

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Nádorová imunoterapie založená na kombinaci
TLR7 signalizace a aktivace fagocytózy
nádorových buněk. Studium mechanismů
a zesílení účinku**

Bakalářská práce

Karolína Kvardová

Vedoucí práce: RNDr. Jan Ženka, CSc.

České Budějovice, 2016

Kvardová K., 2016: Nádorová imunoterapie založená na kombinaci TLR7 signalizace a aktivace fagocytózy nádorových buněk. Studium mechanismů a zesílení účinku. [Cancer immunotherapy based on combination of TLR7 signalling and activation of phagocytosis of cancer cells. Study of mechanisms and increase of effect. Bc. Thesis, in Czech] - 56 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

The aim of this thesis was to study cancer immunotherapy based on combination of TLR7 signalling and activation of phagocytosis of cancer cells. We studied the influence of our immunotherapy on parallel untreated tumor. Mechanisms of therapy were studied *in vitro*. The possibility to enhance therapeutic effect using more complex mixture of TLR agonists was studied as well.

Prohlášení:

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury. Prohlašuji, že 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, 22. dubna 2016

.....
Karolína Kvardová

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla v první řadě velmi poděkovat svému školiteli RNDr. Janu Ženkovi Cs. za šanci podílet se na projektu, kterému se dlouhá léta věnuje. Bez jeho pomoci, cenných rad a nápadů by byl vznik této práce nemožný. Jeho ochota kdykoli pomoci, bezbřehá trpělivost a nekonečný optimismus si zaslouží velký obdiv.

Dále bych chtěla poděkovat všem svým kolegyním za vstřícnost a příjemnou spolupráci. Velké díky patří především Mgr. Veronice Caisové za její rady a pomoc při zpracování metodických postupů a výsledků.

V neposlední řadě patří obrovské poděkování mé rodině za morální i finanční podporu po celou dobu mého studia.

OBSAH

1. ÚVOD	1
2. PŘEHLED LITERATURY	2
2.1 Nádorová onemocnění	2
2.1.1 Klasifikace nádorových onemocnění.....	2
2.1.2 Maligní melanom.....	3
2.1.2.1 Myší melanom B16-F10 studovaný v této práci.....	3
2.1.3 Možnosti terapie nádorových onemocnění.....	3
2.2 Imunitní systém	5
2.2.1 Specifická imunita	5
2.2.2 Nespecifická imunita	6
2.3 Nádorové onemocnění a imunitní systém	6
2.3.1 Nádorové imunitní znaky	7
2.3.2 Reakce imunitního systému na projev nádorových onemocnění	7
2.3.3 Mechanismy úniku nádorových buněk před imunitním systémem	9
2.4 Imunoterapie založená na specifické imunitě	10
2.5 Imunoterapie založená na nespecifické imunitě	11
2.5.1 Pathogen associated molecular patterns (PAMPs)	11
2.5.2 Pattern recognition receptors (PRRs)	11
2.5.2.1 Toll-like receptory (TLR)	13
2.6 Nádorová imunoterapie sledovaná v této práci	15
2.6.1 TLR agonisti užití v této práci.....	16
2.6.1.1 Resiquimod (R-848).....	16
2.6.1.2 POLY I:C	16
2.6.1.3 Lipoteichová kyselina (LTA).....	16
2.6.1.4 Pam ₃ CSK ₄	16
2.6.1.5 <i>Listeria monocytogenes</i>	17
2.6.2 Manan – ligand podporující fagocytózu, užitý v této práci.....	17
2.6.2.1 Vazba mananu na nádorové buňky	18
3. CÍLE PRÁCE	19
4. MATERIÁL A METODY	20
4.1 Chemikálie	20
4.2 Laboratorní zvířata	21

