směs cytokinů stimuluje oxidativní vzplanutí neutrofilů (uvolnění velkého množství superoxidových aniontů a dalších reaktivních kyslíkatých látek), (Dewas a kol., 2003). Neutrofilý aktivované LTA sice vykazovaly menší cytotoxicitu, než neutrofilý aktivované směsí cytokinů, přesto statisticky velmi významně. Cytotoxický vliv neutrofilů aktivovaných směsí cytokinů na nádorové buňky s kotveným f-MLFKK odpovídal výsledkům Jačkové (Jačková, 2015) a tyto výsledky potvrdil.

7 ZÁVĚR

- Kotvený laminarin v kombinaci s resiquimodem neprokázal dostatečnou účinnost terapie. Laminarin není vhodná náhrada mananu.
- Kotvený f-MLF v synergii s resiquimodem se ukázal jako vhodná náhrada kotveného mananu s resiquimodem.
- Přidání KLH do směsi kotveného mananu, Poly I:C a resiquimodu zvýší redukci nádorového růstu, ale nezlepší přežití.
- LTA ve směsi resiquimodu, Poly I:C a kotveného mananu způsobila velmi významnou redukci, v některých případech i úplné vymizení nádorů. Také měla značný vliv na prodloužení doby přežití.
- Aplikace směsi mananu-BAM, resiquimodu, Poly I:C a LTA v léčbě adenokarcinomu pankreatu potvrdila možnost použití terapie i v léčbě jiných nádorů.
- LTA stimuluje priming neutrofilů.

8 SEZNAM ZKRATEK

APC – antigen prezentující buňky
BAM – biokompatibilní membránová kotva (*Biocompatible anchor for cell membranes*)
CTL – cytotoxické T-lymfocyty
DMSO – dimethylsulfoxid
D-MEM – Dulbecco's modified Eagle's medium
EDTA – kyselina ethylendiamintetraoctová
FasL – Fas-ligand
FCS – fetální telecí sérum (*Fetal calf serum*)
FPR – formyl peptidový receptor
f-MLF – N-formyl-methionyl-leucyl-fenylalanin
f-MLFKK – N-formyl-methionyl-leucyl-fenylalanin + lysin, lysin
GM-CSF – růstový faktor stimulující kolonie garanulocytů a makrofágů (*granulocyte-macrophage colony stimulating factor*)
IFN- α – interferon alfa
IFN- γ – interferon- γ
IL – interleukin
KLH – Limpet keyhole hemocyanin
LTA – kyselina lipoteichoová
MASP sérové proteázy asociované s lektiny vázajícími manózu (*MBL-associated serine protease*)
MBL – Lektiny vázající manózu
MDP – muramyl-dipeptid
MHC – hlavní histokompatibilní komplex (*major histocompatibility complex*)
MR – manózový receptor
NF- κ B – nukleární faktor kapp B
NLR – NOD-like receptory
NK buňky – přirození zabíječi (*Natural killers*)
PAMPs – molekulové vzory asociované s patogeny (*pathogen associated molecular patterns*)
PBS – fosfátová pufovaný roztok (*Phosphate buffered saline*)
PRRs – vzory rozpoznávající receptory (*pattern recognition receptors*)
PSA - prostatický specifický antigen
RLR – Rig-like receptory
R-848 – Resiquimod
TAA – antigeny asociované s nádory (*tumor-associated antigens*)
TGF- β – transformující růstový faktor beta (*transforming growth factor beta*)
TLR – Toll-like receptory
TNF- α – faktor nekrotizující nádory alfa (*tumor necrosis factor alfa*)
Treg – regulační T-lymfocyty
TSA – antigeny nádorově specifické (*tumor-specific antigens*)
UV – ultrafialové záření

9 LITERATURA

Adam, Z., Vorlíček, J., & Koptíková, J. (2003). *Obecná onkologie a podpůrná léčba*. Grada, Praha, 787 s.

Alderson, M. R., Tough, T. W., Davis-Smith, T., Braddy, S., Falk, B., Schooley, K. A., Goodwin, R., G., Smith, C., A., Ramsdell, F. & Lynch, D. H. (1995). Fas ligand mediates activation-induced cell death in human T lymphocytes. *The Journal of Experimental Medicine*, 181(1), 71-77.

