

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

**Nádorová imunoterapie založená na kombinaci LPS
a vázaného Zymosanu A**

Bakalářská práce

Denisa Sváčková

Školitel: RNDr. Jan Ženka, CSc

České Budějovice 2013

Sváčková, D., 2013: Nádorová imunoterapie založená na kombinaci LPS a vázaného Zymosanu A [Cancer immunotherapy based on combination of LPS and bound Zymosan A. Bc. Thesis, in Czech.] - 58p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

The aim of this thesis was to study murine melanoma B16-F10 therapy based on combination of membrane- bound phagocytic ligands (Zymosan A- SMCC) with LPS (signal receptor agonist). Histological evaluation of therapy progression and optimization of cancer therapy were performed as well.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracoval/a 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, 23. 4. 2013

.....

Denisa Sváčková

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli RNDr. Janu Ženkovi, CSc. za výborné vedení bakalářské práce, za ochotu kdykoli pomoci, za cenné rady a velkou trpělivost. Dále bych ráda poděkovala všem z Oddělení imunologie parazitů Parazitologického ústavu AV ČR v Českých Budějovicích. Rovněž bych chtěla poděkovat celému Oddělení patologie nemocnice Tábor za jejich vstřícnost a poskytnutí zázemí. Jmenovitě bych ráda poděkovala primáři MUDr. Josefu Kultovi a MUDr. Kataríně Lukáčové za jejich pomoc při histologickém vyhodnocování. Mé velké dík patří také rodině, příteli a přátelům, kteří mě velmi podporovali v průběhu celého studia.

Obsah

1	Úvod	1
1.1	Obecné vlastnosti nádorů	1
1.1.1	Nádorové bujení	1
1.1.2	Biologie nádorových buněk	1
1.1.3	Třídění nádorů	2
1.1.4	Šíření nádoru v organismu	2
1.2	Maligní melanom (melanoblastom)	3
1.2.1	Patogeneze	3
1.2.2	Klinický obraz melanomu	3
1.2.3	Histologie melanomu	4
1.2.4	Myší melanom B16	4
1.3	Léčba v onkologii	5
1.3.1	Chemoterapie	5
1.3.2	Radioterapie	5
1.3.3	Chirurgická léčba	5
1.3.4	Nádorová imunoterapie	6
1.3.4.1	Bakteriální adjuvans	6
1.3.4.2	Nádorová vakcinace	6
1.3.4.3	Adoptivní imunoterapie	7
1.4	Imunologie nádorů	7
1.4.1	Únik nádorů před imunitním systémem	8
1.4.2	Složky imunitního systému	8
1.5	Získaná imunita	9
1.5.1	Lymfocyty	9
1.6	Přirozená imunita	11
1.6.1	Makrofágy	11

1.6.1.1	Rozpoznání přítomnosti patogenů vrozenou imunitou	12
1.6.2	Dendritické buňky	13
1.6.3	Polymorfonukleární leukocyty (granulocyty)	14
1.6.4	NK buňky	14
1.6.4.1	Proč NK buňky nejsou tak účinné proti nádorům?	15
1.6.4.2	Cytokiny v onkologii.....	15
1.6.4.3	Chemokiny a jejich receptory	16
1.6.5	Komplementový systém	17
1.6.6	Nádorová onemocnění a vrozená imunita	17
1.7	Nádorová terapie pomocí Zymosanu A a lipopolysacharidu (LPS)	18
1.7.1	Zymosan	18
1.7.1.1	Zymosan A a jeho protinádorové působení.....	19
1.7.2	Beta glukán	20
1.7.2.1	Beta glukany a imunitní reakce.....	20
1.7.2.2	Beta glukán a jeho protinádorové působení	21
1.7.3	Manan	21
1.7.3.1	Manan a jeho protinádorové působení	21
1.7.4	Lipopolysacharid (LPS).....	22
1.7.4.1	Složky LPS	22
1.7.4.2	Funkce LPS	22
1.7.5	Protinádorové působení Zymosanu A a LPS.....	23
2	Cíle práce.....	24
3	Materiál a metody.....	25
3.1	Chemikálie	25
3.1.1	Příprava terapeutik.....	25
3.2	Laboratorní zvířata.....	26
3.3	Kultivace melanomu B16- F10.....	26

3.4	Transplantace melanomu B16- F10	26
3.5	Měření velikosti nádorů	26
3.6	Průměrná redukce nádorového růstu	27
3.7	Počítání plicních metastáz.....	27
3.8	Sonikace.....	27
3.9	Histologické vyhodnocení	27
3.10	Statistické vyhodnocení dat.....	27
3.11	Popis jednotlivých terapií.....	28
3.11.1	Studium vlivu kotveného Zymosanu A ve spojení s LPS na růst melanomu... 28	
3.11.2	Screening režimů léčby melanomu aplikací Zymosanu A- SMCC+ LPS..... 28	
3.11.3	Histologické vyhodnocení průběhu terapie založené na použití LPS, kotveného Zymosanu A a kotveného Zymosanu A ve spojení s LPS..... 29	
3.11.4	Histologické vyhodnocení vlivu kotvení SMCC na růst nádoru..... 29	
3.11.5	Terapie melanomu pomocí pulzní aplikace směsi kotveného Zymosanu A ve spojení s LPS	30
4	Výsledky.....	31
4.1	Studium vlivu kotveného Zymosanu A ve spojení s LPS na růst melanomu..... 31	
4.2	Screening režimů léčby melanomu aplikací Zymosanu A- SMCC+ LPS..... 34	
4.3	Histologické vyhodnocení terapie založené na použití LPS, kotveného Zymosanu A a kotveného Zymosanu A ve spojení s LPS	36
4.4	Histologické vyhodnocení vlivu kotvení SMCC na růst nádoru	39
4.5	Terapie melanomu pomocí pulzní aplikace směsi kotveného Zymosanu A- ve spojení s LPS	41
	Obr. 11: Vliv terapie s použitím kotveného Zymosanu A- ve spojení s LPS na intenzitu metastazování.	42
	Obr. 12: Výskyt metastáz při terapii s použitím kotveného Zymosanu A- ve spojení s LPS.	43
5	Diskuze	44

6	Souhrn.....	47
7	Citovaná literatura	48
8	Přílohy	54
8.1	Příloha 1: Histologická tkáň melanomu léčeného kotveným Zymosanem ve spojení s LPS, 8 hod po aplikaci terapeutik	54
8.2	Příloha 2: Histologická tkáň neléčeného melanomu, 8 hod po terapii	54
8.3	Příloha 3: Melanom 48 hod po terapii Zymosanem- SMCC+ LPS	55
8.4	Příloha 4: Histologický preparát melanomu po 8 hod léčby pomocí LPS.....	56
8.5	Příloha 5: Histologická tkáň melanomu léčeného kotveným Zymosanem A, 8 hod po terapii.....	56
8.6	Příloha 6: Melanom 48 hod po terapii pomocí LPS	57
8.7	Příloha 7: Melanom 48 hod po terapii pomocí kotveného Zymosanu A.....	57
8.8	Příloha 8: Melanom 24 hod po vpichu PBS.....	58
8.9	Příloha 9: Vliv kotvení SMCC na melanom, 24 hod od vpichu (lysin- SMCC)	58

1 Úvod

1.1 Obecné vlastnosti nádorů

Nádory mohou vznikat v jakémkoli věku. Ve většině případů se však objevují v dospělosti a ve stáří. Mezi pohlavími je řada rozdílů. Nejčastějšími nádory u žen jsou nádory prsu, dělohy, tlustého střeva a ovaria. U mužů jsou časté nádory karcinomy plic, tlustého střeva, prostaty a žaludku. Léčebné účinky u některých nádorů snížily křivku úmrtnosti a současná léčba dokáže v mnoha případech nádory vyléčit nebo nádor potlačit, což pacientovi umožní vrátit se do normálního života (Mačák & Mačáková, 2004).

1.1.1 Nádorové bujení

Velmi častou příčinou smrti člověka je nádorové bujení. Jelikož dochází k prodloužení věku lidí (především v rozvinutých zemích, kde se zlepšují životní podmínky), výskyt nádorového bujení se zvyšuje. Další příčinou vzniku nádorů je samozřejmě změněná potravní zvyklosti lidí a vystavení mnoha faktorům, ať již chemického nebo fyzikálního charakteru (Krejsek & Kopecký, 2004).

Nádorové bujení pochází z buněk vlastního těla, vymyká se kontrolním mechanismům, které řídí růst normálních tkání (Mačák & Mačáková, 2004). V současnosti se nádorové bujení označuje jako proces vedoucí k nahromadění genetických poruch (Krejsek & Kopecký, 2004).

1.1.2 Biologie nádorových buněk

Nádorové buňky mají šest charakteristických rysů: neomezený replikační potenciál, soběstačnost v potřebě růstových signálů, necitlivost vůči růst inhibujícím signálům, neschopnost apoptózy (řízená smrt buňky), proces novotvorby krevních kapilár (angiogeneze), vytváření metastáz (vzdálená ložiska) a prorůstání do zdravých tkání (invazivita) (Hanahan & Weinberg, 2000). Pro růst nádorů je podmiňující množství dělicích se buněk v heterogenní populaci nádoru. U nádorových buněk může dojít k zastavení růstu nádoru (remise), zničení přítomných nádorových buněk (eradikace) a znovuobjevení nádorového bujení (Hynie, 2001).

1.1.3 Třídění nádorů

Nádory třídíme podle histologického vzhledu nádorů (histogeneze) a biologických vlastností (chování) nádorů. Podle biologického chování nádorů se dále dělí na benigní, intermediární a maligní (Mačák & Mačáková, 2004).

Benigní nádory zůstávají na místě svého vzniku, nemetastazují. Nemají ve většině případů negativní vliv na organismus (Vorlíček a kol., 2012).

Intermediární nádory vytváří rozhraní mezi benigními a maligními nádory. V některých případech mohou metastazovat, ale jejich prognóza je lepší než u maligních nádorů (Mačák & Mačáková, 2004).

Maligní nádory rostou velmi rychle, šíří se do okolí a vytvářejí metastázy. Musí se začít včas léčit, jinak dojde ke smrti organismu (Vorlíček a kol., 2012).

1.1.4 Šíření nádoru v organismu

Nádorové buňky jsou charakteristické svým autonomním chováním, kdy dochází k jejich neregulovanému množení a tím buňky nedospívají do zralého (diferencovaného) stavu. Nádorové buňky se množí bez jakékoli regulace.

Šíření nádoru může probíhat přímým šířením nebo metastazováním. Metastazování je schopnost zhoubného nádoru šířit se do dalších oblastí organismu. Každý nádor má různou schopnost šířit se pomocí metastáz (Petruželka & Konopásek, 2003).

Metastazování porogenní je šíření umožňující volný pohyb maligních buněk v tělních dutinách. Karcinom vaječníku je typickým příkladem, kdy dochází k šíření buněk po povrchu orgánů dutiny břišní.

Metastazování krevním řečištěm (hematogenní) je šíření maligních buněk krevní cévou, kdy jsou krví přeneseny na vzdálené místo, kde vytvářejí své nové ložisko. Příkladem je metastazování karcinomů tlustého střeva do jater (vrátnicovou žilou).

Metastazování lymfatickými cestami je zakládání nových ložisek v lymfatických cestách nebo lymfatických uzlinách. Toto šíření může přejít v šíření krevním systémem, jelikož mízní cévy ústí do krevního řečiště (Vorlíček a kol., 2012).

1.2 Maligní melanom (melanoblastom)

Melanom patří mezi neuroektodermové zhoubné nádory, které vycházejí z nezralých melanocytů. Melanom se typicky objevuje v kožní oblasti, někdy se však může vyskytnout i v jiných orgánech (oku, sliznici urogenitálního a gastrointestinálního traktu)(Vorlíček a kol., 2012).

1.2.1 Patogeneze

Melanom je nádor, který velmi často vytváří metastáze, ale pokud najdeme melanocyty například v lymfatických uzlinách, ještě to neznamena, že jde o nádorové bujení, protože zde se mohou nacházet i za normálních okolností. Melanocytové afekce jsou nejčastějším pigmentovým postižením kůže, které může být benigní (melanocytový névus- ostře ohraničená pigmentová skvrna tvořená hnízdy melanocytů) nebo maligní (maligní melanom). U melanocytových afekcí nejsou melanocyty navzájem fixovány a proto se mohou jednotlivé buňky snadněji uvolnit z buněčného seskupení. Proto také dochází ke vzniku metastáz i u malého primárního nádoru.

U 50-70% nádorem postižených lidí se melanom objevuje na normálně vyhlížející kůži. U většiny dospělých nedochází k novému přibývání melanocytových projevů. Pokud by se ovšem nový melanocytový projev objevil, měli bychom ho tedy ihned rozpoznat. Někdy se ovšem stává, že nemocní ignorují kožní projevy, ty se mohou zvětšovat, měnit svou barvu, růst nad úroveň okolí nebo se naruší kožní povrch a vzniká vřed s krvácením. Zbýlých 30-50% melanomů vzniká v již existujícím melanocytovém postižení (v tzv. prekurzorech melanomu). Významné jsou malé vrozené névy, lentigomaligna melanom a různé získané névy (Pizinger, 2003).

1.2.2 Klinický obraz melanomu

Pro vyhodnocení melanocytových projevů se používá pravidlo ABCD, kde se kontrolují tyto změny:

- Asymetry - ložisko je nepravidelné a má asymetrický tvar
- Borderline – ložiskové okraje jsou nepravidelné, se zářezy a výběžky
- Colour – tmavne barva ložiska, je skvrnitá
- Diameter - průměr ložiska se zvětšuje (Vorlíček a kol., 2012).

Negativním projevem je tvorba vředů (ulcerace), což je proces, kdy díky růstu nádoru dochází k narušení kožního povrchu a vznikne vřed. U vředu dochází ke krvácení, kožní

postižení se nehojí a tím se tedy vřed považuje za závažnou změnu, která zhoršuje prognózu postiženého.

Někdy se u nemocných s melanomem vyskytuje ztráta pigmentu, kdy dojde k vymizení hnědého melaninového pigmentu na jiných místech těla. Tento nález je příznivý, protože doba přežití se tím zvyšuje (Pizinger, 2003).

Další změna, která provází horizontálně zvětšující se melanom je regrese. Klinicky regrese vypadá jako problednutí části nádoru, nebo úplné vymizení části nádorového ložiska. Tato změna ukazuje na dobrou obranyschopnost organismu proti nádorovému bujení (Pizinger, 2003).

1.2.3 Histologie melanomu

Tloušťka nádoru je jeden z faktorů, který odhaduje další průběh onemocnění. Na histologických řezech se určuje tloušťka nádoru, což je vzdálenost (v milimetrech) mezi nejvrchnějším místem nádoru v oblasti epidermis až k dolní nejhloběji uložené části nádoru v tukové tkáni. Pokud je tloušťka nádoru menší než 0,75 mm, je metastazování málo pravděpodobné, ovšem nádory větší než 4,0 mm mají závažný průběh onemocnění. Toto dělení má orientační význam, ale je také významným faktorem pro další léčebné postupy.

Při růstu nádoru (zejména při horizontálním růstu) vzniká kolem nádoru imunologická obranná reakce, což je pozorovatelné přítomností lymfocytárního infiltrátu. Jde o zánětlivou reakci, jejíž infiltrát obsahuje hlavně T-lymfocyty (Pizinger, 2003).

1.2.4 Myší melanom B16

Jsou známy čtyři různé linie myšího melanomu - B16-F0, - F1, - F10 a - BL6, kde melanom B16-F0 je rodičovskou buněčnou linií. Pro naše účely využíváme buňky myšího melanomu B16-F10. Tento melanom je typický svou vysokou invazivitou a schopností metastazovat (převážně do plic). Schopnost tvořit metastáze u myší se postupně zvyšuje v pořadí B16-F0, - F1 a - F10. Melanom B16-F10 byl získán pomocí Fidlerovi metody a jeho buňky jdou velmi dobře napěstovat in vitro a velice dobře rostou (jejich doba mitotického cyklu je něco málo přes 12 hodin) (Nakamura a kol., 2002).

1.3 Léčba v onkologii

Ve dvacátém století prudce vzrostl výskyt rakoviny a proto se během 2. poloviny minulého století rozvinula medikamentózní léčba. Dříve byla na prvním místě léčba chemoterapií, ale v poslední době se jí vyrovnává i rozvíjející se imunoterapie a biologická terapie. Samozřejmě při terapii nádorů zůstávají stále základní léčebné postupy, jako je chirurgické řešení, chemoterapie a radioterapie (Altaner, 2008).

1.3.1 Chemoterapie

Chemoterapie je léčba prováděná pomocí cytostatik, což jsou látky, které zastavují růst nádorového bujení. Používají se spolu s dalšími léčebnými postupy (operativní odstranění nebo ozáření nádoru). Jsou různé typy nádorů a tím jsou i odlišně citlivé k chemoterapii nebo léčbě zářením. Chemoterapie velice přispívá k vyléčení mnoha pacientů s určitými typy nádorového bujení.

Cytostatika zpomalují buněčnou proliferaci, proto působí na výrazně proliferující nádorové buňky. Vysoká toxicita cytostatik se projevuje bohužel i u dalších rychle rostoucích buněk (kostní dřeň, vlasové folikuly). Cytostatika mají různé mechanismy působení. Současným nebo postupným podáváním několika cytostatik se účinek chemoterapie zvyšuje a snižuje se rezistence buněk na cytostatika. Dalším pokrokem bylo spojení vhodných cytostatik s pomocnými prostředky, které obnovují krvetvorbu a podporují imunitu.

Cytostatika mají také nežádoucí účinky, inhibují i růst nenádorových buněk a poškozují také strukturu DNA (Hynie, 2001).

1.3.2 Radioterapie

U nádorů se radioterapie využívá jako součást standartního léčebného postupu a to společně s chirurgickou nebo chemickou léčbou. Je to postup, kdy se do nádoru dostává určitá dávka záření. Tato dávka by měla nádor zničit nebo alespoň omezit jeho růst, ale bez poškození zdravé tkáně. Je však známo, že záření poškozuje kromě proliferujících buněk i cévní pojivovou tkáň. Tohoto účinku se velmi cení u nádorů, ale na zdravou tkáň to může mít velmi nežádoucí účinek (vznik poradiačních jevů) (Vorlíček a kol., 2012).

1.3.3 Chirurgická léčba

Chirurgie je základní léčba nádorů, která hraje velmi důležitou roli v diagnostice, prevenci a terapii nádorů. Pokud je nádor lokalizovaný a nemetastazuje, provádí se radikální

chirurgický zákrok. Takto lokalizovaný nádor se většinou vyskytuje v raném stádiu, operací dojde k odstranění nádoru společně s lemlem okolní tkáně (Vorlíček a kol., 2012).

1.3.4 Nádorová imunoterapie

V poslední době se stává velmi významná nádorová imunoterapie, a to jak v pokusech in vivo nebo in vitro, tak jako běžný léčebný postup u nádorového onemocnění. Je podávána jako monoterapie nebo společně s chemoterapií. Touto léčbou dochází k podporování přirozené protinádorové obraně organismu. Cílem je zasáhnout do procesu tumorigeneze (vznik nádoru) a zvrátit tento proces, ale aby došlo k co nejmenším nežádoucím účinkům na organismus (Králičková a kol., 2011). Zatímco v zahraničí se pojem imunoterapie kryje s pojmem biologická terapie, u nás se pojem biologická terapie používá pro terapii cílenou (použití protilátek pro blokaci povrchových buněčných receptorů, použití inhibitorů kináz účastnících se přenosu signálů a inhibitorů enzymů ovlivňujících epigenetické změny).

1.3.4.1 Bakteriální adjuvans

Využívá se kmene Bacillus Calmet-Guerin (BCG), který se používá při léčbě karcinomu močového měchýře a to pomocí monoterapie nebo v kombinaci s chemoterapií (Grange a kol., 2008).

1.3.4.2 Nádorová vakcinace

U nádorového onemocnění se dělí vakcinace na preventivní a léčebnou. Mezi preventivní patří očkování proti hepatitidě B (kdy jde o prevenci hepatocelulárního karcinomu) a očkování proti papilomavirům (prevence karcinomu děložního čípku).