4.3 Buněčná linie	21
4.4 Příprava buněk B16-F10 pro <i>in vivo</i> a <i>in vitro</i> pokusy.....	21
4.5 Transplantace nádorových buněk.....	21
4.6 Měření velikosti nádorů	22
4.7 Hodnocení metastáz na plicích	22
4.8 Výpočet průměrné redukce nádorového růstu.....	22
4.9 <i>In vitro</i> metodika	22
4.9.1 Inkubace nádorových buněk s ligandem.....	22
4.9.2 Izolace buněk z kostní dřeně.....	23
4.9.3 Magnetická značení	23
4.9.4 Magnetická separace.....	23
4.9.5 Priming neutrofilů.....	24
4.10 Příprava látek pro terapii	24
4.10.1 Syntéza manan-BAM ₄₀₀₀	24
4.10.2 Syntéza manan-SMCC.....	24
4.10.3 Příprava Resiquimodu (Resiquimod.HCl).....	25
4.10.4 Příprava <i>Listeria</i> -SMCC.....	25
4.11 Analýza dat.....	25
5. EXPERIMENTY	26
5.1 Pokus č. 1: Vliv nádorové terapie pomocí směsí R-848.HCl, mannan-SMCC a LTA na paralelní nádor.....	26
5.2 Pokus č. 2: <i>In vitro</i> studium cytotoxického působení neutrofilů primovaných pomocí LTA na nádorové buňky s vázaným mannan-BAM.....	26
5.3 Pokus č. 3: Zjištění možnosti přímého použití TCEP v terapeutikách obsahujících mannan-SMCC a TLR agonisty	28
5.4 Pokus č. 4: Terapie melanomu pomocí R-848, mannan-BAM a dalších TLR agonistů	29
5.5 Pokus č. 5: Terapie melanomu pomocí směsí R-848, POLY I:C, mannan-BAM a LTA, sledování výskytu metastáz.....	30
6. VÝSLEDKY	31
6.1 Pokus č. 1: Vliv nádorové terapie pomocí směsí R-848.HCl, mannan-SMCC a LTA na paralelní nádor.....	31
6.2 Pokus č. 2: <i>In vitro</i> studium cytotoxického působení neutrofilů primovaných pomocí LTA na nádorové buňky s vázaným mannan-BAM.....	32

6.3 Pokus č. 3: Zjištění možnosti přímého použití TCEP v terapeutikách obsahujících mannan-SMCC a TLR agonisty	33
6.4 Pokus č. 4: Terapie melanomu pomocí R-848, mannan-BAM a dalších TLR agonistů	36
6.5 Pokus č. 5: Terapie melanomu pomocí směsi R-848, POLY I:C, mannan-BAM a LTA, sledování výskytu metastáz.....	38
7. DISKUZE	40
8. ZÁVĚREČNÉ SHRUTÍ	44
9. SEZNAM ZKRATEK	45
10. LITERATURA	47

1. ÚVOD

Statistické údaje a čísla každoročně upozorňují na vysoký výskyt nádorových onemocnění. Jejich absolutní vyléčení je i přes veškeré snahy vědců a lékařů prozatím nemožné. Nádory se neúprosně brání veškerým formám léčby. Nádorové buňky si dokáží přivlastnit ty nejlepší vlastnosti, které jsou buňky schopné vyprodukovat, a stávají se tak prakticky nezdolným mechanismem.

Díky dosavadním vědeckým výzkumům se podařilo některé obranné mechanismy nádorových buněk obejít, a dosáhnout tak alespoň prodloužení života pacientů. Pomocí moderních metod jsou dnes lékaři také schopni identifikovat nádorová onemocnění mnohem rychleji a tím se naděje na přežití významně zvyšuje, protože prozatím nedošlo k zakládání ložisek metastáz.

Existuje mnoho obecných preventivních rad, jak se nádorovým onemocněním vyhnout. Patří k nim dodržování zdravého životního stylu a fyzická aktivita. Samozřejmě odpustit si největší dnešní fenomén, a tím je kouření. Další praktickou radou je vyhnout se přílišné konzumaci alkoholu, špatnému stravování nebo dlouhému pobytu na přímém slunci. Ale ani dodržování těchto dobře míněných rad nedokáže zajistit, že se nádor neobjeví. Projev tohoto onemocnění mohou mít na svědomí i dědičné faktory.

Z tohoto pohledu je zřejmé, že podpora zlepšení léčby nádorových onemocnění je velmi důležitá. Najít vhodnou účinnou terapii je obtížné. V současné době vzrůstá snaha o vyvinutí takové léčby, která by dokázala využít své vlastní imunitní mechanismy k aktivaci protinádorové reakce, tzv. cílená imunoterapie.

I tato práce je zaměřena na imunoterapii – především na imunoterapii založenou na nespecifické imunitě. V této práci je studována imunoterapie, jež je založena na kombinaci TLR7 signalizaci a aktivaci fagocytárních receptorů.

2. PŘEHLED LITERATURY

2.1 NÁDOROVÁ ONEMOCNĚNÍ

Nádorová onemocnění, označovaná také jako rakovina či zhoubný novotvar, se rozvíjí v určité části těla, kde normální buňky začnou nekontrolovatelně růst. Jejich opakované dělení způsobuje vznik nových abnormálních buněk – buněk nádorových. Obecně se nádorové buňky vyvíjí z normálních buněk v důsledku poškození DNA. Toto poškození posléze není organismus schopen napravit (Sudhakar, 2009).