Ahonen, C. L., Gibson, S. J., Smith, R. M., Pederson, 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(1), 62-72.

Akira, S., Uematsu, S., & Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124(4), 783-801.

Anand, P., Kunnumakara, A. B., Sundaram, C., Harikumar, K. B., Tharakan, S. T., Lai, O. S., Sung, B. & Aggarwal, B. B. (2008). Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharmaceutical Research*, 25(9), 2097-2116.

Auerová, M. (2012). Terapie nádorových onemocnění založená na ukotvení laminarinu na povrch nádorových buněk. Bakalářská práce. *Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích*. 42 s.

Beerenwinkel, N., Schwarz, R. F., Gerstung, M., & Markowetz, F. (2014). Cancer evolution: mathematical models and computational inference. *Systematic Biology*, 64(1), 1-25.

Bennett, S. R., Carbone, F. R., Karamalis, F., Flavell, R. A., Miller, J. F., & Heath, W. R. (1998). Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature*, 393(6684), 478-480.

Beutler, B. (2004). Innate immunity: an overview. *Molecular Immunology*, 40(12), 845-859.

Beutler, B., & Cerami, A. (1987). Cachectin: more than a tumor necrosis factor. *New England Journal of Medicine*, 316(7), 379-385.

- Blattman, J. N., & Greenberg, P. D. (2004). Cancer immunotherapy: a treatment for the masses. *Science*, 305(5681), 200-205.
- Boon, T., & van der Bruggen, P. (1996). Human tumor antigens recognized by T lymphocytes. *The Journal of Experimental Medicine*, 183(3), 725-729.
- Bonilla, F. A., & Oettgen, H. C. (2010). Adaptive immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2), 33-40.
- Bowie, A. G. (2007). Translational Mini-Review Series on Toll-like Receptors: Recent advances in understanding the role of Toll-like receptors in anti-viral immunity. *Clinical & Experimental Immunology*, 147(2), 217-226.
- Brawer, M. K. (2000). Prostate-specific antigen. *Seminars in Surgical Oncology*, 18(1), 3-9.
- Brierley, M. M., & Fish, E. N. (2002). Review: IFN- α/β receptor interactions to biologic outcomes: understanding the circuitry. *Journal of interferon & cytokine research*, 22(8), 835-845.
- Brown, G. D., Herre, J., Williams, D. L., Willment, J. A., Marshall, A. S., & Gordon, S. (2003). Dectin-1 mediates the biological effects of β -glucans. *The Journal of Experimental Medicine*, 197(9), 1119-1124.
- Cawley, T. N., & Ballou, C. E. (1972). Identification of two *Saccharomyces cerevisiae* cell wall mannan chemotypes. *Journal of Bacteriology*, 111(3), 690-695.
- Cleveland, M. G., Gorham, J. D., Murphy, T. L., Tuomanen, E., & Murphy, K. M. (1996). Lipoteichoic acid preparations of gram-positive bacteria induce interleukin-12 through a CD14-dependent pathway. *Infection and Immunity*, 64(6), 1906-1912.
- Čunátová, Š. (2012). Ověření možnosti terapie nádorových onemocnění pomocí kotvení formylmethioninových derivátů na povrch nádorových buněk. Bakalářská práce. *Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích*, 38 s.
- Dahl, F., Stenberg, J., Fredriksson, S., Welch, K., Zhang, M., Nilsson, M., Bicknell, D., Bodmer, W., Davis, R., & Ji, H. (2007). Multigene amplification and massively parallel sequencing for cancer mutation discovery. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(22), 9387-9392.