Léčebné působení nádorových vakcín je založeno na zlepšení antigenní prezentace nádorových buněk. Výběr vhodného antigenu, použití správného adjuvans a zajištění trvale účinné odpovědi, hrají důležitou roli při výrobě protinádorové vakcíny. (Tolozo a kol., 2004), Protinádorové vakcíny rozdělujeme na celobuněčné, geneticky připravené, peptidové, proteinové, VLP vakcíny (virus-like particles) a vakcinace dendritickými buňkami (Králičková a kol., 2011).

Problémem celobuněčných vakcín je, že mají nízkou schopnost vyvolat imunitní odpověď. Častou komplikací je výskyt jiných antigenů u metastáz a u mateřského nádoru. Jako celobuněčné vakcíny se nejvíce používají ozářené nádorové buňky, které tak ztratily schopnost dělit se.

Geneticky připravené vakcíny s použitím plazmidové DNA jsou hlavním výzkumným směrem. (Weide a kol., 2008). Problémem DNA vakcín se může stát včlenění virového genomu do lidského genomu s další schopností maligní přeměny (Krejsek & Kopecký, 2004).

VLP vakcíny jsou viru podobné částice- prázdné obaly virů tvořené kapsidovým proteinem L1, což je nositel všech důležitých imunitních epitopů. Vakcíny neobsahují virovou DNA (ta je nutná pro rozvoj infekce) a jsou tedy neinfekční a neoncogenní (nereplikují se). Purifikované VLP jsou pak smíchány s adjuvans a vytvářejí konečnou vakcínu. Tyto adjuvancia pomáhají pohlcení očkované protilátky antigen prezentujícími buňkami a napomáhají nespecifické stimulaci imunitní reakce (Wright a kol., 2006)(Tolozo a kol., 2004).

Vakcinace dendritickými buňkami. Za pomoci různých cytokinů (GM-CSF, IL-4) lze z periferních monocytů připravit velké množství dendritických buněk (in vitro). Ty se kultivují s nádorovými antigeny (lyzátem nádoru nebo apoptotickými nádorovými buňkami) a aplikují se pacientovi, kde stimulují jeho T-lymfocyty k protinádorové odpovědi. Tato vakcinace je ve fázi klinických II-III. zkoušek u pacientů s melanomem nebo karcinomem prostaty nebo ledvin (Hořejší & Bartůňková, 2009).

1.3.4.3 Adoptivní imunoterapie

Adoptivní imunoterapie je založená na reinfuzi lymfocytů, které jsme nejdříve nakultivovali se směsí cytokinů. V uplynulých letech však pokusy s LAK buňkami (lymphokine-activated killers) nepředstavovaly výraznější úspěchy (Escudier a kol., 1994).

1.4 Imunologie nádorů

Imunitní systém udržuje vnitřní prostředí organismu (homeostázu). Jeho hlavní funkcí je schopnost reagovat na nebezpečí a škodliviny, ať už vnější (mikroorganismy a jejich toxiny), nebo vnitřní (nádorově změněné buňky), a eliminovat je.

Imunitní systém obsahuje jednotlivé buňky, které kolují krevním a mízním řečištěm, buňky jednotlivých tkání a orgány těchto buněk. Orgány, kde dochází k vzniku a zrání buněk, jsou thymus a kostní dřeň. Všechny buňky vznikají z buňky kmenové (CD34+). Zrání krevních buněk z kmenových je řízeno faktory stimulující buněčné kolonie (CSF) a některými interleukiny (Bartůňková & Vernerová, 2002).

Látka, která je schopna vyvolat imunitní odpověď se nazývá antigen. Antigeny jsou bílkovinné, lipidové a cukerné povahy (proteiny, glykoproteiny, lipopolysacharidy).

1.4.1 Únik nádorů před imunitním systémem

Únikových mechanismů je celá řada, a proto je síla imunitního systému proti nádorovému onemocnění obvykle nedostatečná. Nádorové buňky jsou pomocí těchto mechanismů schopny uniknout imunitnímu systému, kdy se na tomto úniku podílejí jak nádorové buňky, tak buňky imunitního systému (hlavně s nádory asociované makrofágy-TAM a CD4+ CD25+ regulační T- lymfocyty (Hořejší & Bartůňková, 2009). Mechanismy, kterými nádorové buňky unikají útoku imunitního systému:

- Nízká imunogenicita (schopnost vyvolat imunitní odpověď), jelikož nádory jsou vlastní tkáň a antigeny vzniklé v důsledku mutací jsou slabé.
- Absence kostimulačních faktorů CD80 a CD86 (slouží k utlumení cytotoxických a pomocných T- lymfocytů). Jelikož jsou nádorové antigeny prezentovány lymfocytům bez kostimulačních molekul, dochází k navození tolerance nádorů.
- Snížená exprese MHC I (HLA I), díky tomu dochází k úniku před cytotoxickými T- lymfocyty.
- Produkce faktorů inhibující T- lymfocyty- nádory vylučují transformující růstový faktor TGF- beta, který vyvolává tvorbu Treg z CD4+ lymfocytů, ty potlačují atak cytotoxických lymfocytů. Další cytokin, který se podílí na navození nádorové tolerance, je IL- 10.
- Exprese značného množství Fas ligandu. Pokud se tento FasL dostane do kontaktu s Fas receptorem, dojde k apoptóze infiltrujících lymfocytů (buňka s Fas receptorem). Nádory snižují hladinu Fas receptorů, čímž se stávají odolnými proti apoptóze a posilují FasL, který likviduje lymfocyty (působí i na neutrofile) a přispívá k imunotoleranci (Bartůňková, 2002).

1.4.2 Složky imunitního systému

Imunitní systém vykonává určité funkce, kde hrají roli krevní buňky a humorální faktory. Některé buňky putují krevním a mízním oběhem, a pokud jsou potřeba, vyběhnou do místa zánětlivé reakce. Další buňky imunitního systému se nacházejí ve tkáni a nikam necestují. Složky imunity se dělí podle svého uplatnění v imunitní reakci. Humorální

imunita, která je zajištěna protilátkami a systémem krevních bílkovin (komplementem) a buněčná imunita, kde hrají důležitou roli fagocytující buňky.

Mechanismy imunitního systému můžeme rozdělit na 2 typy- vrozené (nespecifické) a získané (specifické), které se vzájemně doplňují. Do vrozené imunity patří granulocyty, komplement, makrofágy/ monocyty a NK buňky (přirození zabijáci). Lymfocyty T a B tvoří složku získané imunity (Bartůňková & Vernerová, 2002).

Poslední ochranou proti nádorovému bujení je imunitní reakce na nádorové buňky. Pokud dojde k přeměně buněk na buňky nádorové, imunitní systém musí rychle a efektivně zareagovat a eliminovat je. Z hlediska velkého výskytu zhoubných nádorů se zdá být imunitní odpověď na nádorové bujení nedostatečně účinná, ovšem tak tomu není. Během života zřejmě dochází k nádorovému bujení častěji a imunitní systém zřejmě podobné výskyty několikrát řešil. Se zvyšujícím se věkem klesá funkce imunitního systému, a proto pak častěji dochází k propuknutí nádorového onemocnění.

Dříve se myslelo, že účinnější složkou protinádorové imunity je specifická imunita, protože se předpokládalo, že nádorové buňky mají na svém povrchu nádorové antigeny, které specifická imunita rozpozná jako cizí a navodí imunitní odpověď. Ovšem nádory, přirozeně se vyskytující u člověka, nejsou schopné navodit dostatečnou imunitní reakci (nejsou vysoce imunogenní). V současnosti je tedy jasné, že právě přirozená imunita je v protinádorové imunitě efektivnější a rozhodující. (Krejsek & Kopecký, 2004).

1.5 Získaná imunita

Získaná (specifická) imunita je evolučně mladší (objevila se až s obratlovci), antigenně specifická, reaguje na cizorodou částici pomocí vysoce specifických molekul (protilátky, antigenně specifické receptory T- lymfocytů a k její aktivaci dojde až po setkání s antigenem. Charakteristickým rysem těchto specifických reakcí je imunologická paměť. K získané imunitě se řadí mechanismy humorální, které jsou založené na protilátkách, a buněčně zprostředkované (založené na T- lymfocytech). K úplnému rozvoji specifické imunity dochází za několik dní až týdnů. Řadí se sem T a B lymfocyty.

1.5.1 Lymfocyty

T lymfocyty dozrávají v thymu a dokáží zprostředkovat specifickou imunitu. Aby mohla specifická imunita fungovat, musí spolupracovat s imunitou vrozenou. Specifická imunitní odpověď zprostředkovaná T-lymfocyty brání organismus proti všem typům infekcí

a proti nádorovému bujení. Když T-lymfocyty dozrají, dostávají se do krve a poté migrují přes lymfatické tkáně zpět do cévního řečiště. Naivní T lymfocyty (T lymfocyty, které se ještě nesetkaly s antigenem) prochází z krevního řečiště do tkání, dokud se nepotkají s antigenem. Antigen dokáže T lymfocyty rozpoznat, jen když jsou ve spojení s MHC molekulami (v antigen prezentujících buňkách (APC) vznikají peptidické fragmenty, které představují antigen). Příkladem antigen prezentující buňky jsou dendritické buňky. Když dojde k rozpoznání antigenu pomocí receptoru na T lymfocytech (receptor pro antigen), dojde k rozšíření daného T lymfocytu. T lymfocyty jsou rozděleny na subpopulace CD4+ , které pracují jako buňky pomocné (Th buňky) a buňky supresorické Treg, a CD8+, pracující jako cytotoxické buňky (Tc buňky). Subpopulace CD4+ se dělí na další dva subsety Th1 (imunitní reakce proti bakteriálním patogenům), které produkují zejména IL- 2 a IFN- γ a Th2 (imunitní reakce proti mikroorganismům), které produkují hlavně IL- 4, IL- 5, IL- 6 a IL- 10. Tyto subsety se od sebe liší odlišnou produkcí cytokinů a funkcí (Krejsek & Kopecký, 2004).

Dalšími jsou například Th0 klony, které produkují směs cytokinů typu 1 a 2. Th3 jsou T- lymfocyty, u kterých je charakteristická intenzivní produkce TGF- β , Další subpopulací T- lymfocytů jsou Th17, které sekretují IL- 17 (má výrazné prozánětlivé vlastnosti), zvyšují aktivitu neutrofilů. Tyto buňky si diferencují z Th0 lymfocytů. Dále tyto Th17 buňky produkují IL- 21, který aktivuje NK buňky a tím se zesiluje zánětlivá reakce (Hořejší & Bartůňková, 2009).

Když dojde k eliminaci infekce, dojde k zeslabení aktivity T lymfocytů. Některé jsou zničeny apoptózou, jiné antigen specifické T lymfocyty se přemění na paměťové buňky (Hořejší & Bartůňková, 2009)(Krejsek & Kopecký, 2004).

B lymfocyty jsou typické buňky specifické humorální imunity. Jejich vývoj probíhá v kostní dřeni. Pokud jsou zralé, mají na svém povrchu receptory pro antigen (imunoglobulinové molekuly). Aby mohlo dojít k aktivaci B lymfocytu a tím i k tvorbě protilátek, musí B lymfocyty spolupracovat s T lymfocytárním systémem (pomocnými signály subsetu Th2 T lymfocytů). B lymfocyty mohou také fungovat jako antigen prezentující buňky T lymfocytům, protilátkami mohou ovlivňovat mechanismy přirozené imunity. B lymfocyty, které jsou již diferenciovány, se hromadí v sekundárních lymfatických orgánech (Krejsek & Kopecký, 2004).

1.6 Přirozená imunita

Přirozená (nespecifická) imunita obsahuje složky jako je komplementový systém, fagocytující buňky a NK buňky. Je to vývojově starší systém, jelikož schopnost fagocytózy měly již jednobuněčné organismy. Reakce těchto složek je na přítomnost antigenu velmi rychlá a vždy stejná (uniformní), nezávisle na tom, zda už se s antigenem dříve setkala, nebo ne.

Nespecifické mechanismy imunity jsou založeny na rozpoznání chemických struktur charakteristických pro mikroorganismy. Mezi humorální složky nespecifické imunity patří komplement, interferony, lektiny a jiné sérové proteiny a mezi složky buněčné patří přirozeně cytotoxické nebo fagocytující buňky. Systém fagocytů vytváří buněčnou složku přirozené imunity, patří mezi ně monocyty/ makrofágy, polymorfonukleární leukocyty (s výjimkou basofilů) a dendritické buňky, které hrají hlavní roli ve zpracování a prezentaci antigenu T lymfocytům, čímž vytvářejí spojnici mezi nespecifickou a specifickou imunitou. Hrají zde důležitou úlohu MHC glykoproteiny, díky kterým jsou na povrchu APC vystavovány fragmenty proteinů jimi pohlcených (Hořejší & Bartůňková, 2009).

Fagocytóza je proces, kde dochází k cestování za škodlivinou (chemotaxe), rozpoznání, pohlcení, zpracování (nebo usmrcení). Cizorodou částici fagocytární buňky poznají pomocí receptorů pro bakteriální složky (lipopolysacharid, lektiny), nebo pomocí receptorů, které rozpoznají Fc část protilátky nebo složky komplementu (Bartůňková & Vernerová, 2002).

Pokud dojde k zánětlivé reakci, fagocytární buňky uvolní mediátory zánětu, prozánětlivé interleukiny a faktor nekrotizující nádor (TNF).

1.6.1 Makrofágy

Mezi buňky protinádorové imunity se řadí leukocyty, které vytvářejí charakteristické mikroprostředí nádoru. Leukocyty se vyskytují ve stromatu a nádorové tkáni, a pokud infiltrují nádor, mohou ho podporovat v jeho růstu a rozšiřování. Také mohou způsobit snížení imunity (imunosupresi), což je typické pro nádorové onemocnění.

Makrofágy, které vznikají z monocytů (prekurzor makrofágů), tvoří většinu leukocytů v nádoru. Jde o makrofágy asociované s nádorem (Tumor Associated Macrophages). Monocyty se do nádoru dostávají cíleně, pomocí cytokinů. Tyto cytokiny v prostředí nádoru zajistí delší přežití makrofágů a společně vytváří cytotoxicitu vůči

nádorovým buňkám. Makrofágy dokáží poškodit endotel cév a tím ovlivnit růst nádoru (negativně). Ovšem někdy mohou makrofágy asociované s nádorem růst nádoru podporovat, a tím i jeho metastazování (Krejsek & Kopecký, 2004).

1.6.1.1 Rozpoznání přítomnosti patogenů vrozenou imunitou

Receptory vrozené imunity rozpoznávají molekuly patogenních mikroorganismů, které označujeme PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns). Příkladem mohou být endotoxiny (lipopolysacharidy) společné pro gramnegativní bakterie, peptidoglykany (typické pro grampozitivní bakterie), glukany a mannany charakteristické pro kvasinky a plísně. Pro tyto typické mikrobiální komponenty jsou na fagocytech přítomny různé druhy membránových receptorů PRRs (Pathogen Recognition Receptors). Tyto receptory umožňují vrozené imunitě rozpoznat i nebezpečnou invazi a spustit obrannou zánětlivou reakci, kterou následuje aktivace získané imunity. PRRs se dělí podle jejich funkce na sekretované, signální a fagocytární (Hořejší & Bartůňková, 2009) (Krejsek & Kopecký, 2004).

Sekretované receptory fungují jako opsoniny (váží se na mikrobiální stěny), které označují částici jako cizorodou. To umožní fagocytům a komplementu rozpoznat mikrobiální povrchy. Nejznámějším sekretovaným receptorem je sérový lektin vázající mannosu (mannose-binding lectin, MBL), dalším příkladem je C-reaktivní protein (CRP). Tyto receptory se váží na PAMPs různých patogenů a tím spouští komplementovou kaskádu, která vede k opsonizaci patogenů a urychlení fagocytózy.

Fagocytární receptory se nacházejí na povrchu fagocytujících buněk (makrofágy, dendritické buňky, neutrofilů). Fagocytózu zprostředkují interakce mezi povrchovými lektiny (proteiny schopné vázat sacharidy) fagocytů a sacharidy (součástí mikrobiálních glykoproteinů a polysacharidů). Když dojde k rozpoznání mikrobiálních PAMPs, zajistí PRRs jejich vazbu na povrch fagocytů, které způsobí jejich usmrcení a rozkládání v lysosomu. Tímto způsobem vznikají antigenní fragmenty, které jsou ve spojení s MHC molekulami II. Třídy prezentovány T-lymfocytům na povrchu APC. Nejvýznamnějším fagocytárním receptorem je manózový receptor (vyskytuje zejména na makrofágách), který rozeznává polysacharidy obsahující D-mannosu. Dalšími zástupci této třídy jsou Scavenger (úklidové) receptory, N-formyl Met receptory a Dectin 1 (Krejsek & Kopecký, 2004) (Hořejší & Bartůňková, 2009).

Signální receptory hrají hlavní roli ve spouštění systému vrozené imunity. Nejvýznamnějšími signálními receptory jsou TLR (Toll-like receptory), které dokáží

rozeznat chemické struktury charakteristické pro různé patogeny- lipopolysacharidy, lipoproteiny, prokaryotické a virové nukleové kyseliny. Některé z těchto receptorů mohou být také stimulovány molekulami organismu vlastními, které se uvolňují při stresovém nebo nekrotickém poškození tkáně a slouží jako signály nebezpečí (podobně jako PAMPs). Některé TLR jsou umístěny na povrchu buněk, jiné v intracelulárních membránách (TLR 3, 7, 8, 9). Signální receptory aktivují geny pro prozánětlivé cytokiny (IL- 1, IL- 6, TNF, IL- 8) a geny pro některé adhezivní a kostimulační receptory na povrchu APC. Sekrece cytokinů a indukce membránových receptorů je důležitá pro regulaci imunitní odpovědi (interagují s antigenně specifickými složkami imunitního systému). Dalším příkladem signálních receptorů jsou cytoplasmatické NOD- like receptors (NLRs), které mají podobnou funkci jako TLR (Hořejší & Bartůňková, 2009).

1.6.2 Dendritické buňky

Dendritické buňky jsou v nádorové tkáni zastoupeny rovnoměrně jako makrofágy. Hrají důležitou roli pro spuštění specifické imunitní odpovědi a jsou schopné spojit přirozenou a specifickou imunitu. Dendritické buňky exprimují velké množství molekul II. třídy hlavního histokompatibilního komplexu (molekuly MHC II) a prezentují antigen T lymfocytům. Dendritické buňky asociované s nádorem (Tumor Associated Dendritic Cells) mohou být nezralé a tím může dojít k snížení T-lymfocytární imunity. Nebo jsou plně vyvrálé a ty dokáží spustit imunitní reakci v okolí nádoru. Pokud dojde k zachycení antigenu, dendritické buňky migrují do lymfoidních orgánů, kde dojde k vlastní imunitní reakci (presentují antigen lymfocytům). Díky tomu dojde k rozšiřování antigen specifických T lymfocytů a hned poté se aktivují B lymfocyty (Krejsek & Kopecký, 2004).

Dendritické buňky jsou neúčinnějšími antigen- prezentujícími buňkami, proto jsou využívány jako vakcíny proti nádorům. Byly vyvinuty různé strategie, které mají za cíl dodat tumor- associated antigens (TAAs) do dendritických buněk pomocí nádorové RNA, nádorových lyzátů nebo apoptopických nádorových buněk, které vyvolávají a posilují protinádorovou imunitní odpověď. Ovšem existuje alternativní strategie, která indukuje protinádorovou imunitu. Jedná se o použití buněk získaných fúzí dendritických buněk a nádorových buněk, jelikož fúze dendritických a nádorových buněk vyvolává silnou protinádorovou imunitní odpověď. Tato fúze buněk nabízí několik výhod pro prezentaci nádorových peptidů a následné indukce protinádorové imunity: **zpracování a prezentace neidentifikovaných TAA** (čímž obchází nelehký úkol poznat jednotlivé TAA), **prezentace více TAA** (čímž se zvyšuje frekvence T- buněčné odpovědi a maximalizace protinádorové

imunity), dále **hojná prezentace TAA kostimulačních molekul** (čímž se zabrání možné indukci tolerance) a **aktivace polyklonálních CD4+ a CD8+ T- buněk** (čímž pomáhá T-buňkám, aby došlo k indukci CTL odpovědi)(Koido a kol., 2013).