Nádorové buňky jsou specifikovány šesti základními společnými znaky. Patří mezi ně soběstačnost nádorových buněk v produkci růstových faktorů a jejich neomezený replikační potenciál. Dále jsou necitlivé vůči signálům, které brání jejich proliferaci, rezistentní vůči apoptóze, vyvolávají angiogenezi a v neposlední řadě je charakteristickým znakem jejich invazivita a metastazování (Hanahan a Weinberg, 2011). Právě poslední zmíněný znak, rozšiřování nádorových buněk a zakládání ložisek metastáz, představuje dnes největší problém v léčbě nádorových onemocnění (Fidler 1990). K těmto základním znakům jsou často připisovány i další rysy vyskytující se u nádorových buněk - nestabilita genomu nádorových buněk, poškození regulací buněčného metabolismu, indukce zánětu v místě nádoru, únik nádorových buněk imunitnímu systému (Hanahan a Weinberg, 2011).

2.1.1 Klasifikace nádorových onemocnění

Klasifikace nádorových onemocnění není zcela jednoznačná. Můžeme k ní využít několik hledisek.

- Rozdělení podle rozšíření nádorových buněk a tvorby metastáz:
 - nádory benigní (nezhoubné) – jejich základním znakem je, že nádorové buňky zůstávají v podobě primárního nádoru, který utlačuje okolní tkáň, ale nemetastazuje do okolních tkání. Nádory jsou tedy ohraničené a rostou pomalu.
 - nádory maligní (zhoubné) – jsou charakteristické rozšiřováním nádorových buněk po celém těle pomocí krevních a lymfatických cest, tím dochází k rozsevu metastatických ložisek a následné indukci metastáz. Nádory nejsou ohraničené a šíří se rychle.

- Rozdělení nádorových onemocnění podle původu:
 - můžeme rozpoznávat nádory pojivových tkání, epitelové nádory, nádory krevní a lymfatické tkáně, neuroektodermové nádory a smíšené nádory původem z více tkání (Sell, 2004).
- Rozdělení nádorových onemocnění podle orgánové lokalizace:
 - u pacientů můžeme rozlišovat např. prsu, plic, varlat, žaludku, tlustého střeva a konečníku, kůže apod.

2.1.2 Maligní melanom

Maligní melanom je zařazen mezi nádory neuroektodermálního původu (Sell, 2004). Je to agresivní, vůči terapii rezistentní, zhoubný nádor vznikající z melanocytů (Markovic a kol., 2007). Největším nebezpečím tohoto typu onemocnění je vysoké riziko šíření metastatických ložisek, pomocí krevního a lymfatického systému. Tento melanom dokáže prakticky metastazovat i dlouho poté, co je primární nádor odstraněn. (Emmett a kol., 2010).

Výskyt tohoto onemocnění se neustále zvyšuje po celém světě. Hlavní rizikové faktory tohoto onemocnění tvoří působení UV záření, světlá pleť, mnohočetná pigmentová znaménka a výskyt tohoto typu onemocnění v rodině (Markovic a kol., 2007). Přežití pacientů s maligním melanomem závisí především na včasné detekci tohoto onemocnění. K tomu značnou mírou přispělo vyšetření pomocí dermatoskopu, který umožní lepší náhled do podezřelých lézí (Rigel a Carucci, 2000). V současné době je toto vyšetření běžně dostupné a bezbolestné.

2.1.2.1 Myší melanom B16-F10 studovaný v této práci

Melanomy skupiny B16 patří k nejpoužívanějším syngenním modelům. Jsou spontánně odvozené z melanomu myší C57BL/6v (Becker a kol., 2010). V této práci byl ve všech pokusech použit melanom B16-F10. Tato linie byla společně s B16-F1 vyselektována z mateřské linie B16-F0. Z linie B16-F10 byla následně odvozena další linie, označena B16-F6 (Nakamura a kol., 2002). Konkrétně melanomová linie B16-F10 byla vytvořena z důvodu její zvýšené invazivity a následné tvorby plicních metastáz (Fidler 1975).

2.1.3 Možnosti terapie nádorových onemocnění

V současné době je mnoho typů nádorů poměrně dobře léčitelných. U dalších forem nádorových onemocnění je vyvíjena nejvyšší možná snaha o zlepšení jejich léčby. Důraz je

kladen především na zacílení nádoru v organismu pacienta. Byly vyvinuty různé formy terapie, které lze dle potřeby kombinovat.

- **Chirurgický zákrok**

Chirurgický zákrok patří k nejstarším a dodnes hojně využívaným způsobům léčby nádorových onemocnění (Sudhakar, 2009). Tato léčba je velmi často používána v kombinaci s chemoterapií nebo radioterapií. Obrovským problémem tohoto zákroku jsou metastázy, které v těle zůstávají (Brada a kol., 1992).