- Dewas, C., Dang, P. M. C., Gougerot-Pocidallo, M. A., & El-Benna, J. (2003). TNF- α induces phosphorylation of p47phox in human neutrophils: partial phosphorylation of p47phox is a common event of priming of human neutrophils by TNF- α and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *The Journal of Immunology*, *171*(8), 4392-4398.
- Elfeil, W., Shanshan, L., Reham, A., & Yu, W. (2013). Pattern recognition receptors mini review. *Global Animal Science Journal*, *1*, 1118-1127.
- Franchi, L., Park, J. H., Shaw, M. H., Marina-Garcia, N., Chen, G., Kim, Y. G., & Núñez, G. (2008). Intracellular NOD-like receptors in innate immunity, infection and disease. *Cellular Microbiology*, *10*(1), 1-8.
- Frohlich, A., Diederichs, C. G., Staib, L., & Vogel, J. (1999). Detection of liver metastases from pancreatic cancer using FDG PET. *The Journal of Nuclear Medicine*, *40*(2), 250.
- Gastman, B. R., Atarashi, Y., Reichert, T. E., Saito, T., Balkir, L., Rabinowich, H., & Whiteside, T. L. (1999). Fas ligand is expressed on human squamous cell carcinomas of the head and neck, and it promotes apoptosis of T lymphocytes. *Cancer Research*, *59*(20), 5356-5364.
- Gately, M. K., Wolitzky, A. G., Quinn, P. M., & Chizzonite, R. (1992). Regulation of human cytolytic lymphocyte responses by interleukin-12. *Cellular Immunology*, *143*(1), 127-142.
- Giavazzi, R., & Decio, A. (2014). Syngeneic murine metastasis models: B16 melanoma. *Metastasis Research Protocols*, *1070*, 131-140.
- Glaserová, S. (2015). Studium klinicky aplikovatelné nádorové imunoterapie a jejich mechanismů. Diplomová práce. *Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích*, 66 s.
- Gordon, S. (2002). Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell*, *111*(7), 927-930.
- Ha, L., Noonan, F. P., De Fabo, E. C., & Merlino, G. (2005). Animal models of melanoma. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, *Elsevier*, *10*(2), 86-88
- Hanahan, D. & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, *100*(1), 57-70.

- Hayashi, F., Means, T. K., & Luster, A. D. (2003). Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood*, *102*(7), 2660-2669.
- Herberman, R. B. (1986). Natural killer cells. *Annual Review of Medicine*, *37*(1), 347-352.
- Hermann, C., Spreitzer, I., Schröder, N. W., Morath, S., Lehner, M. D., Fischer, W., Schütt, Ch., Schumann, R. R. & Hartung, T. (2002). Cytokine induction by purified lipoteichoic acids from various bacterial species-Role of LBP, sCD14, CD14 and failure to induce IL-12 and subsequent IFN- γ release. *European Journal of Immunology*, *32*(2), 541-551.
- Hessle, C., Andersson, B., & Wold, A. E. (2000). Gram-positive bacteria are potent inducers of monocytic interleukin-12 (IL-12) while gram-negative bacteria preferentially stimulate IL-10 production. *Infection and Immunity*, *68*(6), 3581-3586.
- Hořejší, V. (2015). Protinádorové zbraně imunitního systému. *Klinická Onkologie*, *28*(4), 15-22.
- 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*, 83 s.
- Hynková, L., & Doleželová, H. (2008). Nežádoucí účinky radioterapie a podpůrná léčba u radioterapie nádorů hlavy a krku. *Onkologie*, *2*(2), 88-90.
- Cheng, Y. S., & Xu, F. (2010). Anticancer function of polyinosinic-polycytidylic acid. *Cancer Biology & Therapy*, *10*(12), 1219-1223.
- Chambers, A. F., Groom, A. C., & MacDonald, I. C. (2002). Metastasis: dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nature Reviews Cancer*, *2*(8), 563-572.
- Chism, S. E., Burton, R. C., & Warner, N. L. (1978). Immunogenicity of oncofetal antigens: a review. *Clinical Immunology and Immunopathology*, *11*(3), 346-373.
- Inohara, N., & Nuñez, G. (2001). The NOD: a signaling module that regulates apoptosis and host defense against pathogens. *Oncogene*, *20*(44).

Jačková, A. (2015). Hledání agonistů TLR působících synergicky s ligandy fagocytárních receptorů v nádorové terapii. Diplomová práce. *Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích*, 77 s.