1.6.3 Polymorfonukleární leukocyty (granulocyty)

Granulocyty jsou velmi důležitou složkou přirozené imunity, jsou nejpočetnější třídou leukocytů. Granulocyty se dělí na neutrofilů, eozinofilů a bazofilů. Pouze neutrofilů a eosinofilů dokáží pohlcovat mikroorganismy, usmrtit a rozložit je. Další důležitou funkcí granulocytů je jejich produkce cytokinů, protože díky nim mohou zasahovat do funkcí imunitních reakcí. Ve svých granulích mají řadu biologicky aktivních látek (hydrolytické enzymy, proteoglykany a hlavně biogenní aminy- histamin a serotonin), které se během imunitní reakce (zánětu) uvolňují a tím eliminují infekční agens. Granulocyty jsou schopny též poškozovat i struktury vlastního těla (Krejsek & Kopecký, 2004).

1.6.4 NK buňky

Mezi buňky protinádorové imunity patří NK buňky, které jsou velmi důležitou složkou přirozené imunity, i když tvoří pouze 5-10% mononukleárních buněk (směs buněk lymfocytární a monocyto-makrofágové řady) v periferní krvi. Pokud dojde ke styku s poškozenou buňkou, NK buňky reagují velmi rychle i bez předchozí zvýšené citlivosti a jejich cytotoxicita není závislá na přítomnosti antigenů HLA systému (French & Yokoyama, 2003), (Smyth a kol, 2001). NK buňky dokáží rozpoznat a následně zabít buňky, které nenesou na svém povrchu dostatečné množství molekul HLA 1. Třídy (Gross & Walden, 2008), jelikož nádorovým buňkám chybí MHC molekuly (u lidí HLA) a díky tomu se kryjí před působením cytotoxických T- lymfocytů. Tato absence MHC molekul umožňuje NK buňkám rozpoznat nádorové buňky a zničit je. NK buňky mají na svém povrchu receptory pro MHC molekuly, pokud jsou tyto receptory obsazeny MHC molekulou, působení NK buněk inhibuje, ale pokud nejsou obsazeny MHC molekulou, dojde ke zničení postižené buňky NK buňkami (Jílek, 2005).

NK buňky se objevují ve všech orgánech těla, ovšem v každém orgánu mají jiné zastoupení. V lymfatických orgánech je 10krát vyšší počet NK buněk než v periferní krvi (Gregoire a kol., 2007). Dále se vyšší počet NK buněk vyskytuje v plicích, játrech a slezině (Ferlazzo a kol., 2004).

Pokud jsou NK buňky aktivované, vytváří se řada cytokinů a chemokinů, které se účastní imunitní reakce, jelikož vedou k autokrinní (buňka je přeměněna díky účinku

růstového faktoru a váže se na membránové receptory té samé buňky, která ho vyrobila) a parakrinní (zde se váže vznikající růstový faktor na membránové receptory jiné buňky) aktivaci buněk. Tímto způsobem regulují NK buňky přirozenou i získanou imunitní reakci (Biron a kol., 1999).

Na povrchu NK buněk se objevují molekuly, které fungují jako receptory pro adhezivní molekuly cytokiny a chemokiny. Díky těmto receptorům můžeme NK buňky rozpoznávat. Například molekulu CD7 mají na svém povrchu všechny NK buňky. Normální krevní lymfocyty vystavují na svém povrchu CD56 i CD3 molekuly, zatímco NK buňkám zcela chybí receptor pro T-lymfocyty (CD3 molekula) (Robertson & Ritz, 1990). Molekula CD56 je hlavní membránová molekula NK buněk, jiná molekula na povrchu většiny NK buněk je CD16 (Lanier a kol., 1986).

1.6.4.1 Proč NK buňky nejsou tak účinné proti nádorům?

Absence MHC molekul vede sice k umožnění ataku NK buněk, ale jejich ataku se nádorová buňka brání expresí MHC Ib molekul (u člověka HLA- G). HLA- G se nachází jen na povrchu buněk trofoblastu (část placenty pocházející z plodu) a váže spousty peptidů. Buňky trofoblastu neexprimují klasické MHC I molekuly a proto nemohou být T- buňkami rozpoznány. Aby se buňky trofoblastu nestaly terčem NK buněk, jsou na tyto buňky specificky exprimovány neklasické MHC I molekuly HLA- G. Tyto HLA- G s peptidy jsou rozpoznávány inhibičními receptory NK buněk a přispívají tak k toleranci plodu v děloze. NK buňky nemají univerzální inhibiční receptor, který by rozeznal všechny izotypy a formy MHC I. Jednotlivé klony NK buněk vystavují na svém povrchu různé kombinace inhibičních receptorů. Inhibiční receptory jsou buď imunoglobulinové skupiny (jsou pouze na lidských NK buňkách, tzv. KIR (killer inhibitor receptors) nebo C- lektinové skupiny. C- lektinové skupiny jsou jak u myši (receptory Ly- 49), tak na lidských NK buňkách (heterodimer CD94/ NKG2A). Výsledná reakce NK buněk tedy závisí na tom, zda převáží stimulační nebo inhibiční signály (Hořejší & Bartůňková, 2009).

1.6.4.2 Cytokiny v onkologii

Proliferace normálních (nenádorových) buněk je také regulována různými faktory a cytokiny. Ale pokud se tato regulace vymkne kontrole zdravých tkání, vzniká zhoubný nádor. K proliferaci nádorových buněk patří také jejich autokrinní a parakrinní podpora. Cytokiny se účastní regulačních mechanismů, jako je proliferace nádorového bujení, ovlivňují růst nádorů, také metastazování a vývoj a růst nových krevních cév (angiogenézi).

Mezi cytokiny vyskytující se u mechanismů protinádorové imunity patří interleukin-1 (IL-1), IL-2, TNF- α nebo interferony. Interferony se v onkologii vyskytují nejdéle, především INF- α . Nejlepších účinků INF- α bylo dosaženo u adenokarcinomu ledviny, **maligního melanomu** a karcinomu děložního čípku (Klener, 1997). U interleukinů je nejvíce známý svým klinickým uplatněním IL-2, který se stal společně s INF- α běžným využitím k léčbě pro metastazující adenokarcinom ledviny, také se zjistily určité úspěchy v léčbě maligního melanomu. Dále IL-2 slouží k aktivaci a množení LAK buněk v pokusech in vitro, které se poté zpětně podávají pacientovi (Bubenik a kol., 2003), (Escudier a kol., 1994).

U parakrinní stimulace, která ovlivňuje proliferaci endotelií a fibroblastů (má význam pro nově se vytvářející cévy v nádoru), je známým cytokinem TGF- α . Zvýšená exprese tohoto cytokinu se často vyskytuje u transformovaných nádorových buněk. Tato exprese je navozena onkogeny (geny podílející se na vzniku nádoru) nebo kancerogeny (látka, vyvolávající nádory). Urychlení vzniku nádoru pomocí TGF- α bylo zjištěno u epiteliálních nádorů (prs, ledviny).

Mezi další cytokiny patří TGF- β , který má dvě funkce v nádorovém růstu. Dokáže tlumit imunitní reakce a tím usnadňuje vznik nádoru, oslabuje totiž proliferaci i funkci buněk, které zprostředkovávají imunitní odpověď (imunokompetentní buňky). Druhou funkcí je stimulace růstu nádoru, pomocí parakrinního účinku na stromální části nádoru (Klener, 1997).

Stroma nádorů je tvořeno makrofágy. Tyto makrofágy samy produkují mediátory, které podporují proliferaci nádorových buněk, angiogenezi a metastazování. U rostoucího nádoru se uvolňují chemokiny, které umožňují vstup neutrofilů. Tyto neutrofilové dále uvolňují mitogeny a faktory působící na vznik cév, čímž vzniká pro růst nádoru vhodné prostředí (Yan a kol., 2006).

1.6.4.3 Chemokiny a jejich receptory

Ve využití NK buněk v experimentech, které se zabývá protinádorovou terapií, mají důležitou roli chemokiny a jejich receptory. Chemokiny jsou skupiny malých, strukturně příbuzných molekul, které regulují dopravu různých typů leukocytů pomocí interakcí sedmi-transmembránových proteinů a G-protein vázaných receptorů (Zlotnik & Yoshie, 2000). Chemokiny a jejich receptory hrají také důležitou roli při zrání dendritických buněk, infekci, při angiogenezi a růstu nádorů (Rossi & Zlotnik, 2000).

Díky účinku chemokinů jsou do mikroprostředí nádoru přinášeny T lymfocyty, dendritické buňky, granulocyty, makrofágy i NK buňky, které společně vytváří protinádorovou imunitu. Všechny tyto buňky určují, jak proběhne imunitní reakce. Zda dojde k odmítání nádoru (melanom), nebo se zvýší invazivita nádoru spolu s metastazováním (karcinom prsu) (Balkwill, 2004).

1.6.5 Komplementový systém

Komplement je humorální část vrozené imunity. Je to systém asi 30 sérových a membránových proteinů (produkované jaterními buňkami, popřípadě makrofágy). Obsahuje devět základních složek (C1-C9) (Bartůňková & Vernerová, 2002). Po různých podnětech se aktivují jednotlivé složky (kaskádovitá aktivace). Hlavní složkou je C3, jejíž fragment C3b se kovalentně váže na mikrobiální povrch. Komplex proteinů C5b, C6, C7, C8, C9- tzv. MAC (membrane attack complex) je konečným produktem komplementové kaskády. Tento MAC dokáže perforovat membrány (vytvoří se v nich póry) některých mikroorganismů, způsobovat jejich lýzu a tím je usmrtí. Hlavními funkcemi komplementu jsou opsonizace (C3b), chemotaxe (C3a, C5a) a osmotická lýza (C5b- C9). Další složkou komplementu je imunokomplex obsahující fragmenty C3dg stimuluje aktivaci B- lymfocytů, imunokomplexy obsahující fragmenty C3b regulují transport antigenů do sleziny a uzlin. Komplement se může aktivovat třemi způsoby- **klasickou**, kdy se komplement aktivuje komplexem antigen- protilátka, **lektinovou**, kde je aktivátorem lektinů vázající mannosu (MBL) a **alternativní** cestou, kdy k aktivaci dojde kontaktem složky C3 s patogenním povrchem (Hořejší & Bartůňková, 2009).

1.6.6 Nádorová onemocnění a vrozená imunita

Původní předpoklad, že buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách (ADCC) získané imunity, hraje nejdůležitější roli v boji proti nádorovému onemocnění, byl v roce 1999 narušen. Profesor Zheng Cui objevil mutaci SR/ CR u jedné myši BALB/c, čímž poukázal na to, že nádory mohou být ničeny vrozenou imunitou. Z této myši BALB/ c vznikl kmen rezistentních myši- SR/ CR myši (myši se schopností spontánní regrese nebo kompletní rezistencí). Tyto myši dokáží odolat vysokým dávkám nádorových buněk, které jsou pro divoký typ (WT) myši smrtelné i v malé dávce. Leukocyty myši s SR/CR mutací dokáží rozeznat nádorové buňky jako cizorodé a rychle je zničí, proto jsou tyto myši tak odolné vůči nádorům. SR/ CR myši se umí vypořádat s nádorovými buňkami bez předešlého kontaktu, z čehož vyplývá, že protinádorová odpověď vychází z vrozené imunity (Hicks a kol., 2006).

Na myš BALB/ c, u které byla objevena mutace SR/ CR bylo nemožné transplantovat sarkom S180 (ani při použití vysokých dávek) (Cui a kol., 2003).

V dalších studiích se prokázalo, že přenesením leukocytů z SR/ CR myši na jiné normální, nemutované myši nesoucí sarkom S- 180, ale i mnohé jiné nádory, je možné dosáhnout výrazných terapeutických efektů. V případě myši se sarkomem S- 180 byla výsledkem stabilizace nebo kompletní vymizení nádorů (9 ze 14), kdy myši s úplnou regresí zůstaly bez známek nádorového růstu po dobu 10 měsíců. Z těchto výsledků vyplývá, že buňky vrozené imunity SR/ CR myši rozeznávají určité vlastnosti společné všem nádorovým buňkám a tím dochází k jejich likvidaci (Hicks a kol., 2006).

Také se zjistilo, že mutace SR/ CR závisí na stáří myši, kdy u mladších myši (mladší než 4 měsíce) došlo k úplné rezistenci proti transplantovaným nádorům (complete resistance, odtud CR). U starších myši se nádory sice přijaly, ale byly následně postupně zlikvidovány (spontaneous regression, odtud SR)(Hicks a kol., 2006).

Také byla provedena studie, kde se zjistilo, že mutace SR/ CR se dá přenést na myši jiných linií- křížením dojde k přenosu mutace na potomky. Byly využity myši linie C57BL/ 6, CAST/ Ei nebo nahé myši (nude mice), které postrádají thymus. Jelikož se u myši bez thymu vyskytují T- lymfocyty velmi málo, dokázalo se, že k zničení nádoru je zapotřebí vrozené imunity (NK buňky, neutrofily, makrofágy) (Cui a kol., 2003) (Hicks a kol., 2006).

1.7 Nádorová terapie pomocí Zymosanu A a lipopolysacharidu (LPS)

Podle prof. Cui lze navodit atak vrozené imunity na nádorové buňky, je ovšem zapotřebí, aby je rozeznaly. Jakým způsobem rozeznávají nádory myši s SR/CR mutací není dosud známo. Jelikož normální myši tuto schopnost postrádají a jelikož na nádorech nejsou PAMPs, proto se v naší práci snažíme uměle navázat PAMPs (Zymosan A) na povrch nádorových buněk. Dále řešíme jeho synergii s LPS (signální ligand).

1.7.1 Zymosan

Zymosan, dříve známý jako zymín nebo Eckerova frakce (podle jeho přípravy, kterou poprvé navrhl Pillemer a Ecker), je známé činidlo pro zkoumání zánětlivé reakce. Je připravovaný z buněčné stěny kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* (Aimanianda a kol., 2009). Buněčné stěny jsou získávány jako odpad při výrobě bílkovin pro krmiva nebo k výživě lidí. Existují dva typy Zymosanu A a B. Zymosanové částice jsou složeny

především z beta- glukanu a mannanu (Di Carlo & Fiore, 1958). Tyto sloučeniny jsou rozpoznávány vrozenou imunitou.

1.7.1.1 Zymosan A a jeho protinádorové působení

Bylo již potvrzeno, že stimulace vrozené imunity proti transplantovaným nádorům je závislá na určité dávce Zymosanu A. Počáteční experimenty ukázaly, že příliš vysoké dávky Zymosanu A způsobují smrt myši (bakteriemií střevního původu). Dále se zkoušelo, zda dojde k aktivaci obranné reakce i po aplikaci nižší dávky Zymosanu A. K regresi nádoru docházelo, pokud byl Zymosan injikován čtyři, tři 3 nebo jeden den před nebo po implantaci nádoru. V pokusech prováděných v polovině 20. století se zaznamenal terapeutický účinek Zymosanu A u myšního sarkomu S- 180 . Samotný Zymosan A se aplikoval intraperitonálně. Díky této terapii došlo k výrazné regresi nádoru (přes 50%) (Bradner & Clarke, 1959).

Také byl zaznamenán pozitivní účinek podání Zymosanu zvířatům po chirurgickém odstranění zhoubných nádorů, kdy docházelo k nižšímu výskytu metastáz a delší životnosti. (Holan a kol., 1980).

Byly shromážděny informace, které dokazují opačné působení Zymosanu, tedy že Zymosan blokuje regresi nádoru, v závislosti na podání různého množství Zymosanu. U experimentálních zvířat, kterým byl podán Zymosan, bylo dokonce prokázáno, že tumor roste a zabíjí svého hostitele stejně jako u neléčených (kontrolních) skupin (Bradner & Clarke, 1959).

Mezi receptory rozpoznávající komponenty Zymosanu A patří:

- Signální receptor TLR 2, který rozpoznává Zymosan A, jelikož obsahuje beta glukán, který TLR 2 v heterodimeru TLR 6 dokáže detekovat.
- Fagocytární receptor Dectin- 1 je lektinový receptor, který je specifický pro beta glukán, vyskytuje se na povrchu makrofágů a neutrofilů. Spolu s TLR 2 produkují prozánětlivé cytokiny a chemokiny (Zeković a kol., 2005).
- Manózový receptor (MR) patří mezi fagocytární PRR, hlavním úkolem je vyvolat vrozenou imunitu, aby došlo k zlikvidování gramnegativních nebo grampozitivních bakterií procesem fagocytózy.
- Sekretovaný receptor manózu vázající lektin (MBL) je sérový protein, který má nejdůležitější význam v prvních hodinách/ dnech přirozené imunitní reakce- vyrábí se v játrech při akutní fázi infekce, poté je vylučován do

plazmy. Dokáže rozpoznat manan a navázat se na něj (Janeway & Medzhitov, 2002).

1.7.2 Beta glukán

Beta glukany jsou polysacharidy, které mají dlouhý řetězec a jejich strukturální jednotkou je glukóza. Glukóza má v řetězci vazby v pozicích 1,3 a 1,6 (Chovancová & Šturdík, 2005). Primární struktury, větvení a molekulová hmotnost ovlivňují výrazně jeho biologické vlastnosti (Zeković a kol., 2005).

Hlavní složkou buněčných stěn jsou 1→3, 1→6-β-glukany spolu s 1→3-β-glukanhydrolázami a syntázami. Biologicky aktivní glukany jsou izolovány z mnoha druhů hub a tyto glukany hub jsou svou strukturou velmi podobné struktuře kvasinek. Hlavní řetězec 1→3 spojený β-D-glukopyranosylovou jednotkou, podél níž se rozvětvují vedlejší řetězce z β-D-glukopyranosylových jednotek spojených, 1→6 vazbou (Zeković a kol., 2005).

1.7.2.1 Beta glukany a imunitní reakce

Mezi hlavní biologické účinky beta glukánů patří zvýšení odolnosti proti virovým, bakteriálním, parazitickým infekcím, protinádorová aktivita, prevence kancerogeneze (proces tvorby nádorů).

Hlavní úloha beta glukánů je aktivace imunitních buněk- makrofágů. Beta glukany jsou rozpoznávány leukocyty (makrofágy, monocyty) a NK buňkami pomocí specifických receptorů (Chovancová & Šturdík, 2005).

Ochranný účinek 1→3-β-glukanů je vysvětlen jako zvyšující se obranyschopnost organismu pomocí aktivace makrofágů, stimulaci T-buněk a aktivace NK buněk. Makrofágy jsou nejlepším cílem pro 1→3-β-glukany. Pokud dojde k aktivaci makrofágů beta glukany, zvyšuje se jejich počet a stimuluje se sekrece tumor nekrotizujícího faktoru. Makrofágy se aktivují pomocí Toll-like receptorů 2.

Nedávno byl izolován receptor dectin-1, který dokáže rozpoznat rozpustné a nerozpustné 1→3-β-glukany a 1→6-β-glukany, a tím dochází k různé buněčné odpovědi (fagocytoza, endocytóza). Synergie mezi dectinem-1 a TLR 2 může navodit produkci protizánětlivých cytokinů a chemokinů (TNF), makrofágů, dendritických buněk (Zeković a kol., 2005).

1.7.2.2 Beta glukán a jeho protinádorové působení

U experimentálních zvířat má zymosan a jiné 1→3-β-glukany významný protinádorový účinek proti různým druhům spontánních a transplantovaným nádorům. Potlačení růstu karcinomu zvířat a myšího melanomu B16 bylo zjištěno i u samotného beta glukánu. Zjistilo se, že glukán, využívající se terapeuticky, by mohl potlačit jaterní metastázy a zvýšit dobu přežití (Zeković a kol., 2005) (Diller a kol., 1963).

Beta glukany tedy představují přímou protinádorovou aktivitu proti různým nádorům a také zabraňují metastazování. Příkladem je histologický rozbor tkáně melanomu, do kterého byla injikována beta glukánová suspenze, kde došlo k výskytu zvýšeného počtu makrofágů a absenci tumoru (Velíšek, 2002).

Nicméně, jiné studie uvádějí, že beta glukany mají tlumivé účinky na činnost makrofágů a potlačují jejich fagocytární aktivitu. Tyto různé účinky beta glukánů imunitní reakci může být způsobeno rozdíly v chemické povaze různých beta glukánů (Fuentes a kol., 2011).

1.7.3 Manan

Manan se nachází v buněčné stěně mikroorganismů- na buněčné stěně kvasinek a gramnegativních bakterií. Je to polysacharid složený z D- manózy spojených glykosidickou vazbou (Lipke & Ovalle, 1998). Manan je velmi antigenní látka, slouží jako PAMPs pro vazbu PRRs, ta je zprostředkována receptory – MBL a MR na povrchu makrofágů (Yeepree a kol., 2006), což vede k aktivaci komplementového systému (lektinovou cestou) (Hořejší & Bartůňková, 2009).