- **Chemoterapie**

Principem chemoterapie je podávání chemické látky do lidského těla. Tyto látky jsou označovány jako cytostatika. V těle pacienta působí na všechny buňky, ale nejvíce jsou postiženy buňky, u nichž dochází k rychlému dělení. Chemoterapie je tedy schopna postihnout i metastázy, což je výhoda, díky níž patří k základním formám terapie. Avšak toxicita pro ostatní lidské buňky je vysoká a dochází k jejich poškození (Martins a de Oliveira, 2009).

V současné době jsou studovány nové přístupy, které se snaží o snížení vedlejších účinků chemoterapie. Zahrnují nové kombinace léčiv, liposomální a monoklonální protilátky k cílení na rakovinné buňky, chemoprotektivní látky pro snížení vedlejších účinků chemoterapeutik, nebo možnost transplantace hematopoetických kmenových buněk. (Sudhakar, 2009)

- **Radioterapie**

Počátkem této terapie byl rok 1869, kdy byl objeven rentgen. O 3 roky později byla radiace použita pro diagnózu a léčbu rakoviny (Sudhakar, 2009). Zásadním principem radioterapie je tok proudu elektronů/fotonů, které jsou zacílené na nádorový útvar. Tímto ozářením dochází k destrukci nádorových buněk. Ovšem při tomto zákroku nejsou ničené pouze nádorové buňky, ale i zdravá tkáň v jejich okolí, což je zásadním problémem této léčby. Tento typ léčby je často využíván v kombinaci s chirurgickým zákrokem a také při chemoterapii (Sebag-Montefiore a kol. 2009).

- **Imunoterapie**

Imunoterapie se snaží využívat výkonnost a specifčnost imunitního systému pro léčbu zhoubného bujení. Imunitní systém je schopen rozpoznat a eliminovat nádorové buňky, avšak nádorové buňky často zasahují do vývoje a funkce imunitní odpovědi. Pro imunoterapii je výzvou vyvinout takovou strategii, která by efektivně a bezpečně rozšířila protinádorové reakce (Blattman a Greenberg, 2004). Jednou z cest může být imunoterapie založená na kombinaci TLR a fagocytárních receptorů, která je studována v této práci.

2.2 IMUNITNÍ SYSTÉM

Imunitní systém je vysoce vyvinutý biologický systém. Jeho úkolem je identifikovat a eliminovat tzv. cizí materiál (molekuly/antigeny), který je pro tělo nebezpečný, a rovněž eliminovat staré a nemocné buňky vlastní (Farmer a kol., 1986).

V imunitním systému můžeme určit 2 hlavní složky, tj. imunita vrozená (nespecifická) a získaná (specifická, adaptivní). Mnoho let se soudilo, že tyto dvě složky působí samostatně, ale bylo dokázáno, že spolu dokáží spolupracovat (Medzhitov a Janeway, 1997).

2.2.1. Specifická imunita (získaná, adaptivní)

Specifická imunita byla vyvinuta později než imunita nespecifická. Její největší doménou je schopnost rozpoznávat i nepatrné rozdíly mezi antigeny, dále imunologická paměť a diverzita tvorby struktur rozpoznávajících antigeny. Mezi buňky, které vykonávají funkci specifické imunity, patří T-lymfocyty, B-lymfocyty a plazmatické buňky (Bonilla a Oettgen 2010).

Pro to, aby byla tato složka imunitního systému aktivována, je nutná přítomnost antigenu. Na ten specifická imunita reaguje tím, že vytvoří protilátky pomocí B-lymfocytů nebo dojde k destrukci pomocí T-lymfocytů. Projev antigenu na nádorových buňkách je ovšem komplikovaný. Nádorové buňky jsou pozměněné, nicméně tělu vlastní, proto se na nich antigeny vyskytují v malém množství a jsou často slabé, nevyvolávající dostatečnou imunitní odpověď. Pro T-lymfocyty je potom klíčové, aby byl antigen prezentován společně s molekulami hlavního histokompatibilního systému. V nádorových buňkách je obvykle snížena exprese MHC molekul, což snižuje i schopnost vyvolat dostatečnou imunitní odpověď. Proto je velmi důležité, aby prezentace antigenu pomocí antigen prezentujících

buněk (APC) byla dostatečná (Medzhitov a Janeway, 1997). Mezi tyto antigen prezentující buňky jsou řazeny zejména makrofágy a dendritické buňky, které umožňují spojení mezi imunitou specifickou a nespecifickou. Nově jsou zařazovány rovněž neutrofilů a B lymfocyty (Bonilla a Oettgen, 2010).