Janotová, T., Auerová, M., Jalovecká, M., Švecová, I., Caisová, V., Bruzlová, P., Maierová, V., Kumžáková, Z., Čunátová, Š., Vlčková, Z., 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(1), e85222.

Kilpatrick, D. C. (2002). Mannan-binding lectin: clinical significance and applications. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1572(2), 401-413.

Kim, R., Emi, M., & Tanabe, K. (2007). Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology*, 121(1), 1-14.

Klasbusay, M. (2015). Úloha regulačních T buněk v protinádorové imunitní odpovědi. *Klinická Onkologie*, 28(4), 23-27.

Klener, P. (2003). Protinádorová chemoterapie pro 21. století. *Klinická Onkologie*, 16(6), 243.

Klener, P. (2008). Omezilo zavádění tzv. cílené léčby význam protinádorové chemoterapie?. *Onkologie*, 2(1), 33-37.

Kovaříková, P., Michalová, E., Knopfová, L., & Bouchal, P. (2014). Metody studia buněčné migrace a invazivity nádorových buněk. *Klinická Onkologie*, 27 (1), 22–27

Krajsová, I. (2015). Význam imunitního systému a možnosti imunoterapie u maligního melanomu. *Klinická Onkologie*, 28(4), 56-63.

Kumžáková, Z., 2015: Hledání agonistů Toll-like receptorů použitelných synergicky s ligandy fagocytárních receptorů pro imunoterapii nádorových onemocnění v humánní medicíně. Diplomová práce. *Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích*. 86 s.

Lawrence, T. (2009). The nuclear factor NF- κ B pathway in inflammation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1(6), a001651.

- Le, Y., Murphy, P. M., & Wang, J. M. (2002). Formyl-peptide receptors revisited. *Trends in Immunology*, 23(11), 541-548.
- Lehner, T. (2008). Special regulatory T cell review: The resurgence of the concept of contrasuppression in immunoregulation. *Immunology*, 123(1), 40-44.
- Leiter, U., & Garbe, C. (2008). Epidemiology of melanoma and nonmelanoma skin cancer-the role of sunlight. In Sunlight, vitamin D and skin cancer. *Springer New York*, 624, 89-103.
- Li, D., Xie, K., Wolff, R., & Abbruzzese, J. L. (2004). Pancreatic cancer. *The Lancet*, 363(9414), 1049-1057.
- Lin, W. W., & Karin, M. (2007). A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *The Journal of Clinical Investigation*, 117(5), 1175-1183.
- Loo, Y. M., & Gale, M. (2011). Immune signaling by RIG-I-like receptors. *Immunity*, 34(5), 680-692.
- Lowenfels, A. B., Maisonneuve, P., Whitcomb, D. C., Lerch, M. M., & DiMagno, E. P. (2001). Cigarette smoking as a risk factor for pancreatic cancer in patients with hereditary pancreatitis. *JAMA*, 286(2), 169-170.
- Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P., & Sica, A. (2002). Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends in Immunology*, 23(11), 549-555.
- Medzhitov, R., & Biron, C. A. (2003). Innate immunity-editorial overview. *Current Opinion in Immunology*, 15, 2-4.
- Melief, C. J. M. (2001). T-cell immunity against tumors, a delicate balancing act involving dendritic cells. *Pathologie Biologie*, 49(6), 498-499.
- Mittal, D., Gubin, M. M., Schreiber, R. D., & Smyth, M. J. (2014). New insights into cancer immunoediting and its three component phases-elimination, equilibrium and escape. *Current Opinion in Immunology*, 27, 16-25.
- Moreira, L. R. S. (2008). An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79(2), 165-178.