1.7.3.1 Manan a jeho protinádorové působení

Bylo zjištěno, že volný manan nezpůsoboval žádnou redukci nádorového růstu u myši C57BL/6N (Bruzlová, 2012), jelikož nedokázal zajistit aktivaci fagocytárního receptoru ligandy vázanými na povrch mikroorganismů (Underhill & Gantner, 2004). Ale i pouhá aminace mananu vedla k protinádorovému účinku (aktivace MR, MBL) (Bruzlová, 2012).

Mohutný protinádorový účinek se projevil u kotveného mananu pomocí BAM v kombinaci s LPS a LPS/ LTA, což plně potvrzuje názor Underhilla a Gantnera (2004) o spolupůsobení signální a fagocytární signalizace. U této terapie došlo i k ojedinělému úplnému zničení nádoru (Bruzlová, 2012).

Jako nejúčinnější terapie se projevila pulzní terapie (v den0, 2, 4, 6, 8, 10) pomocí manan- BAM s LPS, kdy došlo k vyléčení čtyř myší, které překonaly 100 denní hranici (Maierová, 2012)

Další studie se zaměřila na kotvení mananu pomocí kovalentní vazby SMCC ve spojení s LPS, kde došlo k přechodnému vymizení nádorů u tří myší, kde byla redukce nádorového růstu vůči kontrole 92,6 % (Maierová, 2012).

1.7.4 Lipopolysacharid (LPS)

Lipopolysacharid je hlavní složkou vnějších buněčných membrán gramnegativních bakterií. Díky jeho chemické struktuře funguje jako primární cíl imunitních procesů. LPS má toxikologickou aktivitu, která má vliv na patogenitu buňky.

LPS se skládá ze tří samostatných oblastí- lipid A, korová oblast a polysacharidový řetězec. Polysacharidový řetězec se nemusí vyskytovat u všech strukturních variant. Lipidická a cukerná složka se liší svou chemickou strukturou a biologickou aktivitou (Weckesser a kol., 1979).

1.7.4.1 Složky LPS

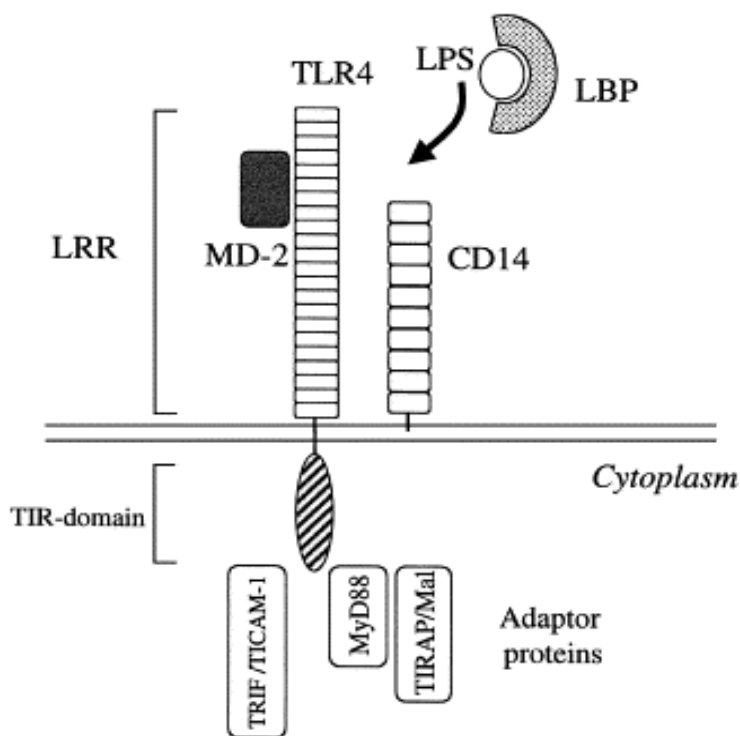
Lipid A je zakotven ve vnější membráně, zatímco zbytek LPS vyčnívá nad povrch buňky. LPS je k ostatním složkám buněčné stěny vázán silnými hydrofobními vazbami a z živých buněk se tedy uvolňuje až když by došlo k jejich poškození. U molekuly LPS má právě lipid A schopnost vyvolat infekci a toxicitu.

Korová oblast (vnitřní kůra) je heterosacharidová složka LPS, která je dále tvořena 2 podjednotkami, vnitřní a vnější korovou oblastí (Huang a kol., 2012).

1.7.4.2 Funkce LPS

LPS aktivuje mnoho transkripčních faktorů, které se stanou aktivními až po stimulaci lipopolysacharidem. Dále LPS produkuje mediátory, které jsou schopny vyvolat septický šok. V lidském těle působí LPS jako endotoxin, protože v séru váže lipid binding protein, který LPS přenese na CD14 receptor na buněčné membráně, ten ho přenáší dál na MD2 protein, který spolupracuje s TLR4 (Obr. 1). Ačkoli LPS je silným aktivátorem makrofágů, molekulární mechanismy jeho interakce s membránovými buňkami, nejsou zatím zcela vysvětleny. Jednoznačně se ví, že antigen CD14 a LPS-binding protein (LPB) hrají klíčovou roli při zprostředkování buněčného rozpoznání a v reakci na LPS. Protože antigenu CD14 chybí transmembránová doména, musí tam být současně přítomny další membránové

proteiny (TLR4 a TLR2). CD14 a TLR4 se nachází v různých buňkách imunitního systému (makrofágy, dendritické buňky), dochází k sekreci zánětlivých cytokinů a chemokinů, což vede k septickému šoku (Ohki a kol., 2001).



Obr. 1: Spolupráce receptorů LPS na makrofágu (Fujihara a kol., 2003).

LPS patří mezi nejtoxičtější mikrobiální produkty, které mají schopnost vyvolat patofyziologické změny (horečka, změny v oběhu bílých krvinek). Za tyto změny je zodpovědný konkrétně lipid A, tyto imunopatologické změny mohou vést k endotoxémii, která vede k vysoké mortalitě (Bayston & Cohen, 1990).

1.7.5 Protinádorové působení Zymosanu A a LPS

Novější studie ukázaly vliv Zymosanu a LPS na gliom RG-2, který byl podkožně implantován krysám. Křasy byly léčeny intratumorálně injekcí TLR ligandů lipopolysacharidu a Zymosanu. Podávání látek bylo lepší v jednorázových dávkách, a vedlo k úplné regresi nádoru, u LPS 71% a u Zymosanu 50%. Výsledkem tedy je, že přímá intratumorální léčba s TLR ligandy LPS a Zymosanu je velice účinná v tvorbě protinádorové odpovědi. Tato léčba může být v synergii s cytotoxickou terapií (radioterapií) (Mariani a kol., 2007). Ve zmíněné práci však nebylo studováno současné působení Zymosanu A a LPS a jejich případná synergie.

2 Cíle práce

- Vazba Zymosan A na nádorové buňky pomocí SMCC a studium jeho synergie s LPS
- Histologické vyhodnocení průběhu imunoterapie založené na použití LPS/ZymosanA

3 Materiál a metody

3.1 Chemikálie

V pokusech byly používány tyto chemikálie:

- RPMI 1640 (Sigma Aldrich)
- FCS - Fetal Calf Serum (Sigma Aldrich)
- Zymosan A ze *S. cerevisiae* (Sigma Aldrich)
- LPS - lipopolysacharid *Escherichia coli* (Sigma Aldrich)
- Lysin (Sigma Aldrich)
- SMCC - 4- (N-Maleimidomethyl) cyclohexanecarboxylic acid N-hydroxysuccinimide ester (Thermo Scientific)
- TCEP - Tris (2- carboxyethyl) phosphine hydrochloride

3.1.1 Příprava terapeutik

Zymosan A- SMCC

104,2 mg Zymosanu A bylo rozsuspendováno v 6 ml PBS a sonikováno 10 x 10 vteřin (mezi sonikací vždy 20 vteřin chlazení). K této suspenzi bylo přidáno 1,5 ml 2 mM SMCC v PBS pH 7,4. Směs byla promíchána a ponechána reagovat 40 minut při pokojové teplotě.

Zymosan A- SMCC+ LPS (0,5)

K Zymosanu A- SMCC byl přidán LPS na výslednou koncentraci 0,5 mg/ ml.

LPS (0,5)

Roztok LPS v PBS o koncentraci 0,5 mg/ ml.

Lysin- SMCC

6 ml $5 \cdot 10^{-4}$ M lysinu bylo smícháno s 1,5 ml 2 mM SMCC v PBS pH 7,4 a ponecháno reagovat 40 min při pokojové teplotě.

Lysin – SMCC + LPS (0,5)

K roztoku Lysin – SMCC byl přidán LPS na výslednou koncentraci 0,5 mg/ml.

R

50 mM roztok TCEP v PBS.

3.2 Laboratorní zvířata

Při pokusech byly použity samice inbredních myší kmene C57BL/6N od společnosti Charles River Laboratories. Při zahájení terapie byly myši 8 týdnů staré, jejich váha byla 18-20 g. Byly chovány za standartních podmínek, v místnosti s fotoperiodou 12/12 a za stálého přísunu potravy (granulovaná směs) a sterilní vody.

3.3 Kultivace melanomu B16- F10

Při experimentu byly použity nádorové buňky z buněčné linie melanomu B16- F10, která byla darem od prof. Říhové (Mikrobiologický ústav AV, ČR, Praha). Buňky byly kultivovány v RPMI 1640 s 10% FCS, glutamanem, merkaptoethanolem a antibiotiky (Sigma Aldrich). Tato kultivace probíhala v termostatu, při teplotě 37 °C (v atmosféře nasycené vodními parami s 5 % oxidu uhličitého).

Poté, co nádorové buňky narostly v dostačujícím množství, jsme odstranili médium, buňky byly propláchnuty dostatečným množstvím pufovaného fyziologického roztoku (PBS). Poté následovala trypsinizace přidáním 0,5 ml směsi (0,02% trypsin, 0,02 % EDTA v PBS) k buňkám. Buňky byly inkubovány v termostatu při 37 °C, kdy po několika minutách došlo k odpoutání adheovaných buněk. Poté se zastavila trypsinizace přidáním 5 ml RPMI 1640 s 10% FCS. Následovala centrifugace (10 min, 150G, 4⁰C), promytí a rozsuspendování buněk v RPMI 1640 bez séra. Aby se stanovil počet buněk, došlo k smíchání s trypanovou modří (v poměru 1:1). Buňky byly spočítány v Burkerově komůrce a výsledná koncentrace byla upravena na 4 miliony buněk/ ml RPMI.

3.4 Transplantace melanomu B16- F10

Transplantace myšího melanomu byla prováděna na myších oholených ve spodní části zad, kdy jim bylo do pravého oholeného boku podkožně aplikováno 400 000 buněk melanomu B16- F10 v 0,1 ml RPMI 1640 bez séra.

3.5 Měření velikosti nádorů

Velikost nádoru byla měřena pomocí kaliperu a z naměřených hodnot byl vypočítán objem nádoru podle vzorce $V = \pi/6AB^2$, kde A vyjadřuje největší rozměr nádoru a B nejmenší (Inaba a kol, 1986). Nádory byly během pokusu měřeny obden.

3.6 Průměrná redukce nádorového růstu

Nejprve vypočteme redukce nádorového růstu ve dnech 4,6,8,10,12,14 od začátku terapie podle vzorce:

$$\frac{(\text{průměrný objem nádorů v kontrole}) - (\text{průměrný objem nádorů v léčené skupině}) \times 100}{\text{průměrný objem nádorů v kontrole}}$$

průměrný objem nádorů v kontrole

Průměrná redukce nádorového růstu je vyjádřena v % a je průměrem z výše vypočtených šesti hodnot.

3.7 Počítání plicních metastáz

Po vypitvání myších plic, byly plíce uchovány v 4 % roztoku formaldehydu několik dní. Následně byly prohlíženy pod binolupou, kdy se počítala všechna metastatická ložiska, která vypadají jako černé tečky různých velikostí (Vetvicka a kol, 2007).

3.8 Sonikace

K sonikaci byl použit sonikátor HIELSCHER VP200S. Daná suspenze byla 10x 10 vteřin ozvučována v ledové lázni a po každém ozvučení proběhlo 20 vteřin ochlazování.

3.9 Histologické vyhodnocení

Nejprve byly vypitvány myší melanomy, které byly ukládány v 4 % formaldehydu po několik dní, poté došlo k překrajování nádoru. Následovalo odvodnění a poté prosycení vzorků parafínem. Druhý den byly vzorky zality parafínem na parafínové lince (LEICA EG1150 H) a poté byly zchlazeny. Z vytvořených parafínových bloků se na sáňkovém mikrotomu (LEICA SM 2000R) nakrájely histologické preparáty, které se poté nechaly 30 min fixovat v termostatu. Každý preparát byl nabarven základní metodou Hematoxylin-eosin, zamontován do montovacího média a poté vyhodnocován pomocí mikroskopu (Olympus BX 51) při celkovém zvětšení 40x (zvětšení objektivu 4x) a fotoaparátu (Olympus Camedia C5060). K vyhodnocení výskytu nekrózy a granulocytární infiltrace jsme používali program QuickPHOTO MICRO s měřicí funkcí analýza fázi.

3.10 Statistické vyhodnocení dat

Výsledná data byla statisticky vyhodnocena pomocí oboustranného dvouvýběrového Studentova T-testu v programu MS Excel. Přežívání myší bylo hodnoceno pomocí testu Kaplan-Meier v programu MedCalc.

3.11 Popis jednotlivých terapií

Myši byly 12. den po transplantaci melanomu náhodně rozděleny do skupin (podle typu léčby), byly jim změřeny objemy nádorů a byla zahájena terapie.

3.11.1 Studium vlivu kotveného Zymosanu A ve spojení s LPS na růst melanomu

V pokusu bylo použito 20 myší, které byly rozděleny po 5 do 4 skupin (A, B, C, K).

Ve dnech 0,1,2 bylo myším aplikováno intratumorálně (i. t.) po 50 mikrolitrech jednotlivých roztoků takto:

Skupina A: Zymosan A-SMCC + LPS (0,5)

Skupina B: Zymosan A-SMCC

Skupina C: LPS (0,5)

Skupina K: PBS

Skupinám A,B,C bylo hodinu před aplikací jednotlivých látek injikováno i.t. vždy 50 mikrolitrů roztoku R.

U myší byla obden až do 14. dne od zahájení terapie měřena velikost nádorů, pak byla sledována doba přežití.

3.11.2 Screening režimů léčby melanomu aplikací Zymosanu A- SMCC+ LPS

V pokusu bylo použito 10 myší, které byly náhodně rozděleny po 5 do 2 skupin (A, B). V této terapii se aplikovalo intratumorálně 50 mikrolitrů směsi Zymosan A- SMCC+ LPS ve dvou aplikačních režimech takto:

Skupina A: Zymosan A- SMCC+ LPS, aplikováno ve dnech 0, 1, 2 (jeden terapeutický pulz)

Skupina B: Zymosan A- SMCC+ LPS, aplikováno ve dnech 0, 1, 2 8, 9, 10 (dva terapeutické pulzy)

Skupinám A i B bylo hodinu před aplikací jednotlivých látek injikováno i.t. vždy 50 mikrolitrů roztoku R.

U myší byla obden až do 14. dne od zahájení terapie měřena velikost nádorů, pak byla sledována doba přežití.

3.11.3 Histologické vyhodnocení průběhu terapie založené na použití LPS, kotveného Zymosan A a kotveného Zymosan A ve spojení s LPS

Do tohoto pokusu bylo zahrnuto 24 myší, které byly randomizovány do 4 skupin (A, B, C, K) po 6 myších. Dvánáctý den po transplantaci nádoru byla zahájena léčba, kdy byl všem skupinám, kromě skupiny kontrolní (té bylo píchnuto pouze PBS), nejprve aplikováno 50 mikrolitrů roztoku R. Po uplynutí 1 hodiny byla provedena aplikace terapeutik podle tohoto schématu:

Skupina A: Zymosan A- SMCC+ LPS

Skupina B: Zymosan A- SMCC

Skupina C: LPS

Skupina K: kontrolní skupina- PBS

8 hodin po ukončení terapie byly vždy 2 myši z každé skupiny (celkem 8 myší) usmrceny cervikální dislokací (zlomení vazy), po 24 hodinách dalších 8 myší a po 48 hodinách posledních 8 myší. Poté jim byly vypitvány melanomy, které byly později použity pro histologické vyhodnocení.

3.11.4 Histologické vyhodnocení vlivu kotvení SMCC na růst nádoru

K tomuto pokusu bylo použito 20 myší (randomizovány po 5 myších do 4 skupin- A, B, C, K). Pěti myším (skupina C) bylo 12. den po transplantaci nádoru intratumulárně (i. t.) píchnuto 50 mikrolitrů PBS a ostatním skupinám (A, B, K) po 50 mikrolitrech roztoku R (21.5 mg/ 1,5 ml PBS), a po hodině 50 mikrolitrů:

Skupina A: lysin- SMCC

Skupina B: lysin- SMCC+ LPS

Skupina C: LPS

Skupina K: PBS

8 hodin po ukončení terapie byly 2 myši z každé skupiny (celkem 8 myší) usmrceny cervikální dislokací (zlomení vazy), po 24 hodinách dalších 8 myší a po 48 hodinách poslední 4 myší. Poté jim byly vypitvány melanomy, které byly později použity pro histologické vyhodnocení.

3.11.5 Terapie melanomu pomocí pulzní aplikace směsi kotveného Zymosanu A ve spojení s LPS

Pro tento pokus bylo použito 10 myší, rozdělených do 2 skupin (A, K) po 5 myších. Pulzní terapie spočívala v i. t. podání PBS skupině K a terapeutické směsi skupině A v režimu:

- 0. den 0, 3, 6 hod
- 1. den 0, 3 hod
- 2. den 0 hod

Schéma dávkování:

Skupina A: Zymosan A- SMCC+ LPS

Skupina K: kontrolní skupina- PBS

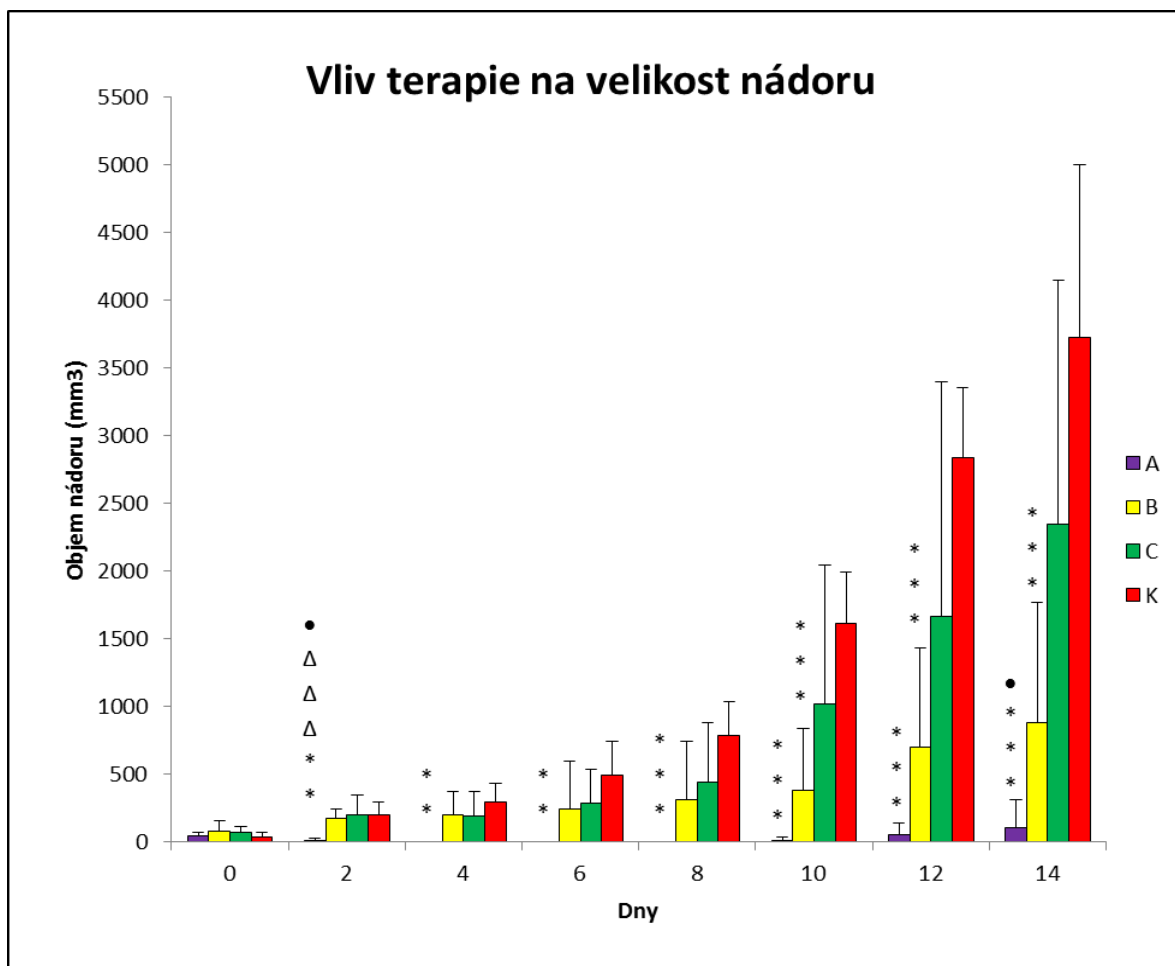
Skupině A bylo hodinu před aplikací terapeutické směsi injikováno i.t. vždy 50 mikrolitrů roztoku R.