2.2.2 Nespecifická imunita (vrozená)

Nespecifická imunita je považována za vývojově starší složku imunitního systému. Pro tuto složku bohužel není vyvinuta imunologická paměť, ale její efektorové buňky se dokáží aktivovat velmi rychle a reakce na vstup patogenu do organismu je prakticky okamžitá (Medzhitov a Janeway, 2000).

Mezi nespecifickou imunitu je zahrnuta řada mechanismů. Jako první můžeme uvést fyziologické bariéry, např. slizniční membrány, epitel plic nebo kůže (Raval a kol. 2014). Na jejich funkci mohou mít vliv i chemické látky, např. kyselina mléčná, properdin, lysozym, které zlepšují jejich funkci. Pokud dojde k tomu, že patogen překoná tuto prvotní obranu, na další fázi se začnou podílet buňky nespecifické imunity (neutrofilů, makrofágy, monocyty, bazofily, eosinofily, dendritické a žírné buňky), které jsou připravené k fagocytóze, s výjimkou NK (natural killer) buněk, u kterých tato vlastnost není vyvinuta. Fagocyty dokáží identifikovat částice, které jsou určené k fagocytóze, pomocí struktury na jejich povrchu, tzv. pathogen associated molecular patterns (PAMPs). K rozpoznávání používají své specifické povrchové receptory, tzv. pattern recognition receptors (PRRs), (Beutler, 2004).

Kromě této buněčné složky mohou být aktivovány i humorální složky nespecifické imunity. Mezi ně patří systém komplementu a jeho složek a cytokiny (Raval a kol. 2014).

2.3 NÁDOROVÁ ONEMOCNĚNÍ A IMUNITNÍ SYSTÉM

Imunitní systém dokáže rozpoznat a eliminovat tzv. cizí materiály. Využívá mnoha obranných mechanismů, aby takové částice zničil. U nádorů je velkým problémem, že imunitní systém mnohdy nedokáže nádorové buňky identifikovat, což znamená, že následná destrukce je nemožná, protože podnět k imunitnímu ataku nebyl dostatečný.

Významným krokem k využívání imunity v boji s nádorovými onemocněními byl objev schopnosti nespecifické imunity vyhledat a eliminovat nádorové buňky. V pokusech prováděných profesorem Cui byla u jedné myši s transplantovaným nádorem (sarkom S-180)

nalezena mutace, která způsobila její vyléčení. Vrozená imunita byla díky mutaci schopna identifikovat a zničit nádorové buňky (Cui a kol., 2003).

2.3.1 Nádorové imunitní znaky

Nádorové buňky mohou být rozpoznány imunitním systémem poté, co na svém povrchu exprimují antigeny. V současné době jsou známy dvě skupiny antigenů – tumor asociované antigeny (TAA) a tumor specifické antigeny (TSA). Zatímco tumor asociované antigeny (TAA) se vyskytují i u zdravých buněk, tumor specifické antigeny (TSA) se striktně objevují jen na buňkách nádorových, buď jako produkty genů, které byly mutovány (u tumorů vyvoláno kancerogenními látkami), nebo antigeny virální (Finn, 2008).

- **Tumor specifické antigeny (TSA)**

Jak již bylo zmíněno, tumor specifické antigeny lze nalézt pouze u buněk nádorových. Výskyt TSA je důsledkem bodových mutací, díky nimž dochází ke změnám proteinů na povrchu nádorových buněk. Antigeny, které jsou pro nádory specifické, se prezentují na buněčném povrchu společně s molekulami MHC I. třídy. Díky tomu jsou nádorové buňky identifikovány T- lymfocyty a může dojít k jejich eliminaci (Philipps a kol., 1985).

- **Tumor asociované antigeny (TAA)**

Na rozdíl od TSA lze tumor asociované antigeny nalézt nejen v nádorových, ale i ve zdravých buňkách. Jejich struktura není prakticky odlišná od antigenů v normálních zdravých buňkách. Jejich množství je ale podstatně vyšší. Rozdíl mezi zdravými a nádorovými buňkami spočívá ve změně exprese, tj. čase, místě a intenzitě výskytu. Prokazatelné zvýšení hladiny těchto antigenů může být využito při diagnostice nádorových onemocnění. Antigeny mohou být užity jako nádorové markery (Old a Chen, 1998).

2.3.2 Reakce imunitního systému na nádorová onemocnění

Imunitní systém dokáže soupeřit s nádorovými onemocněními na několika úrovních. Při změnách normálních zdravých buněk na nádorové se projevují také změny povrchových antigenů nádorových buněk. Ty jsou vylučovány do krve (Zitvogel a kol., 2008), kde jsou zachycovány antigen prezentujícími buňkami a dochází k jejich prezentaci v komplexu

s MHC II molekulami. Takto zviditelněné antigeny dokáží rozpoznat CD4+ T-lymfocyty (Wang, 2001).