- Moresco, E. M. Y., LaVine, D., & Beutler, B. (2011). Toll-like receptors. *Current Biology*, 21(13), 488-493.
- Morton, D. L., Wen, D. R., Wong, J. H., Economou, J. S., Cagle, L. A., Storm, F. K., Foshag, L. J. & Cochran, A. J. (1992). Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma. *Archives of Surgery*, 127(4), 392-399.
- Murphy, P. M., Ozcelik, T., Kenney, R. T., Tiffany, H. L., McDermott, D., & Francke, U. (1992). A structural homologue of the N-formyl peptide receptor. Characterization and chromosome mapping of a peptide chemoattractant receptor family. *Journal of Biological Chemistry*, 267(11), 7637-7643.
- Musselli, C., Livingston, P. O., & Ragupathi, G. (2001). Keyhole limpet hemocyanin conjugate vaccines against cancer: the Memorial Sloan Kettering experience. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 127(2), 20-26.
- Nakamura, K., Yoshikawa, N., Yamaguchi, Y., Kagota, S., Shinozuka, K., & Kunitomo, M. (2002). Characterization of mouse melanoma cell lines by their mortal malignancy using an experimental metastatic model. *Life Sciences*, 70(7), 791-798.
- Nathan, C. F. (1987). Secretory products of macrophages. *Journal of Clinical Investigation*, 79(2), 319.
- Nelson, H., Petrelli, N., Carlin, A., Couture, J., Fleshman, J., Guillem, J., Miedema, B., Ota, D. & Sargent, D. (2001). Guidelines 2000 for colon and rectal cancer surgery. *Journal of the National Cancer Institute*, 93(8), 583-596.
- Old, L. J., & Chen, Y. T. (1998). New paths in human cancer serology. *The Journal of Experimental Medicine*, 187(8), 1163-1167.
- Pålsson-McDermott, E. M., & O'Neill, L. A. (2004). Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. *Immunology*, 113(2), 153-162.
- Presicce, P., Taddeo, A., Conti, A., Villa, M. L., & Della Bella, S. (2008). Keyhole limpet hemocyanin induces the activation and maturation of human dendritic cells through the involvement of mannose receptor. *Molecular Immunology*, 45(4), 1136-1145.

- Priebe, T. S., Atkinson, E. N., Pan, B. F., & Nelson, J. A. (1992). Intrinsic resistance to anticancer agents in the murine pancreatic adenocarcinoma PANC02. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 29(6), 485-489.
- Prossnitz, E. R., & Richard, D. Y. (1997). The N-formyl peptide receptor: a model for the study of chemoattractant receptor structure and function. *Pharmacology & Therapeutics*, 74(1), 73-102.
- Qu, W. M., Miyazaki, T., Terada, M., Okada, K., Mori, S., Kanno, H., & Nose, M. (2002). A novel autoimmune pancreatitis model in MRL mice treated with polyinosinic: polycytidylic acid. *Clinical & Experimental Immunology*, 129(1), 27-34.
- Read, S. M., Currie, G., & Bacic, A. (1996). Analysis of the structural heterogeneity of laminarin by electrospray-ionisation-mass spectrometry. *Carbohydrate Research*, 281(2), 187-201.
- Restifo, N. P., Kawakami, Y., Marincola, F., Shamamian, P., Taggarse, A., Esquivel, F., & Rosenberg, S. A. (1993). Molecular mechanisms used by tumors to escape immune recognition: immunogenotherapy and the cell biology of major histocompatibility complex class I. *Journal of Immunotherapy with Emphasis on Tumor Immunology: Official Journal of the Society for Biological Therapy*, 14(3), 182.
- Ryu, Y. H., Baik, J. E., Yang, J. S., Kang, S. S., Im, J., Yun, C. H., Kim, D. W., Lee, K., Chung, D. K., Ju, H. R. & Han, S. H. (2009). Differential immunostimulatory effects of Gram-positive bacteria due to their lipoteichoic acids. *International Immunopharmacology*, 9(1), 127-133.
- Sato, T., Hongu, T., Sakamoto, M., Funakoshi, Y., & Kanaho, Y. (2013). Molecular mechanisms of N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-induced superoxide generation and degranulation in mouse neutrophils: phospholipase D is dispensable. *Molecular and Cellular Biology*, 33(1), 136-145.
- Sell, S. (2004). Stem cell origin of cancer and differentiation therapy. *Critical reviews in Oncology/Hematology*, 51(1), 1-28.