Po skončení terapie byly myším měřeny objemy nádorů (obden) a po uplynutí čtrnácti dnů od počátku terapie byly myším odebrány plíce pro vyhodnocení metastáz plic.

4 Výsledky

4.1 Studium vlivu kotveného Zymosanu A ve spojení s LPS na růst melanomu

Cílem tohoto experimentu bylo zjistit, zda kotvený Zymosan A ve spojení s dalším PAMPs- konkrétně LPS (Zymosan A- SMCC+ LPS) má na růst nádoru větší vliv, než samotný kotvený Zymosan A (Zymosan A- SMCC). Z grafu (Obr. 2), kde jsou znázorněny objemy jednotlivých skupin, je patrné, že na růst nádoru má opravdu největší vliv kotvený Zymosan A ve spojení s LPS (nejvíce snižoval velikost nádoru). Mezi kotveným Zymosanem A a LPS došlo k výrazné synergii. Protinádorový účinek směsi byl statisticky významně vyšší, než účinek jednotlivých složek směsi. Statisticky významným byl i vliv samotného kotveného Zymosanu A.



Obr. 2: Vliv kotveného Zymosanu A ve spojení s LPS na velikost melanomu.

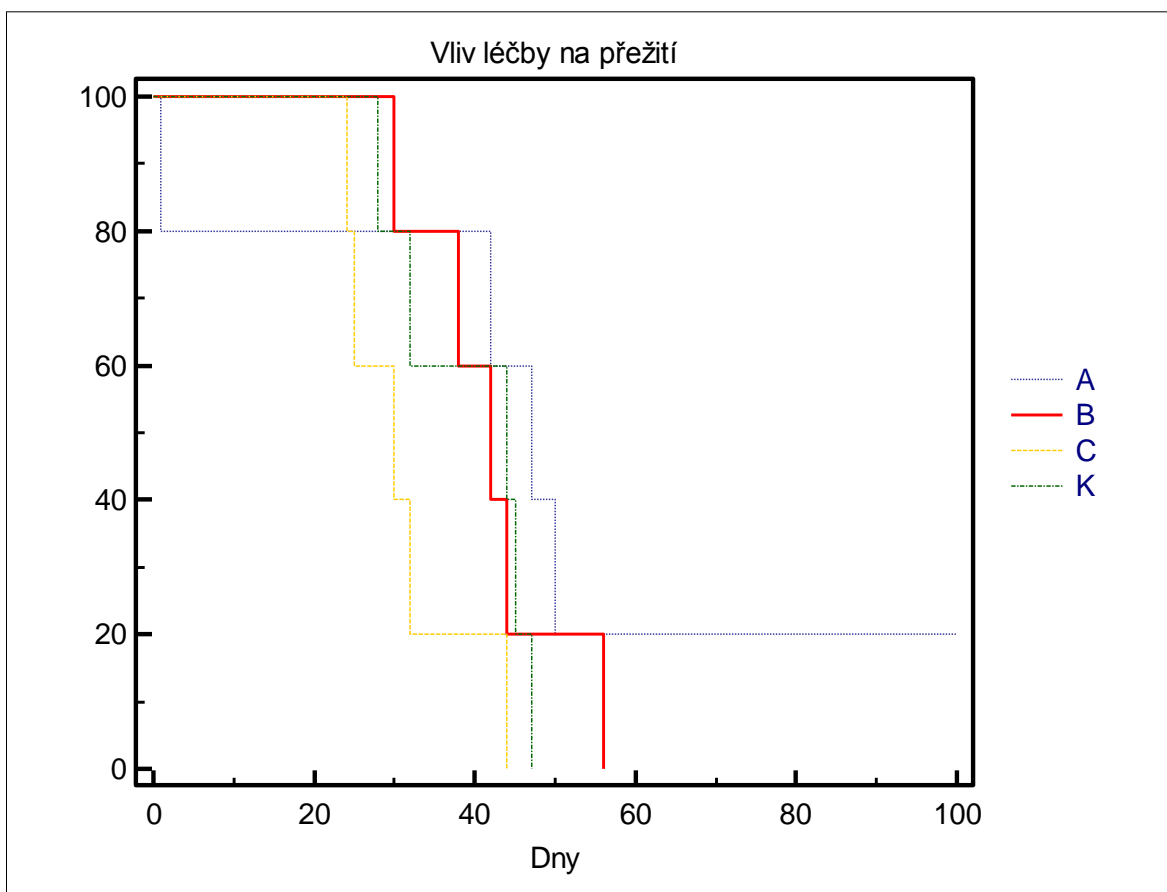
A- Zymosan A- SMCC+ LPS, **B-** Zymosan A- SMCC, **C-** LPS, **K-** kontrola PBS.

Hladina statistické významnosti ve srovnání s kontrolní skupinou: * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,005$.

Hladina statistické významnosti ve srovnání se skupinou B: Δ $P \leq 0,05$, $\Delta\Delta$ $P \leq 0,01$, $\Delta\Delta\Delta$ $P \leq 0,005$.

Statistická významnost vůči skupině C: • $P \leq 0,05$.

Po ukončení terapie byla pozorována doba přežití myši, aby bylo ukázáno, jaký vliv má terapie na prodloužení života myši. Ze zaznamenaných dat (Obr. 3) je zřetelné, že dané terapie neměly zásadní vliv na přežití myši (i přesto, že jedna myš ze skupiny A přežila více než 100 dní). Myši z kontrolní skupiny měly délku přežití téměř stejnou jako myši z ostatních (léčených) skupin. Myš léčená Zymosanem A- SMCC+ LPS (skupina A) žije déle jak rok od počátku léčby transplantovaných nádorů (2. 4. 2012) bez jakékoli známky nádorového růstu.

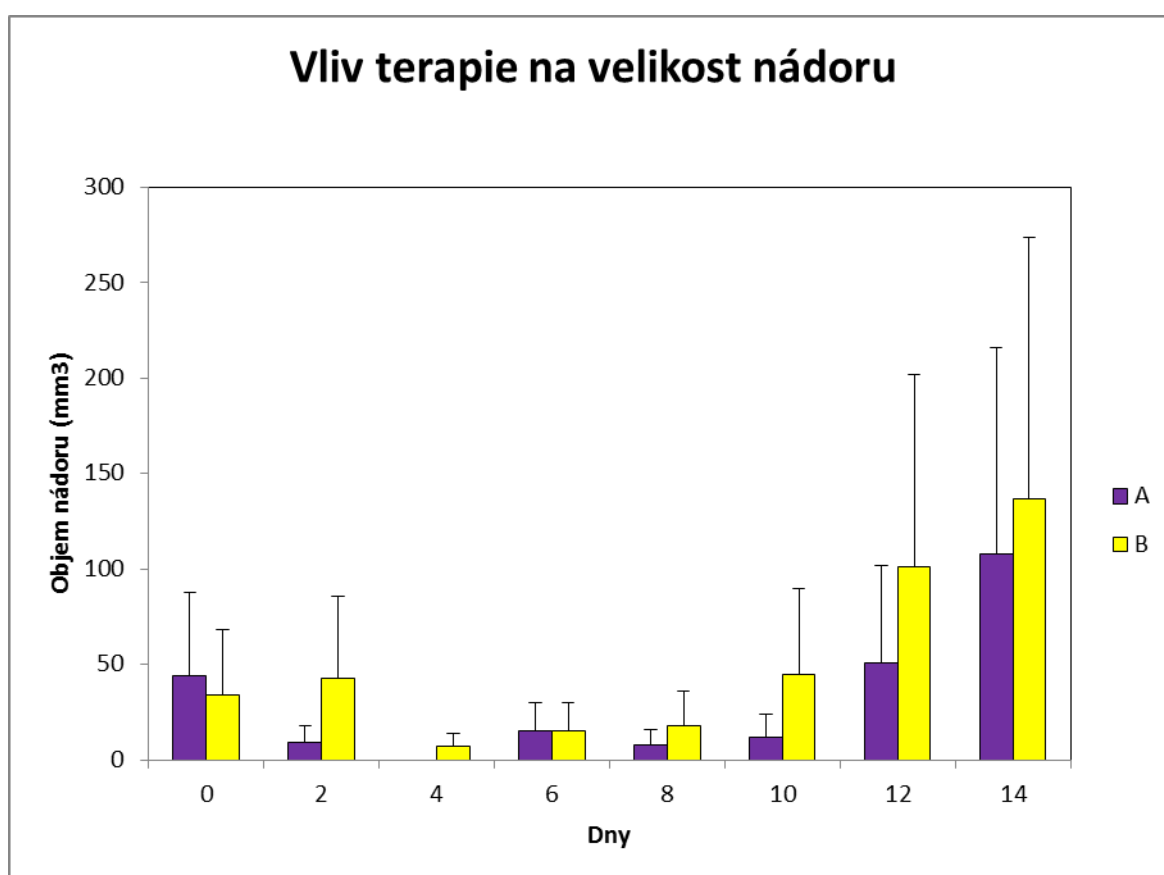


Obr. 3: Vliv Zymosanu A- SMCC ve spojení s LPS na přežívání myši.

A- Zymosan A- SMCC+ LPS, **B-** Zymosan A- SMCC, **C-** LPS, **K-** kontrola PBS.

4.2 Screening režimů léčby melanomu aplikací Zymosanu A- SMCC+ LPS

V tomto pokusu jsme se zabývali porovnáváním režimů léčby melanomu B16- F10 pomocí kotveného Zymosanu A ve spojení s LPS (Obr. 4), z důvodu maximalizace účinku terapie. Porovnávali jsme účinek režimů 0, 1, 2 a 0, 1, 2.... 8, 9, 10 na růst nádoru. Jak z grafu vyplývá, režim 0, 1, 2 je daleko efektivnější (i když rozdíl vůči druhému režimu nebyl statisticky významný, nevykazoval statisticky významnou redukci nádorového růstu).

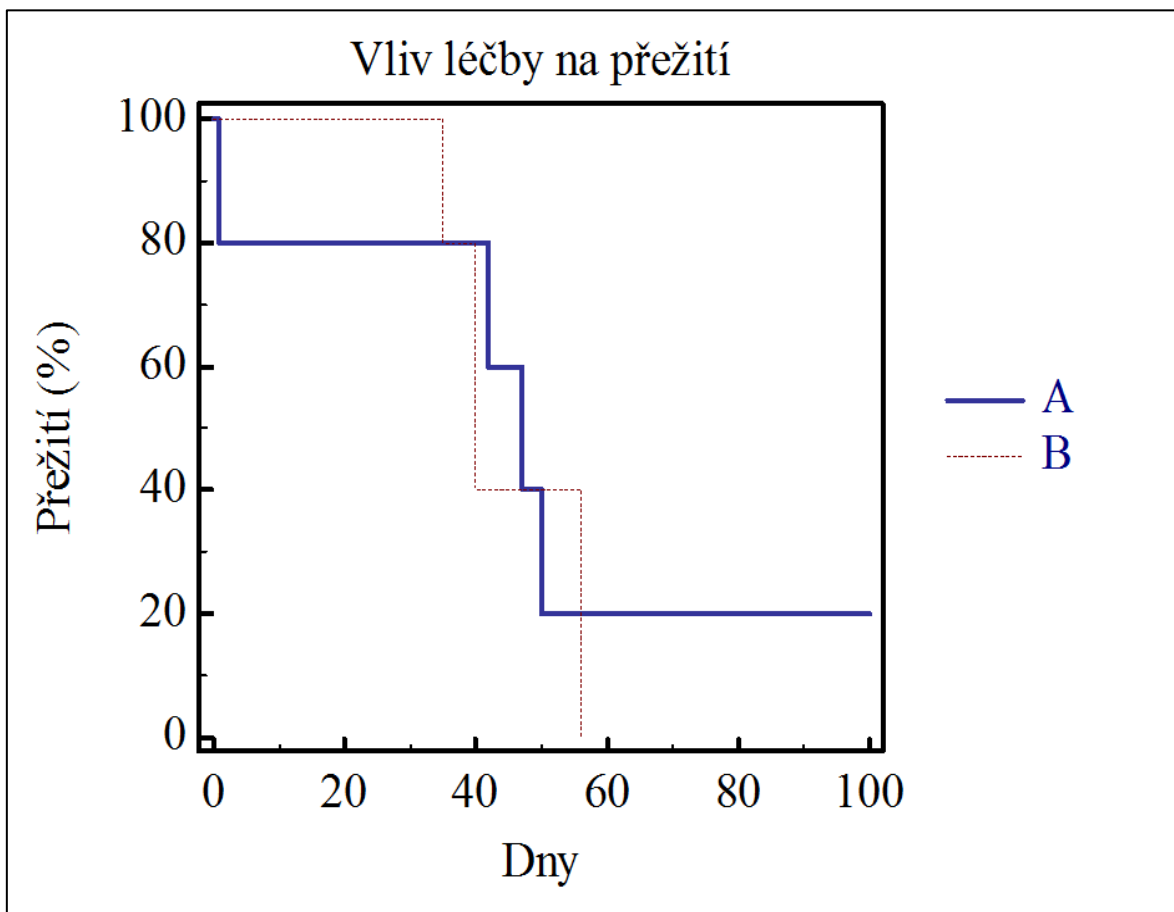


Obr. 4: Porovnání režimů léčby melanomu pomocí kotveného Zymosanu A ve spojení s LPS.

A- Zymosan A- SMCC+ LPS, režim 0, 1, 2.

B- Zymosan A- SMCC+ LPS, režim 0, 1, 2.... 8, 9, 10.

Po skončení léčby byla pozorována doba přežití myši (Obr. 5). U režimu 0, 1, 2 nedošlo ke statisticky významně delšímu přežití oproti režimu 0, 1, 2.... 8, 9, 10, i když jedna myš žije beze známek onemocnění dosud.



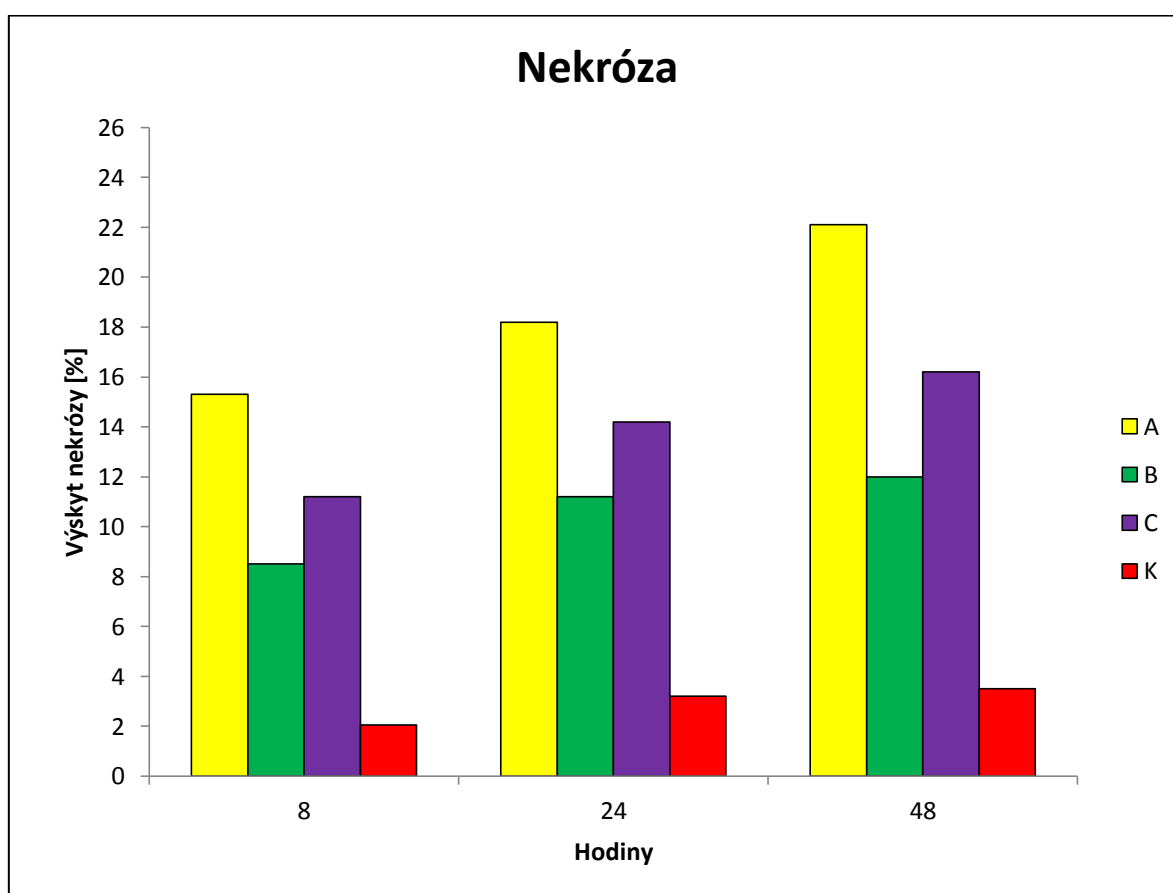
Obr. 5: Vliv režimu léčby melanomu na přežívání myši.

A- Zymosan A- SMCC+ LPS, režim 0, 1, 2.

B- Zymosan A- SMCC+ LPS, režim 0, 1, 2.... 8, 9, 10.

4.3 Histologické vyhodnocení terapie založené na použití LPS, kotveného Zymosanu A a kotveného Zymosanu A ve spojení s LPS

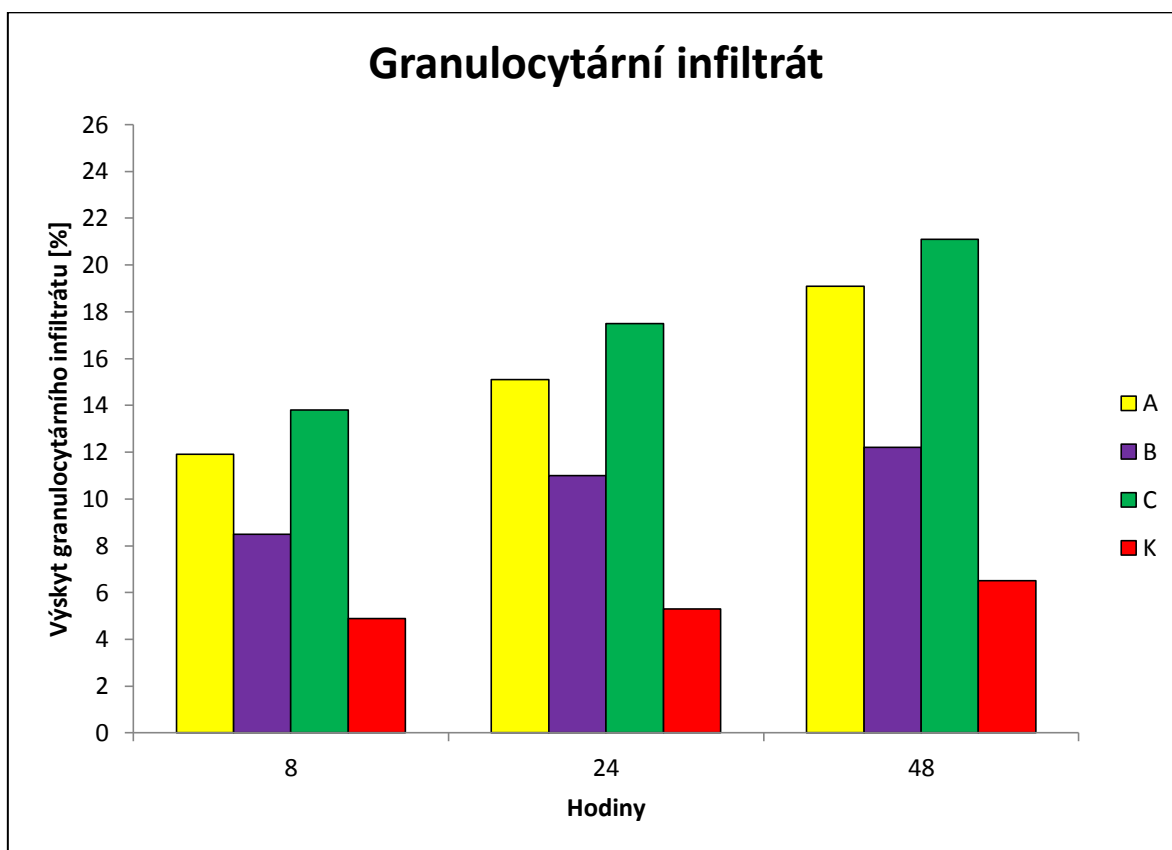
V tomto experimentu šlo o histologické vyhodnocení průběhu terapie, kdy se zjišťovalo, jak velký vliv má jaká terapie (kotvený Zymosan A, kotvený Zymosan A ve spojení s LPS a samotné LPS) na výskyt granulocytárního infiltrátu a nekrózy ve tkáni nádoru. Jak je patrné z grafu (Obr. 6) na výskyt nekrózy se nejvíce podílí kotvený Zymosan A ve spojení s LPS.