CD4+ lymfocyty lze rozdělit na dvě významné subpopulace – Th1 a Th2.

- **Th1 subpopulace T-lymfocytů**

Th1 subpopulace T-lymfocytů aktivuje antigen prezentující buňky. Obvykle dendritickou buňku (DC), která následně aktivuje CD8+ cytotoxické T-lymfocyty (CTL), které jsou posléze schopné poznat antigen, jež je prezentovaný v komplexu s molekulami MHC I na shodné antigen prezentující buňce (Ridge a kol., 1998). Další funkcí Th1 lymfocytů je udržovat stálou funkci a množení CTL díky produkci cytokinů (Wang, 2001). Funkce cytokinů v imunitní odpovědi je velmi důležitá.

Cytokiny jsou signálními proteiny. Můžeme mezi ně řadit **interleukiny** (IL) a **interferony** (INF), (Malik a Waxman, 1992). Ve skupině interleukinů jsou významnými interleukin-2 (IL-2) a interleukin-12 (IL-12). IL-2 stimuluje produkci T lymfocytů (Smith, 1988). IL-12 je prozánětlivý cytokin, který indukuje tvorbu INF- γ a diferenciaci Th1. IL-12 je produkován dendritickými buňkami a fagocyty v průběhu infekce (Trinchieri, 2003). Interferony (INF) jsou glykoproteiny, které produkuje imunitní systém. Jejich přínosem je jejich podíl na buněčném množení, rozlišení a angiogenezi. Do protinádorové imunity je zařazen především INF- α , který má antiproliferační účinek, podporuje NK buňky a vyvolává expresi MHC I molekul (Jewett a Bonavida, 1994). Důležitý je také INF- γ , jež stimuluje makrofágy a NK buňky a také zvyšuje expresi antigenů hlavního histokompatibilního komplexu (Huang a kol., 1993).

- **Th2 subpopulace lymfocytů**

Th2 subpopulace lymfocytů se podílí na imunitě humorální a vyvolává aktivaci B lymfocytů na plazmatické buňky (plasmocyty), které jsou schopné vytvářet protilátky. Tyto tumor specifické protilátky přispívají k protinádorové obraně (Wang, 2001).

Dalšími podmnožinami CD4+ lymfocytů je **subpopulace Th9**, která produkuje cytokin interleukin-9 (IL-9) a přispívá k řadě zánětlivých onemocnění (Lu a kol., 2012) a také **subpopulace Th17**, která produkuje interleukin-17 (IL-17) a také interleukin-22 (IL-22). Buňky Th17 rovněž dokáží vyvolat zánět při autoimunitních onemocněních (Korn a kol., 2009)

Do protinádorové imunity se jako efektorové buňky zapojují NK buňky, NKT (Natural Killer T) buňky, (Dunn a kol., 2002), makrofágy (Alleva a kol. 1994) a dendritické buňky (Goldszmid a kol., 2003).

Makrofágy způsobují rozpad nádorových buněk a vyvolávají produkci tumor nekrosis faktoru beta (TNF- β). Tento faktor může být napojen na receptory na povrchu buněk a tím může způsobit programovanou buněčnou smrt (Alleva a kol. 1994).

NK buňky jsou významnou populací lymfocytů. Stejně jako T a B lymfocyty používají receptory, které způsobují jejich aktivaci. Pomocí MHC I jsou schopné rozpoznat nádorové buňky. Na rozdíl od normálních zdravých buněk buňky nádorové potlačují expresi MHC I, což NK buňky rozpoznávají pomocí receptoru KIRs (Garcia-Lora a kol. 2003).

U **dendritických buněk**, které patří mezi antigen prezentující buňky, bylo prokázáno, že jsou schopné prezentovat antigeny CD8⁺ T-lymfocytům a CD4⁺ T lymfocytům. Tím lze vyvolat mechanismy adaptivní imunity (Goldszmid a kol., 2003).

2.3.3 Mechanismy úniku nádorových buněk před imunitním systémem

Nádorové buňky jsou komplikovanými mechanismy, které se snaží imunitnímu systému všemožnými způsoby znemožnit jejich identifikaci a následnou eliminaci. Ke svému „skrývání“ využívají řadu únikových mechanismů, díky nimž je imunitní systém bezbranný.