- Shi, Y., Liu, C. H., Roberts, A. I., Das, J., Xu, G., Ren, G., Zhang, Y., Zhang, L., Yuan, Z., R., Ton, H., S., W. & Das, G. (2006). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and T-cell responses: what we do and don't know. *Cell Research*, 16(2), 126-133.
- Shevchenko, I., Karakhanova, S., Soltek, S., Link, J., Bayry, J., Werner, J., Umansky, V. & Bazhin, A. V. (2013). Low-dose gemcitabine depletes regulatory T cells and improves survival in the orthotopic Panc02 model of pancreatic cancer. *International Journal of Cancer*, 133(1), 98-107.
- Schoenberger, S. P., Toes, R. E., van der Voort, E. I., Offringa, R., & Melief, C. J. (1998). T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature*, 393(6684), 480-483.
- Schön, M., Bong, A. B., Drewniok, C., Herz, J., Geilen, C. C., Reifenberger, J., Benninghoff, B., Slade, H. B., Gollnick, H. & Schön, M. P. (2003). Tumor-selective induction of apoptosis and the small-molecule immune response modifier imiquimod. *Journal of the National Cancer Institute*, 95(15), 1138-1149.
- Schreiber, H., Ward, P. L., Rowley, D. A., & Stauss, H. J. (1988). Unique tumor-specific antigens. *Annual Review of Immunology*, 6(1), 465-483.
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2015). Cancer statistics, 2015. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 65(1), 5-29.
- Smyth, M. J., Cretney, E., Kershaw, M. H., & Hayakawa, Y. (2004). Cytokines in cancer immunity and immunotherapy. *Immunological Reviews*, 202(1), 275-293.
- Swerdlow, R. D., Ebert, R. F., Lee, P., Bonaventura, C., & Miller, K. I. (1996). Keyhole limpet hemocyanin: Structural and functional characterization of two different subunits and multimers. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 113(3), 537-548.
- Šťastný, M. & Říhová, B. (2015). Únikové strategie nádorů pozornosti imunitního systému. *Klinická Onkologie*, 28(4), 28-37.
- Švecová, I. (2013). Optimalizace imunoterapie melanomu založené na kotvení laminarinu na povrch nádorových buněk. Diplomová práce. *Jihočeská univerzita v Českých budějovicích*, 71 s.

Takahashi, K., & Ezekowitz, R. A. B. (2005). The role of the mannose-binding lectin in innate immunity. *Clinical Infectious Diseases*, 41(7), 440-444.

Taniguchi, T., & Minami, Y. (1993). The IL-2/IL-2 receptor system: a current overview. *Cell*, 73(1), 5-8.

Taylor, M. E., Conary, J. T., Lennartz, M. R., Stahl, P. D., & Drickamer, K. (1990). Primary structure of the mannose receptor contains multiple motifs resembling carbohydrate-recognition domains. *Journal of Biological Chemistry*, 265(21), 12156-12162.

Tilg, H. (1997). New insights into the mechanisms of interferon alfa: an immunoregulatory and anti-inflammatory cytokine. *Gastroenterology*, 112(3), 1017-1021.

Underhill, D. M., & Gantner, B. (2004). Integration of Toll-like receptor and phagocytic signaling for tailored immunity. *Microbes and infection*, 6(15), 1368-1373.

Verdijk, R. M., Mutis, T., Esendam, B., Kamp, J., Melief, C. J., Brand, A., & Goulmy, E. (1999). Polyriboinosinic polyribocytidylic acid (poly (I: C)) induces stable maturation of functionally active human dendritic cells. *The Journal of Immunology*, 163(1), 57-61.

Vodička, I. (1998). Biofyzikální základy radioterapie zhoubných nádorů. *ACTA MEDICA SUPPL*, 2, 105-163.

Waldhauer, I., & Steinle, A. (2008). NK cells and cancer immunosurveillance. *Oncogene*, 27(45), 5932-5943.

Zamze, S., Martinez-Pomares, L., Jones, H., Taylor, P. R., Stillion, R. J., Gordon, S., & Wong, S. Y. (2002). Recognition of bacterial capsular polysaccharides and lipopolysaccharides by the macrophage mannose receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 277(44), 41613-41623.

Zvolský, M. (2015). Novotvary 2011 ČR. *Ústav Zdravotnických Informací a Statistiky ČR*, 263 s.