Obr. 6: Výskyt nekrózy u jednotlivých terapií.

A- Zymosan A- SMCC+ LPS, **B-** Zymosan A- SMCC, **C-** LPS, **K-** kontrola PBS.

Vliv terapie na výskyt granulocytárního infiltrátu je zobrazen v následujícím grafu (Obr. 7). Největší zastoupení granulocytů se vyskytuje u léčby pomocí LPS, a hned poté u Zymosanu A- SMCC+ LPS.



Obr. 7: Výskyt granulocytárního infiltrátu u jednotlivých terapií.

A- Zymosan A- SMCC+ LPS, **B-** Zymosan A- SMCC , **C-** LPS, **K-** kontrola PBS.

Účinnost terapie pomocí kotveného Zymosanu A ve spojení s LPS je patrná již 8 hodin po aplikování terapeutické směsi. Porovnání histologického preparátu léčby Zymosanem A- SMCC+ LPS (Příloha 1, Obr. 13) s kontrolní skupinou (Příloha 2, Obr. 14) prokazatelně znázorňuje výskyt nekrózy a granulocytů u léčeného nádoru. Ještě zřetelnější rozdíl se objevuje po 48 hodinách, kdy se u melanomu léčeného kotveným Zymosanem A ve spojení s LPS vyskytuje obrovské zastoupení nekrózy a značná granulocytární infiltrace (Příloha 3, Obr. 15).

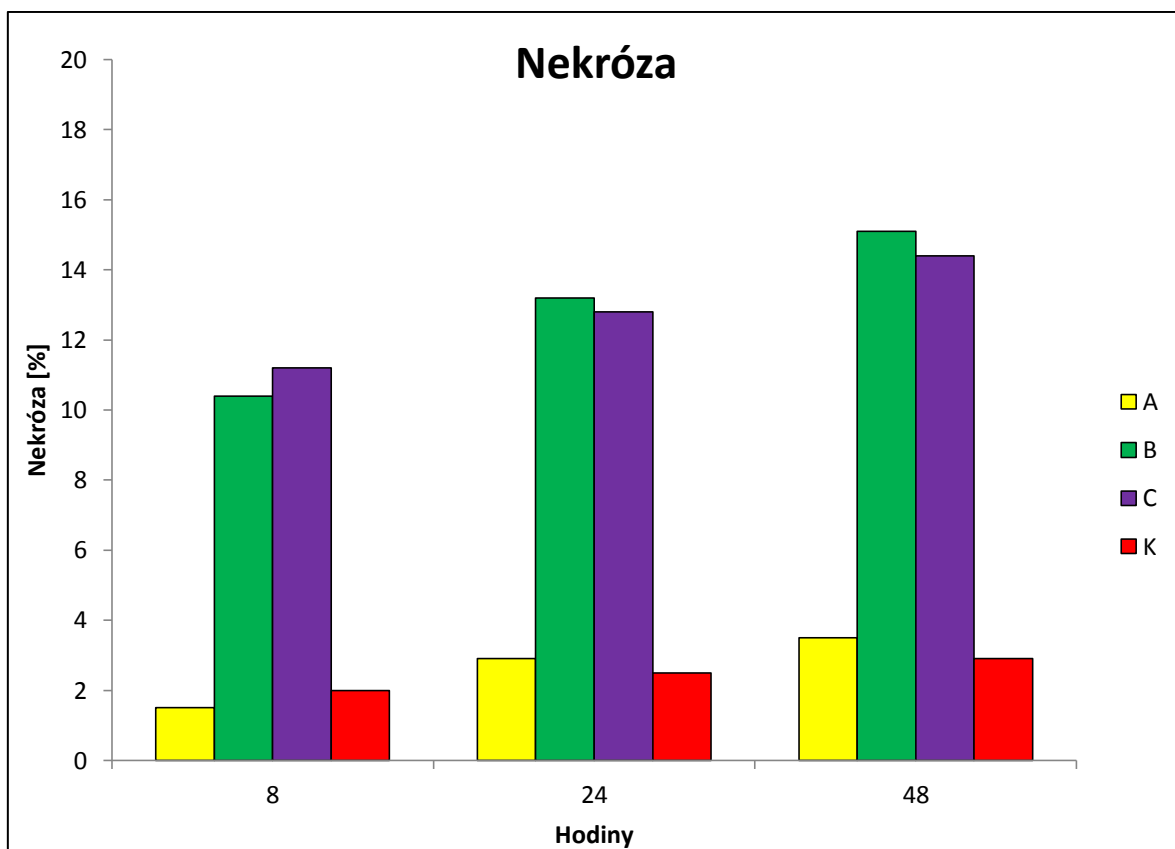
Vliv léčby pomocí LPS na výskyt granulocytů a nekrózy je také zřetelný již 8 hodin po aplikování terapeutické směsi (Příloha 4, Obr. 16). V porovnání s touto léčbou, je terapie

pomocí samotného Zymosanu A- SMCC (Příloha 5, Obr. 17) méně účinnější (nedochází k takovému výskytu nekrózy a granulocytů). Avšak oproti kontrolní skupině (Příloha 2, Obr. 14) je tato léčba kotveným Zymosanem A také velmi efektivní. K větším rozdílům ve výskytu granulocytů a nekrózy u léčby pomocí Zymosanu A- SMCC (Příloha 7, Obr. 19) a pomocí LPS (Příloha 6, Obr. 18) dochází po 48 hodinách, kdy je léčba nádoru pomocí LPS ještě účinnější (výskytem granulocytů i nekrózy). LPS má silný destruktivní účinek na tkáň nádoru (dochází k rozpadu buněk).

Pokud však porovnáваме vliv léčby na výskyt granulocytů a nekrózy, jak po 8, 24 a 48 hodinách, vychází jako nejefektivnější léčba pomocí kotveného Zymosanu A ve spojení s LPS (Příloha 1, Obr. 13) (Příloha 3, Obr. 15). U tohoto typu léčby dochází k největšímu zastoupení nekrózy a velkému výskytu granulocytů, jak oproti kontrole, tak oproti ostatním léčeným skupinám.

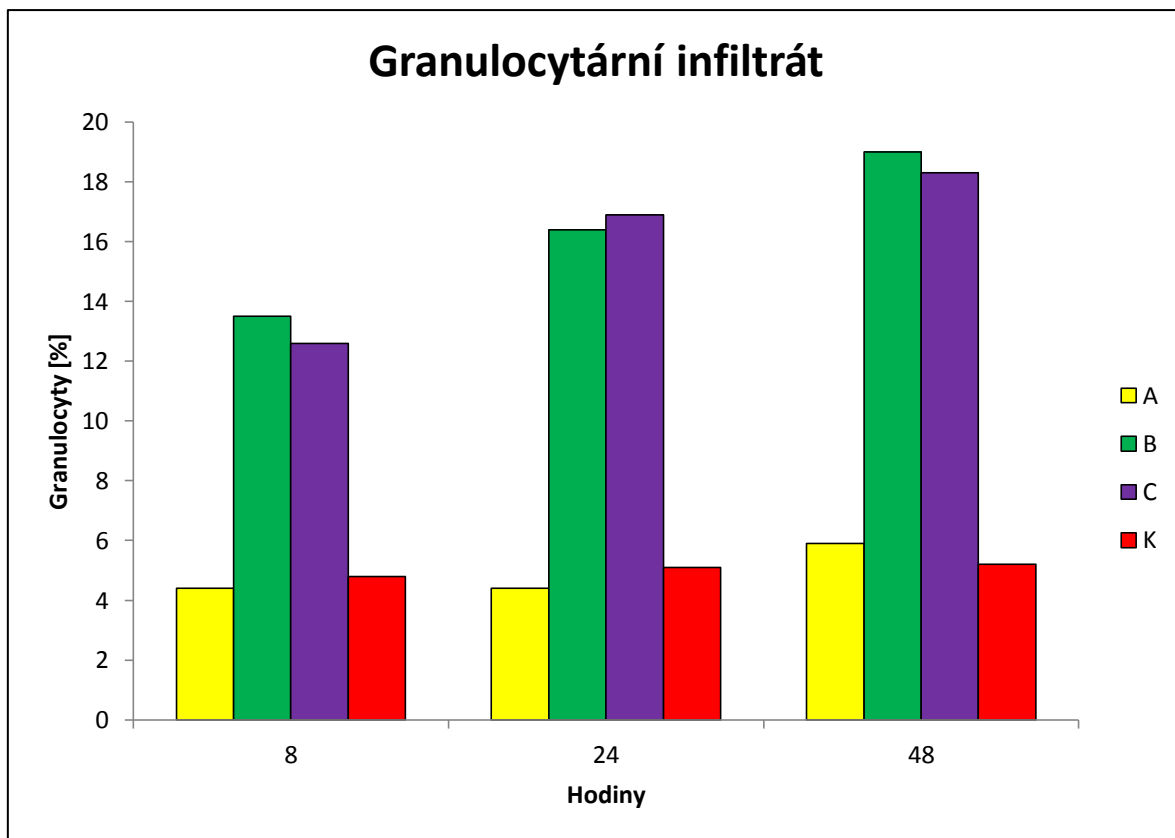
4.4 Histologické vyhodnocení vlivu kotvení SMCC na růst nádoru

V tomto kontrolním pokusu se prokázalo, že přítomnost kotvení pomocí SMCC nemá vliv na výskyt nekrózy (Obr. 8) a granulocytárního infiltrátu (Obr. 9) v histologické tkáni melanomu a tudíž nemá kotvení žádný vliv (negativní, ani pozitivní) na léčbu pomocí kotveného Zymosanu A- samotného nebo v přítomnosti LPS.



Obr. 8: Vliv kotvení pomocí SMCC na výskyt nekrózy.

A- *lysin- SMCC*, **B-** *lysin- SMCC+ LPS*, **C-** *LPS*, **K-** *kontrola PBS*.



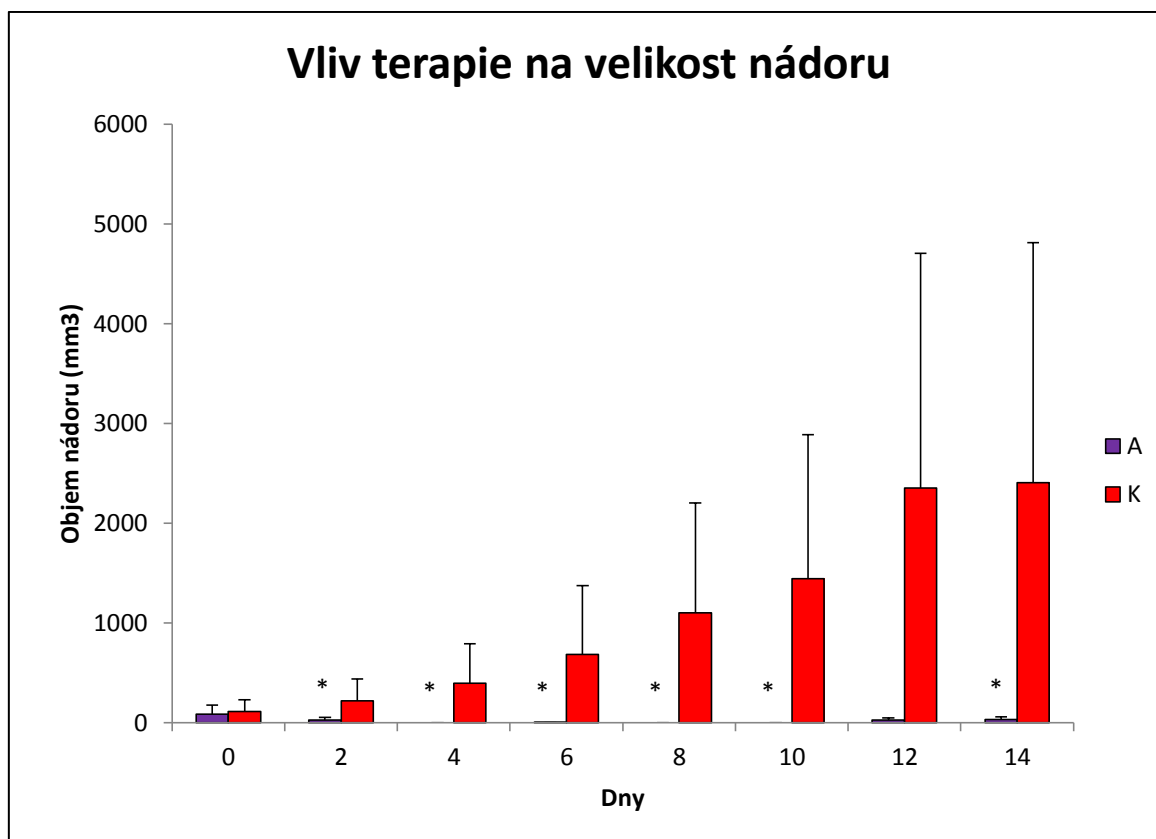
Obr. 9: Vliv kotvení pomocí SMCC na výskyt granulocytárního infiltrátu.

A- lysin- SMCC, **B-** lysin- SMCC+ LPS, **C-** LPS, **K-** kontrola PBS.

Porovnání tkáně neléčeného melanomu (kontrolní skupina- PBS) (Příloha 8, Obr. 20) s tkáně melanomu s kotvením pomocí SMCC (lysin- SMCC) (Příloha 9, Obr. 21), 24 hodin po aplikování látky, znázorňuje, že kotvení pomocí SMCC neovlivňuje žádným způsobem chování nádoru a tudíž nemá žádný vliv na léčbu nádoru.

4.5 Terapie melanomu pomocí pulzní aplikace směsi kotveného Zymosanu A- ve spojení s LPS

Pulzní terapie pomocí směsi Zymosanu A- SMCC+ LPS vyvolala výraznou statisticky významnou redukci nádorového růstu.

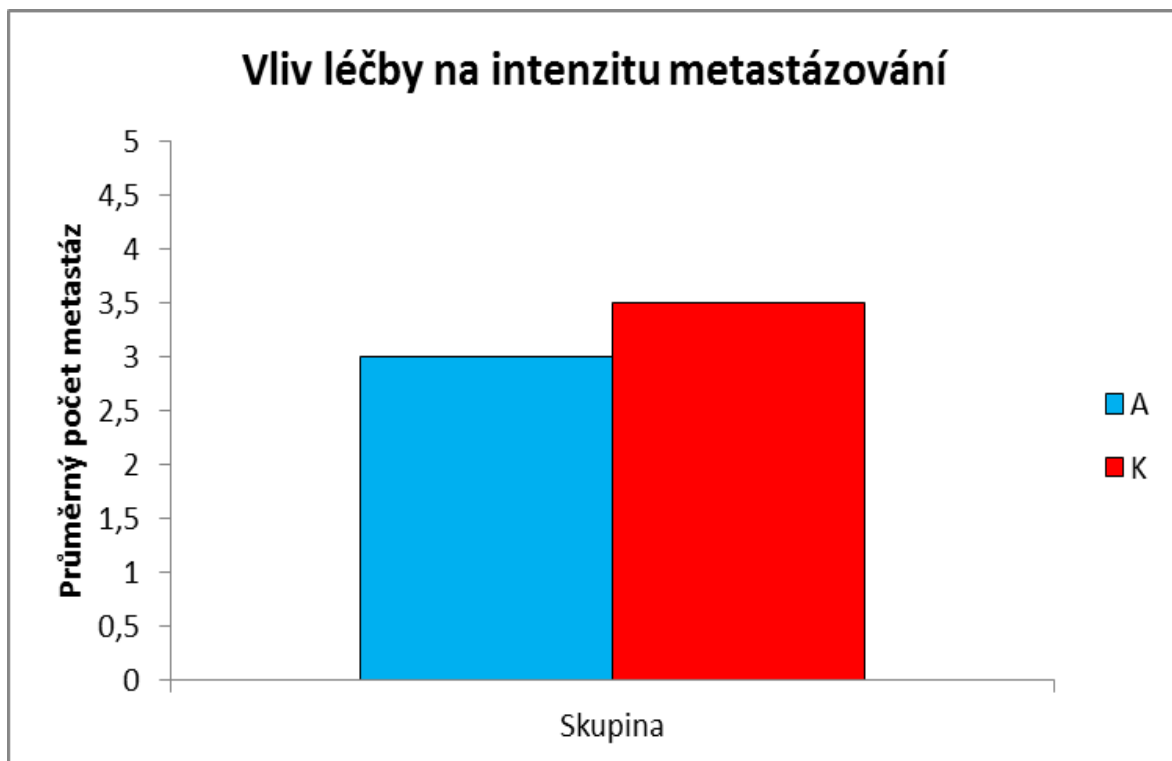


Obr. 10: Vliv pulzní terapie na redukci nádorového růstu.

A- Zymosan A- SMCC+ LPS, **K-** kontrola PBS.

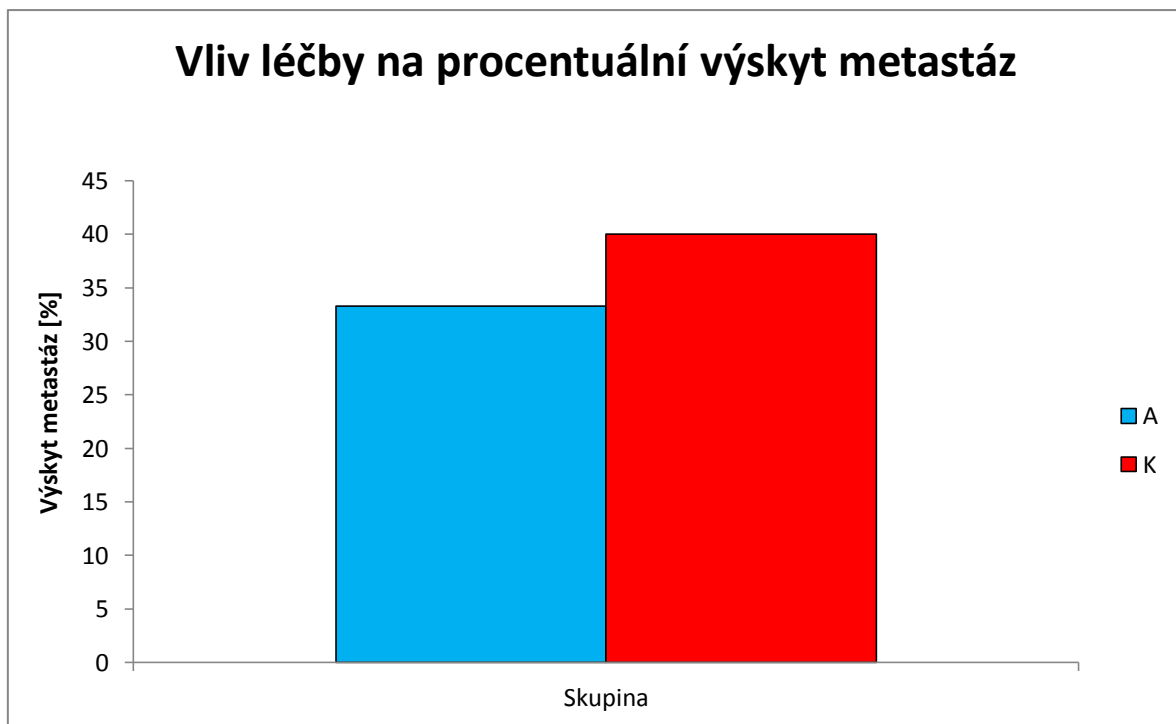
* $P \leq 0,05$ vztaženo vůči kontrole.