K úniku před imunitním systémem bývá využívána **snížená exprese MHC I molekul** nádorovými buňkami. MHC I je exprimováno v malém množství, vůči němuž jsou CTL buňky lhostejné (Villalba a kol. 2013). Stále ale může být zahájen atak pomocí NK buněk. Ovšem i s tím si nádorové buňky dokáží poradit. Začnou exprimovat MHC Ib a takovou buňku NK buňky považují za vlastní, tudíž se o ni nezajímají (Haynes-Gilmore a kol., 2014).

Funkce imunitního systému může být potlačena také **produkcí TGF β** (transforming growth factor β), díky němuž dochází k tomu, že vznikají regulační T-lymfocyty (Treg) z CD4⁺ buněk. Tyto regulační T-lymfocyty pomocí TGF β i přímým kontaktem potlačují útok CTL na buňky nádorové a navíc je autokrinně podporován vznik nových Treg (Yamagiwa a kol. 2001).

Treg mohou produkovat i interleukin-10 (IL-10), jež je také zodpovědný za nádorovou toleranci. Navíc Treg podporují i angiogenezi nádorových buněk. (Facciabene a kol. 2012).

Nádorové buňky jsou dále schopné odradit imunitní systém **pomocí Fas ligandu**. Fas ligand je transmembránový protein, který dokáže na povrchu buněk indukovat tvorbu heterodiméru a navázat se na transmembránový Fas receptor. Tento Fas receptor se nachází i na buňkách imunitního systému. Navázání Fas ligandu na nádorové buňce na Fas receptor má za následek vyvolání programované buněčné smrti. Nádorové buňky proto záměrně snižují expresi Fas receptoru, aby nebyly citlivé vůči ataku lymfocytů, které mají Fas ligand. Naopak exprese Fas ligandu je zvýšená. T lymfocyty, které na svém povrchu produkují nejen Fas ligand, ale i Fas receptor, se poté váží na ligandy nádorových buněk a tím je zahájena jejich programovaná buněčná smrt. (O'Connell a kol., 1999). Tím jsou T lymfocyty zničeny a nádorové buňky se elegantně zbaví svého protivníka.

Tyto tři základní mechanismy ukazují, že nádorové buňky se snaží před imunitním systémem organismu skrýt a odvést od sebe pozornost. Organismus nádor nepovažuje za škodlivý jev, a proto na něj nereaguje žádnými mechanismy.

2.4 IMUNOTERAPIE ZALOŽENÁ NA SPECIFICKÉ IMUNITĚ

Imunoterapie je díky své šetrnosti velmi často vnímána jako moderní postoj v léčbě nádorových onemocnění. V současné době je hojně využívána především imunoterapie založená na specifické imunitě pomocí **monoklonálních protilátek** (Scott a kol., 2012), popřípadě lze využívat i **dendritické buňky** (Gilboa, 2007).

Využití **monoklonálních protilátek (MAb)** je v současné době jedna z nejúčinnějších metod léčby hematologických malignit a solidních tumorů. Díky tomu, že dochází k vazbě monoklonálních protilátek na buňky nádorové, může být aktivována buněčná cytotoxicita, která závisí na protilátkách (ADCC). Rovněž může být ovlivněna cytotoxicita závislá na komplementu (CDC), případně se aktivuje na protilátkách závislá buněčná fagocytóza (ADCP), (Scott a kol., 2012).

Imunoterapie využívající **dendritické buňky (DC)** je dalším způsobem používaným při imunoterapii založené na specifické imunitě. V první řadě je potřeba připravit dendritické buňky. Pacientovi jsou nejprve odebrány monocyty, z nichž jsou laboratorně připraveny nezralé dendritické buňky. Od stejného pacienta je potřeba také odebrat nádorovou tkáň, díky níž je připravena směs nádorových antigenů. Tyto dvě připravené složky se spojí a nezralé DC začnou směs antigenů zpracovávat. Na povrchu DC jsou pak antigeny prezentovány v komplexu s MHC II molekulami. Po stimulaci dozrávají a exprese

kostimulačních molekul dojde k navrácení takto připravených DC do těla pacienta. DC vyvolají aktivaci T-lymfocytů, které atakují nádorové buňky (Gilboa, 2007).

2.5 IMUNOTERAPIE ZALOŽENÁ NA NESPECIFICKÉ IMUNITĚ

V terapii, která je založena na nespecifické imunitě, jde především o identifikaci pathogen associated molecular patterns (PAMPs) pomocí pattern recognition receptors (PRRs).