Po ukončení léčby byly spočítány metastáze u jednotlivých skupin. Graf (Obr. 11) znázorňuje vliv terapie na intenzitu metastazování, tedy na průměrný počet metastáz u myší, u kterých byly nalezeny. Na Obr. 12 je zaznamenáno procentuální zastoupení myší s metastázami u jednotlivých skupin. V obou případech (jak intenzita metastazování, tak výskyt metastáz) je nižší u léčené skupiny než u kontroly.



Obr. 11: Vliv terapie s použitím kotveného Zymosanu A- ve spojení s LPS na intenzitu metastazování.

A- Zymosan A- SMCC+ LPS, **K-** kontrola PBS.



Obr. 12: Výskyt metastáz při terapii s použitím kotveného Zymosanu A- ve spojení s LPS.
A- Zymosan A- SMCC+ LPS, **K-** kontrola PBS.

5 Diskuze

Jelikož bylo v předchozích pokusech zjištěno, že kotvený Zymosan A má větší terapeutický účinek, než Zymosan A samotný (Waldmannová, 2012), rozhodli jsme se v našich pokusech pracovat s kovalentním vázáním ligandu pomocí SMCC. Kotvení fagocytárních ligandů má velký význam. Jak udává Underhill a Gantner (2004) je ukotvení fagocytárními ligandy podmínkou jejich působení.

V případě volného Zymosanu A pozorovala Waldmannová (2012) určitou protinádorovou aktivitu, která však byla velmi nevýrazná (16,1 % redukce nádorového růstu). Toto není až tak překvapivé zjištění, zvážíme-li, že Zymosan A obsahuje agonisty signálních i fagocytárních receptorů a je korpuskulární povahy. Vazba Zymosanu A na nádorové buňky pomocí BAM (hydrofobní interakce) popisovaná Waldmannovou (2012) protinádorový účinek Zymosanu A zvýšila na 28%. Námí provedená kovalentní vazba byla ještě účinnější (61,9 %). Spojení působení kovalentně vázaného Zymosanu A se signálními PAMPs (u nás konkrétně LPS) vedlo k velmi výrazné redukci nádorového růstu až k úplnému vyléčení. Jak jsme zjistili v prvním experimentu, tato synergie LPS s kovalentně vázaným Zymosanem A vedla k 97,2 % redukci nádorového růstu.

Zjištěná výrazná synergie působení LPS (ligand signálního receptoru) s aktivací fagocytárních receptorů (pomocí laminarinu, f- MLF motivů, Zymosanu A) byla již zjištěno v předchozích pokusech (Auerová, 2012), (Čunátová, 2012), (Waldmannová, 2012). Tuto synergii si vysvětlujeme tak, že signální ligandy způsobí mohutnou zánětlivou infiltraci nádoru a kotvené fagocytární ligandy ji pak nasměrují na nádorové buňky, které jsou tímto zničeny. Tomu odpovídají i výsledky histologie (viz níže).

Nejprve jsme zkoušeli terapeutický pulz 0, 1, 2, který působil velice efektivně v eliminaci nádorového růstu, kdy došlo u 4 myší dokonce k dočasnému vymizení nádoru. Redukce nádorového růstu byla oproti kontrole statisticky významná a dokonce došlo k přežití 1 myši, která žije již přes rok bez jakýkoli známek nádorového růstu. I přes toto ojedinělé přežití, tato terapie neměla statisticky významný vliv na přežívání myší. Možným vysvětlením by mohlo být, že kovalentní vazba poskytne intenzivní působení, ale pokud dojde k rozpadu nádorových buněk, tak už kovalentní vazba nedokáže znovu navázat interagující molekuly (Maierová, 2012).

Kotvený Zymosan A v kombinaci s LPS v režimu 0, 1, 2 měl tedy významný protinádorový účinek, proto jsme se se Zymosanem A- SMCC+ LPS rozhodli nadále pracovat a pokusili jsme se o modifikaci terapeutických režimů. Nově zvolený režim 0, 1, 2....8, 9, 10 ve srovnání s původním 0, 1, 2 režimem nebyl tak účinný na redukci nádorového růstu a ani neměl žádný větší vliv na dobu přežívání myší.

K zjišťování průběhu terapie založené na použití kotveného Zymosanu A, LPS a kotveného Zymosanu A ve spojení s LPS jsme využili histologického vyhodnocování.

Byl zde pozorován velký vliv LPS na léčbu nádoru, kdy samotné LPS vykazovalo dobré terapeutické účinky – ve tkáni nádoru bylo velmi silné zastoupení granulocytů a nekrózy (a to již po 8-48 hod léčby), což odpovídá zjištění Maierové (2012), že LPS vyvolává mohutnou infiltraci, zpočátku zejména granulocytů. V práci Waldmannové (2012), Auerové (2012) bylo také potvrzeno, že má samotné LPS velmi dobré terapeutické účinky a způsobuje nádorovou redukci. V našem i v uvedených experimentech byl použit LPS o koncentraci 0,5 mg/ml PBS, což je, jak zjistila Glaserová (2012) koncentrace schopná účinně stimulovat TLR4, ale přitom není cytotoxická. Supresivní účinek LPS byl rovněž zjištěn u na krysím modelu u gliomů (Mariani a kol., 2007), zde však byla použita poměrně vysoká dávka LPS. Jelikož LPS vyvolává u lidí toxické účinky (Copeland a kol., 2005), je třeba hledat další možnosti náhrady ligandu agonisty signálních receptorů bezpečných pro člověka.

Vliv na léčbu nádoru vykazoval i kotvený Zymosan A, který vyvolal ve tkáni nádoru výskyt granulocytárního infiltrátu a hojně nekrózy. Náš výsledek, že je kotvený Zymosan A schopný vyvolat zánět a tím navodit aktivaci imunitního systému byl také zjištěn v práci Waldmanové (stanovením množství CRP v séru). Ovšem problémem při terapii Zymosanem je jeho vysoká toxicita prokázaná již v dřívějších studiích, kdy při dávce 1000 mg/ kg/ den docházelo až k 90% úmrtnosti myší, se snižující se dávkou Zymosanu, úmrtnost klesala (Bradner a kol., 1958).

Nejefektivnější terapií na redukci nádorového růstu je terapie pomocí kotveného Zymosanu A ve spojení s LPS, kdy došlo k největšímu výskytu granulocytů i nekrozy ve tkáni nádoru a tím tedy k navození imunitních reakcí.

Histologickým vyhodnocením se také vyloučila možnost pozitivního vlivu samotného kotvení SMCC, a to v kontrolním pokusu (SMCC-lysin), kde nedošlo k žádnému

terapeutickému účinku (u porovnání PBS a lysinu- SMCC nedošlo téměř k žádným změnám histologické tkáně nádoru).

Předchozí výsledky mé i jiných (Auerová, 2012), (Waldmannová, 2012) ukázaly, že je rozhodující počáteční silný pulz. Proto jsme se rozhodli nadále hledat ještě účinnější modifikace terapeutických režimů. Aplikovali jsme terapeutickou směs na počátku léčby (0. den) celkem třikrát v čase 0, 3, 6 hod, další den dvakrát v 0, 3 hod a poslední den jen jednou. Tímto režimem bylo dosaženo statisticky významné redukci nádorového růstu oproti kontrole a dočasnému vymizení nádoru. V porovnání s méně intenzivní terapií provedenou v prvním experimentu můžeme konstatovat, že tato intenzivní terapie vedla k 99,6% redukci nádorového růstu, tudíž byla ještě účinnější. Třeba však zmínit, že během ní došlo k úhynu dvou z pěti myší (hned po injekci suspenze). Domníváme se, že příčinou by mohlo být, že se částičky Zymosanu A dostaly do krevního oběhu. Je to jen hypotéza, na jejím prověření pracujeme.

Po ukončení terapie se studoval vliv léčby na intenzitu metastazování, kdy byl sice výskyt metastáz a jejich intenzita u léčby Zymosanem A- SMCC+ LPS nižší oproti kontrole, ale pouze nevýrazně. Z těchto výsledků tedy nelze usuzovat na to, že by terapie snižovala výskyt metastáz.

6 Souhrn

- Kovaletní kotvení Zymosanu A pomocí SMCC ve spojení s LPS v režimu 0, 1, 2 mělo silný vliv na redukci nádorového růstu. Tato terapie je schopna vyvolat dočasné vymizení nádorů a ojediněle dochází k úplnému vyléčení a přežití myši (přežití myši však není statisticky významné oproti kontrole).
- Terapie pomocí Zymosanu A- SMCC+ LPS v režimu 0, 1, 2...8, 9, 10 nevykazovala oproti režimu 0, 1, 2 větší účinek na redukci nádorového růstu, ani na přežívání myši.
- Histologické vyhodnocení terapie Zymosanem A- SMCC+ LPS potvrdilo, že tato léčba je nejefektivnější, došlo k největšímu výskytu nekrózy a granulocytárního infiltrátu.
- Samotné kotvení pomocí SMCC nemá žádný vliv na terapii nádoru.
- Intenzivní pulzní terapie Zymosanem A- SMCC+ LPS (0. den v 0, 3, 6 hod, 1. den v 0, 3 hod a 2. den v 0 hod) vedla k dalšímu zvýšení účinnosti terapie, bylo dosaženo 99,6% redukce nádorového růstu.
- Vliv této intenzivní pulzní terapie pomocí Zymosanu A- SMCC+ LPS na tvorbu metastáz je zanedbatelný.

7 Citovaná literatura

Aimanianda, V., Clavaud, C., Simenel, C., Fontaine, T., Delepierre, M., & Latgé, J. P. (2009). Cell wall beta-(1,6)-glucan of *Saccharomyces cerevisiae*: structural characterization and in situ synthesis. *The Journal of Biological Chemistry*; 284: 13401-13412.

Altaner, Č. (2008). *Buněčná a molekulární biologie rakoviny*. Radix, spol. s. r.o. ;127s.

Auerová, M. (2012). *Terapie nádorového onemocnění založená na ukotvení laminarinu na povrch nádorových buněk*. České Budějovice. Bakalářská práce. Jihočeská Univerzita, Přírodovědecká fakulta, Katedra medicínské biologie.

Balkwill, F. (2004). Cancer and the chemokine network. *Nature Reviews Cancer*; 4: 540-550.

Bartůňková, J. (2002). *Imunodeficiency*. Grada Publishing a. s.; 228s.

Bartůňková, J., & Vernerová, E. (2002). *Imunologie a alergologie*. Triton; 81s.

Bayston, K. F., & Cohen, J. (1990). Bacterial endotoxin and current concepts in the diagnosis and treatment of endotoxaemia. *Journal of Medical Microbiology*; 31(2): 73-83.

Bellone, M., Mondino, A., & Corti, A. (2008). Vascular targeting, chemotherapy and active immunotherapy: teaming up to attack cancer. *Trends Immunology*; 29(5): 235-241.

Beutler, B. (2003). Not “Molecular Patterns” but Molecules. *Immunity*; 19(2): 155-156.

Biron, C. A., Nguyen, K. B., & Pien, G. C. (1999). Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annual Reviews Immunology*; 17: 189-220.

Bradner, W. T., & Clarke, D. A. (1959). Stimulation of Host Defense against Experimental Cancer II. Temporal and Reversal Studies of the Zymosan Effect. *Cancer Research*; 19(6): 673-678.

Bruzlová, P. (2012). *Ověření možnosti terapie nádorových onemocnění pomocí instalace mananu na povrch nádorových buněk*. České Budějovice. Bakalářská práce. Jihočeská Univerzita, Přírodovědecká fakulta, Katedra medicínské biologie.

Bubenik, J., Mikyskova, R., & Vonka, V. (2003). Interleukin-2 and dendritic cells as adjuvants for surgical therapy of tumours associated with human papillomavirus type 16. *Vaccine*; 21(9-10): 891-896.

- Chovancová, A., & Šturdík, E. (2005). Vliv beta glukanů na imunitní systém člověka. *Nova Biotechnologica; 1: 105-121.*
- Copeland, S., Warren, H. S., Lowry, S. F., Calvano, S. V., & Remick, D. (2005). Acute inflammatory response to endotoxin in mice and human. *Clinical Diagnose Labor Immunology; 12(1): 60- 67.*
- Cui, Z., Willingham, M. C., Hicks, A. M., Alexander-Miller, M. A., Howard, D., Hawkins, G. A., a další. (2003). Spontaneous regression of advanced cancer: Identification of a unique genetically determined, age-dependent trait in mice. *Proceedings of the National Academy of Science; 100(11): 6682-6687.*
- Čunátová, Š. (2012). *Ověření možnosti terapie nádorových onemocnění pomocí kotvení formylmethioninu na povrch nádorových buněk.* České Budějovice. Bakalářská práce. Jihočeská Univerzita, Přírodovědecká fakulta, Katedra medicínské biologie.
- Di Carlo, F. J., & Fiore, J. V. (1958). On the composition of zymosan. *Science; 127: 756-757.*
- Diller, I. C., Fisher, M. E., & Mankowski, Z. T. (1963). Effect of yeast polysacchararides on mouse tumors. *Cancer Research; 23(2): 201-208.*
- Escudier, B., Farace, F., & Angevin, E. (1994). Immunotherapy with interleukin-2(IL2) and lymphokine-activated natural-killer-cells- improvement oc clinical-responses in metastatic renal-cell carcinoma patients previously treated with IL2. *European Journal Cancer; 30(8): 1078-1083.*
- Ferlazzo, G., Thomas, D., & Lin, S. L. (2004). The abundant NKcells in human secondary lymphoid tissues require activation to express killer cell Ig-like receptors and become cytotoxic. *The Journal of Immunology; 172: 1455-1462.*
- French, A. R., & Yokoyama, W. M. (2003). Natural killer cells and viral infections. *Current Opinion in Immunology; 15: 45-51.*
- Fuentes, A. L., Millis, L., & Sigola, B. L. (2011). Laminarin, a soluble beta-glucan, inhibits macrophage phagocytosis of zymosan but has no effect on lipopolysaccharide mediated augmentation of phagocytosis. *International Immunopharmacology; 11(11): 1939-1945.*

- Fujihara, M., Muroi, M., Tanamoto, K., Suzuki, T., Azuma, H., & Ikeda, H. (2003). Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide: roles of the receptor complex. *Pharmacology & Therapeutics*; 100(2): 171–194.
- Glaserová, S. (2012). *Studium terapie melanomu B16- F10 pomocí aplikace LPS*. České Budějovice. Bakalářská práce. Jihočeská Univerzita, Přírodovědecká fakulta, Katedra medicínské biologie.
- Grange, J. M., Bottaso, O., Standford, C. A., & Standford, J. L. (2008). The use of mycobacterial adjuvant-based agents for immunotherapy of cancer. *Vaccine*; 26(39): 4984-4990.
- Gregoire, C., Chasson, L., & Luci, C. (2007). The trafficking of natural killer cells. *Immunological Reviews*; 220: 169-182.
- Gross, S., & Walden, P. (2008). Immunosuppressive mechanism in human tumors: Why we still cannot cure cancer. *Immunology Letter*; 116(1): 7-14.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*; 100: 57-70.
- Hicks, A. M., Riedlinger, G., Willingham, M. C., Alexander-Miller, M. A., Von Kap-Herr, C., Pettenati, M. J., a další. (2006). Transferable anticancer innate immunity in spontaneous regression/ complete resistance mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 103(20): 7753-7758.
- Holan, Z., Beran, K., & Miler, I. (1980). Preparation of zymosan from yeast cell walls. *Folia Microbiologica*; 25(6): 501-504.
- Hořejší, V., & Bartůňková, J. (2009). *Základy imunologie*. Triton; 316s.
- Huang, J. X., Azad, M. A., Yuriev, E., & Baker, M. A. (2012). Molecular Characterization of Lipopolysaccharide Binding to Human α -1-Acid Glycoprotein. *Journal of Lipids*; 2012: 15.
- Hynie, S. (2001). *Farmakologie v kostce*. TRITON; 520s.
- Ikeda, Y., Adachi, Y., Ishibashi, K., Miura, N., & Ohno, N. (2005). Activation of Toll-Like Receptor-Mediated NF- κ b by Zymosan-Derived Water-Soluble Fraction: Possible

Contribution of Endotoxin-Like Substances. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*; 27: 285-298.

Inaba, M., Tashiro, T., Kobayashi, T., Fujimoto, S., Sakurai, Y., Maruo, K., a další. (1986). Evaluation of Response Rates to Various Antitumor Agents of Human Gastric Tumors Implanted in Nude Mouse. *Japanese Journal of Cancer Research*; 77(2): 190-196.

Janeway, C. A., & Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annual Review of Immunology*; 20: 197-216.

Jílek, P. (2005). *Základy imunologie*. Ewopharma s. r. o.; 75s.

Klener, P. a. (1997). *Cytokiny ve vnitřním lékařství*. Grada; 260s.

Koido, Shigeo, Gong, & Jianlin. (2013). Characterization of Structure and Direct Antigen Presentation by Dendritic/Tumor-fused Cells as Cancer Vaccines. *Anticancer Research*; 33(2): 347-354.

Králíčková, P., Krejsek, J., & Krčmová, I. (2011). Biologická léčba v onkologii. *Praktický lékař*; 4: 189-192.(4).

Krejsek, J., & Kopecký, O. (2004). *Klinická imunologie*. NUCLEUS HK; 941s.

Lanier, L. L., Civin, C. I., & Loken, M. R. (1986). The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *Journal of Immunology*; 136(12): 4480-4486.

Lipke, P. N., & Ovalle, R. (1998). Cell wall architecture in yeast: New structure and new challenges. *Journal of Bacteriology*; 180(15): 3735-3740.

Mačák, J., & Mačáková, J. (2004). *Patologie*. Grada; 348s.

Maierová, V. (2012). *Protinádorová imunoterapie založená na instalaci manózy na povrch nádorových buněk*. České Budějovice. Diplomová práce. Jihočeská Univerzita, Přírodovědecká fakulta, Katedra medicínské biologie.

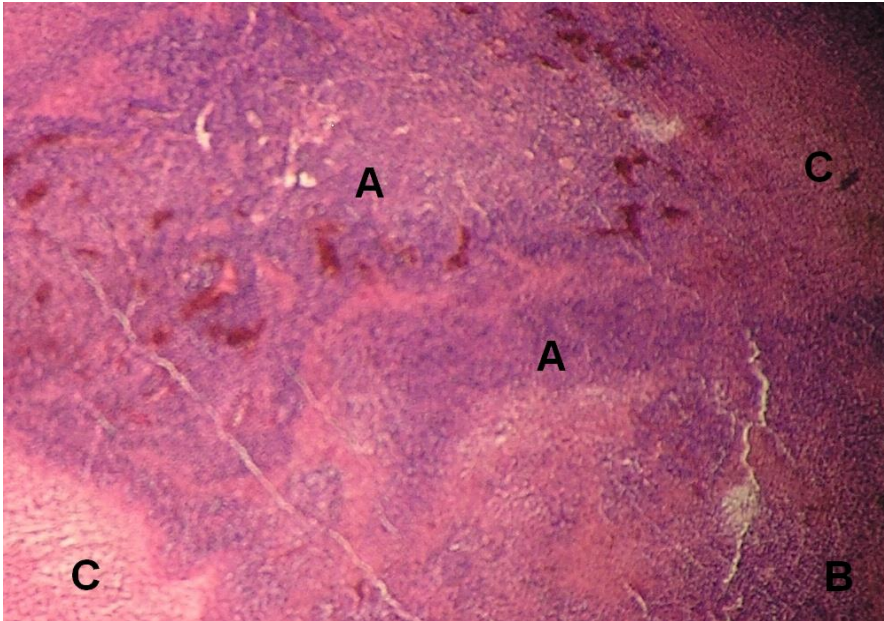
Mariani, C. L., Rajon, D., Bova, F. J., & Streit, W. J. (2007). Nonspecific immunotherapy with intratumoral lipopolysaccharide and zymosan A but not GM-CSF leads to an effective anti-tumor response in subcutaneous RG-2 gliomas. *Journal Neurooncology*; 85: 231-240.

- 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: 791-798., stránky 791-798.
- Ohki, K., Amano, F., & Kohashi, O. (2001). Lipopolysaccharide (LPS) and zymosan-resistant mutant isolated from a macrophage-like cell line, WEHI-3, with a defective response to LPS under serum-free conditions. *Immunology and Cell Biology*; 79: 462-471.
- Petruželka, L., & Konopásek, B. (2003). *Klinická onkologie*. Karolinum; 274s.
- Pizinger, K. (2003). *Kožní pigmentové projevy*. Grada; 124s.
- Robertson, M. J., & Ritz, J. (1990). Biology and clinical relevance of human natural-killer-cells. *Blood*; 76(12): 2421-2438.
- Rossi, D., & Zlotnik, A. (2000). The Biology of Chemokines and their Receptors. *Annual Review of Immunology*; 18: 217-242.
- Smyth, M. J., Godfrey, D. I., & Trapani, J. A. (2001). A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nature Immunology*; 2: 293-299.
- Tolozo, E. M., Tyler, D., & Yang, Y. (2004). How does the immune system attack cancer? *Current Problems in Surgery*; 41(1): 1-132.
- Underhill, D. M., & Gantner, B. (2004). Integration of Toll-like receptor and phagocytic signaling for tailored immunity. *Microbes and Infection*; 6: 1368-1373.
- Velíšek, J. (2002). *Chemie potravin II*. Osis, Tábor.
- Vetvicka, V., Dvorak, B., Vetvickova, J., Richter, J., & Krizan, J. (2007). Orally administered marine (1 → 3)-β-d-glucan Phycarine stimulates both humoral and cellular immunity. *International Journal of Biological Macromolecules*; 40: 291-298.
- Vorlíček, J., Abrahámová, J., & Vorlíčková, H. (2012). *Klinická onkologie pro sestry*. Grada; 448s.
- Waldmannová, E. (2012). *Studium nádorové terapie pomocí Zymosanu A*. České Budějovice. Bakalářská práce. Jihočeská Univerzita, Přírodovědecká fakulta, Katedra medicínské biologie.

- Weckesser, J., Drews, G., & Mayer, H. (1979). Lipopolysaccharides of Photosynthetic Prokaryotes. *Annual Review of Microbiology*; 33: 215-239.
- Weide, B., Garbe, C., & Rammenseem, H. G. (2008). Plasmid DNA- and messenger RNA-based anti-cancer vaccination. *Immunology Letters*; 115(1): 33-42.
- Wright, T. C., Bosch, F. X., Franco, E. L., Cuzick, J., Schiller, J. T., Garnett, G. P., a další. (2006). HPV Vaccines and Screening in the Prevention of Cervical Cancer; conclusions from a 2006 workshop of international experts. *Vaccine*; 24(3): 251-261.
- Yan, L., Anderson, G. M., & DeWitte, M. (2006). Therapeutic potential of cytokine and chemokine antagonists in cancer therapy. *European Journal Cancer*; 42: 793-802.
- Yeeprae, W., Kawakami, S., Yamashita, F., & Hashida, M. (2006). Effect of mannose density on mannose receptor-mediated cellular uptake of mannosylated O/W emulsions by macrophages. *Journal of Controlled Release*; 114(2): 193-201.
- Zeković, D. B., Kwiatkowski, S., Vrvic, M. M., Jakovljević, D., & Moran, C. A. (2005). Natural and Modified (1→3)-β-D-Glucans in Health Promotion and Disease Alleviation. *Critical Reviews in Biotechnology*; 25(4): 205-230.
- Zlotnik, A., & Yoshie, O. (2000). Chemokines: A New Classification System and Their Role in Immunity. *Immunity*; 12: 121-127.

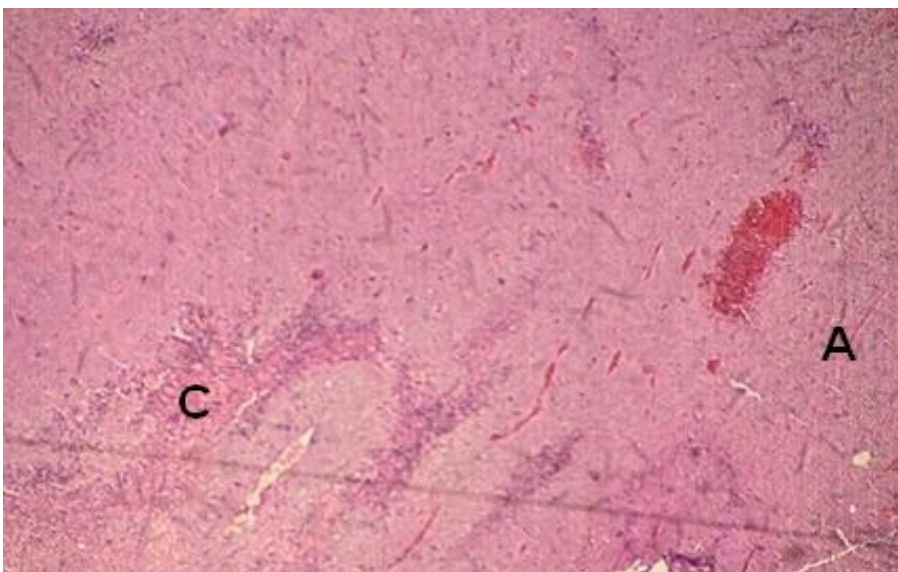
8 Přílohy

8.1 Příloha 1: Histologická tkáň melanomu léčeného kotveným Zymosanem ve spojení s LPS, 8 hod po aplikaci terapeutik



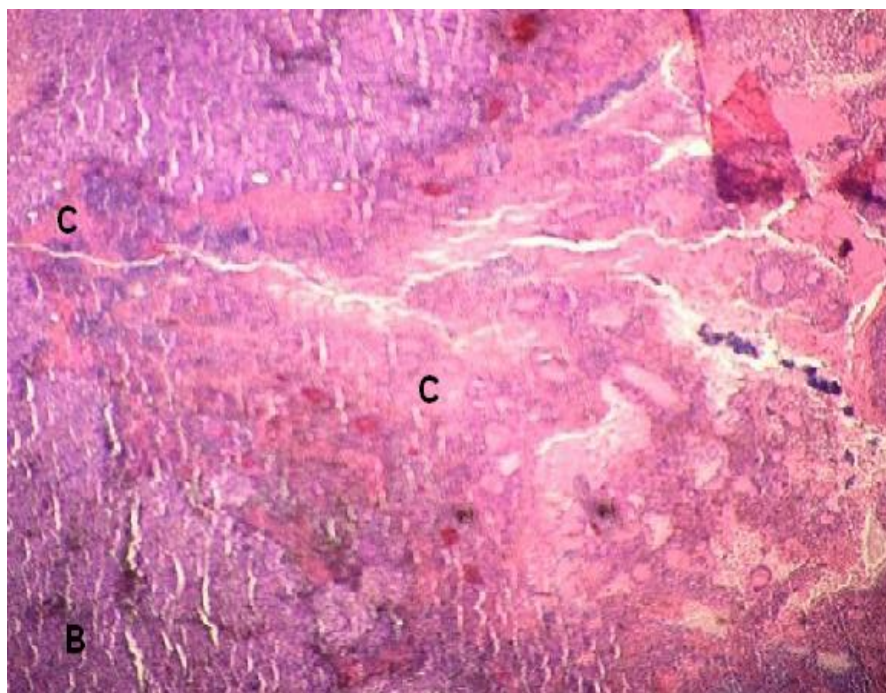
Obr. 13: Histologický preparát melanomu, léčený pomocí Zymosanu A- SMCC+ LPS, A- nádorová buňka, B- granulocyty, C- nekróza.

8.2 Příloha 2: Histologická tkáň neléčeného melanomu, 8 hod po terapii



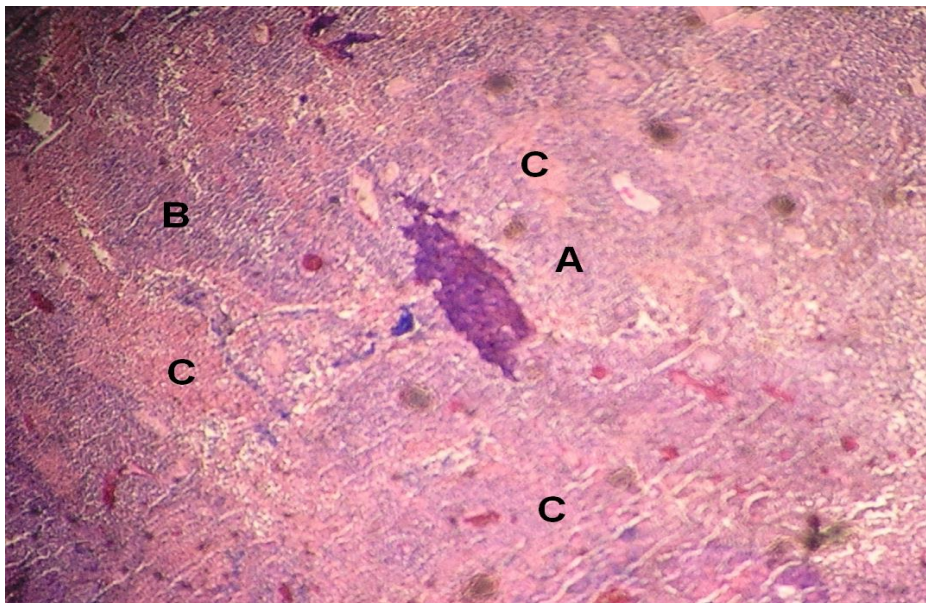
Obr. 14: Histologický preparát melanomu bez léčby, A- nádorová buňka, C- nekróza

8.3 Příloha 3: Melanom 48 hod po terapii Zymosanem- SMCC+ LPS



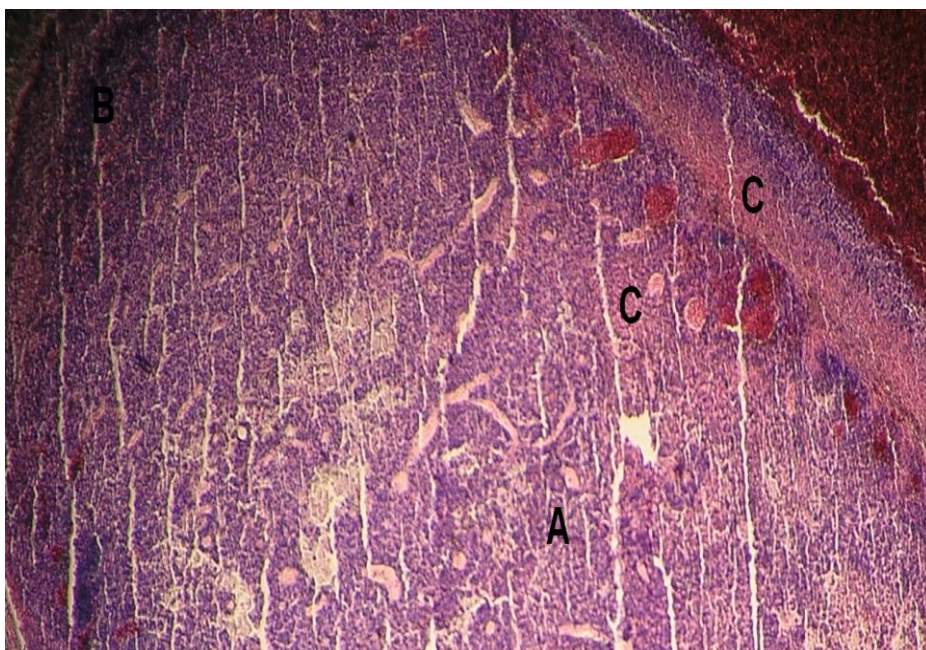
Obr. 15: Melanom léčený pomocí Zymosanu A- SMCC+ LPS, **B-** granulocyty, **C-** nekróza.

8.4 Příloha 4: Histologický preparát melanomu po 8 hod léčby pomocí LPS



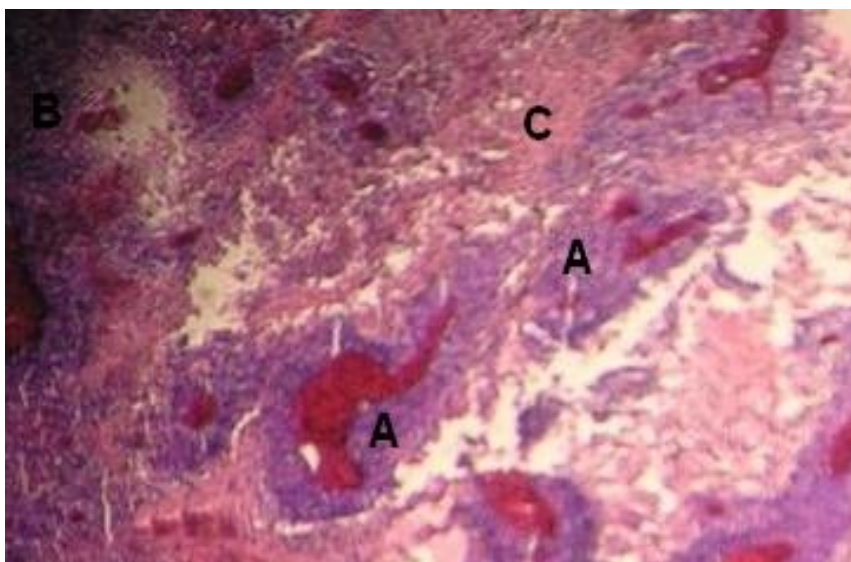
Obr. 16: Melanom léčený LPS, A- nádorová buňka, B- granulocyty, C- nekróza.

8.5 Příloha 5: Histologická tkáň melanomu léčeného kotveným Zymosanem A, 8 hod po terapii



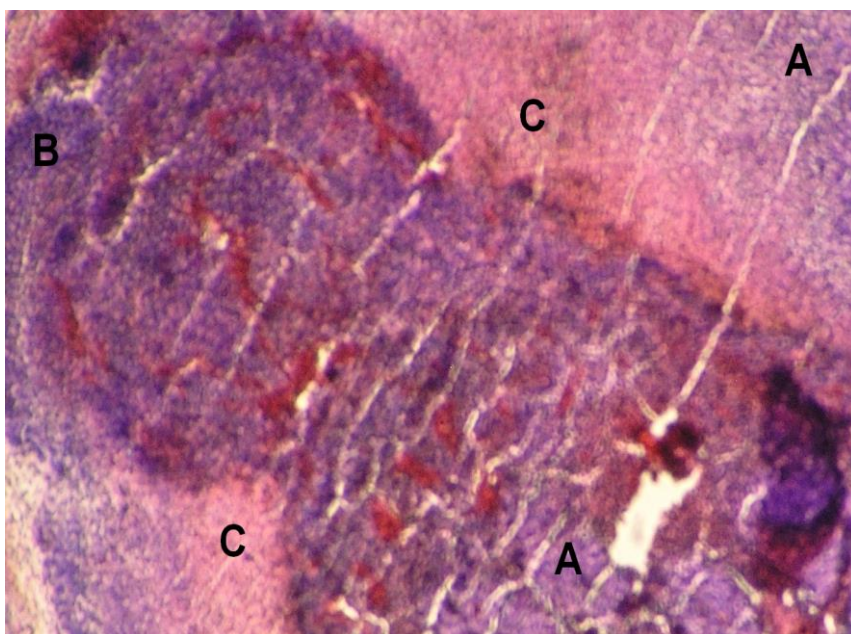
Obr. 17: Melanom léčený pomocí Zymosanu A- SMCC, A- nádorová buňka, B- granulocyty, C- nekróza.

8.6 Příloha 6: Melanom 48 hod po terapii pomocí LPS



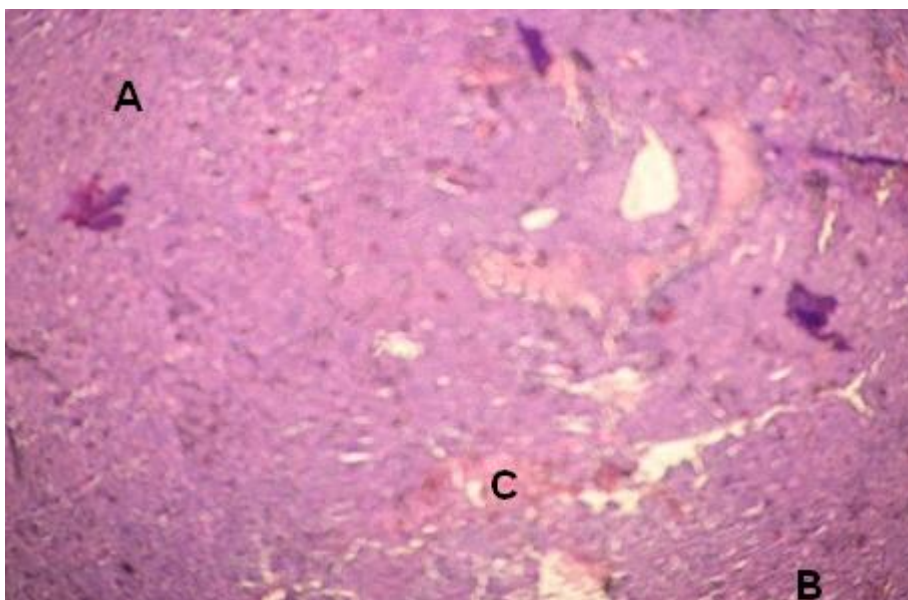
Obr. 18: Léčba melanomu pomocí LPS, **A-** nádorová buňka, **B-** granulocyty, **C-** nekróza.

8.7 Příloha 7: Melanom 48 hod po terapii pomocí kotveného Zymosanu A



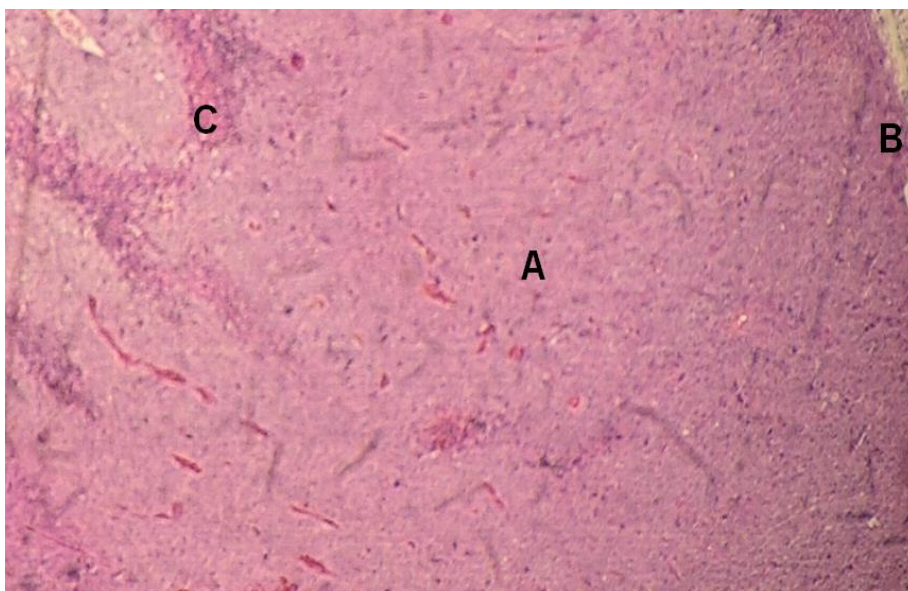
Obr. 19: Léčba melanomu pomocí Zymosanu A- SMCC, **B-** granulocyty, **C-** nekróza.

8.8 Příloha 8: Melanom 24 hod po vpichu PBS



Obr. 20: Histologická tkáň neléčeného melanomu, **A-** nádorová buňka, **B-** granulocyty, **C-** nekróza.

8.9 Příloha 9: Vliv kotvení SMCC na melanom, 24 hod od vpichu (lysin-SMCC)



Obr. 21: Histologická tkáň melanomu s kotvením SMCC, **A-** nádorová buňka, **B-** granulocyty, **C-** nekróza.