2.5.2 Pathogen associated molecular patterns (PAMPs)

Buňky nespecifické imunity mají schopnost rozpoznávat přítomnost patogenních mikroorganismů. Ty jsou rozeznávány na základě jednotlivých vzorů, tzv. pathogen associated molecular patterns (PAMPs), což jsou velmi malé molekuly, mnohdy dokonce části molekul, které se vyskytují na povrchu bakterií, virů, kvasinek, hub a dalších infekčních mikroorganismů. Jsou rozeznávány škálou receptorů, které jsou označovány jako pattern recognition receptors (PRRs). Na každý PAMPs odpovídá jeden PRR (pattern recognition receptor), který je přítomen na buňkách nespecifické imunity. Mezi typické PAMPs jsou zařazovány lipopolysacharidy, lipoproteiny, formyl-methionin, peptidoglykan, manan, flagelin, nebo např. dvouřetězcová DNA (Thomas a Badini, 2011).

Kromě PAMPs existují i další motivy se schopností zahájit imunitní odpověď po navázání na PRRs. Jsou jimi damage associated molecular pattern (DAMPs). Tyto molekuly jsou produkovány buňkami, které procházejí neprogramovanou buněčnou smrtí. Pokud buňka prochází typickou programovanou smrtí, neboli apoptózou, DAMPs není sekretováno. Díky tomuto důmyslnému systému je tělo schopno identifikovat, zda došlo k přirozené smrti buňky. Mezi hlavní zástupce DAMPs patří HMGB1 (high mobility group box 1), S100 proteiny, IL-1 α , HSPs (heat shock proteins) a kyselina močová (Bianchi a kol., 2007).

2.5.3 Pattern recognition receptors (PRRs)

Jak již bylo uvedeno, PAMPs jsou rozeznávány škálou receptorů, které jsou označovány jako **pattern recognition receptors** (PRRs), které exprimují buňky vrozené imunity. Tyto receptory můžeme rozdělit podle různých kritérií. Můžeme brát v úvahu, zda jsou na buňce pevně vázány, či jsou volné, popř. v jaké části buňky se vyskytují (Akira a kol., 2006). U PRRs můžeme rozlišit tři třídy, a to PRRs cytoplazmatické, sekretované a membránové (Elfeil a kol., 2013).

- **PRRs cytoplazmatické:**

- **NOD like receptory (NLR)**

Patří do skupiny cytosolických receptorů. Slouží jako druhá vlna organismu při napadení patogeny, především jsou schopné rozlišovat různé bakteriální komplementy. Mezi nejvýznamnější zástupce této třídy patří NOD1 a NOD2 receptory (Akira a kol., 2006).

- **RIG-1-like receptory**

Rovněž je můžeme řadit k cytosolickým receptorům a jejich funkce je podobná jako u NLR, tudíž bránit organismus před patogeny. Na rozdíl od NLR, RIG-1-like receptory rozeznávají především virovou RNA (Akira a kol., 2006).

- **PRRs sekretované:**

- **C-reaktivní protein (CRP)**

Tento protein je tvořen v játrech a do těla je vylučován při akutních infekcích jako jeden z nejvýznamnějších reaktantů akutní fáze. Dokáže spustit klasickou cestu komplementové kaskády, která vede k opsonizaci patogenů, a tím je urychlen proces fagocytózy (Janeway a Medzhitov, 2002).

- **Lektin vázající manózu (MBL)**

MBL je stejně jako CRP produkován v játrech (Janeway a Medzhitov, 2002). Dokáže rozlišovat různé cizorodé uhlíkaté molekulové vzory na povrchu virů, bakterií, prvoků i hub. Rovněž jako CRP je schopen opsonizovat patogeny a spouštět aktivaci komplementu pomocí lektinové dráhy. Tím pádem dochází k urychlení jejich fagocytózy (Petersen a kol., 2001).

- **PRRs membránové:**

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

Tyto receptory obsahují jednu či více C-typ lektin-like domén. Poté, co rozpoznají PAMPs jsou aktivovány nitrobuněčné signální dráhy a tím dochází k regulaci genové exprese. Tyto CLRs receptory exprimují především monocyty, makrofágy nebo DC. Rozpoznávají především manózu, fruktózu či jiné struktury. Mezi nejdůležitější zástupce této třídy patří Dectin1 a Dectin2 (Figdor a kol., 2002).

- **Formyl peptidové receptory (FPRs)**

Tyto transmembránové receptory lze nalézt především na leukocytech. Rozlišují formyl peptidové molekuly, které se mohou projevit v organismu při bakteriální, popř. jiné infekci (Fu a kol., 2006).

- **Scavengerové receptory**

Tyto receptory jsou kromě vychytávání nízkodenzitních lipoproteinů (LDL) schopné rovněž rozpoznávat apoptické buňky či různé endogenní molekuly (PrabhuDas a kol., 2014).

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

Patří k nejlépe prostudovaným transmembránovým receptorům.

2.5.2.1 Toll-like receptory

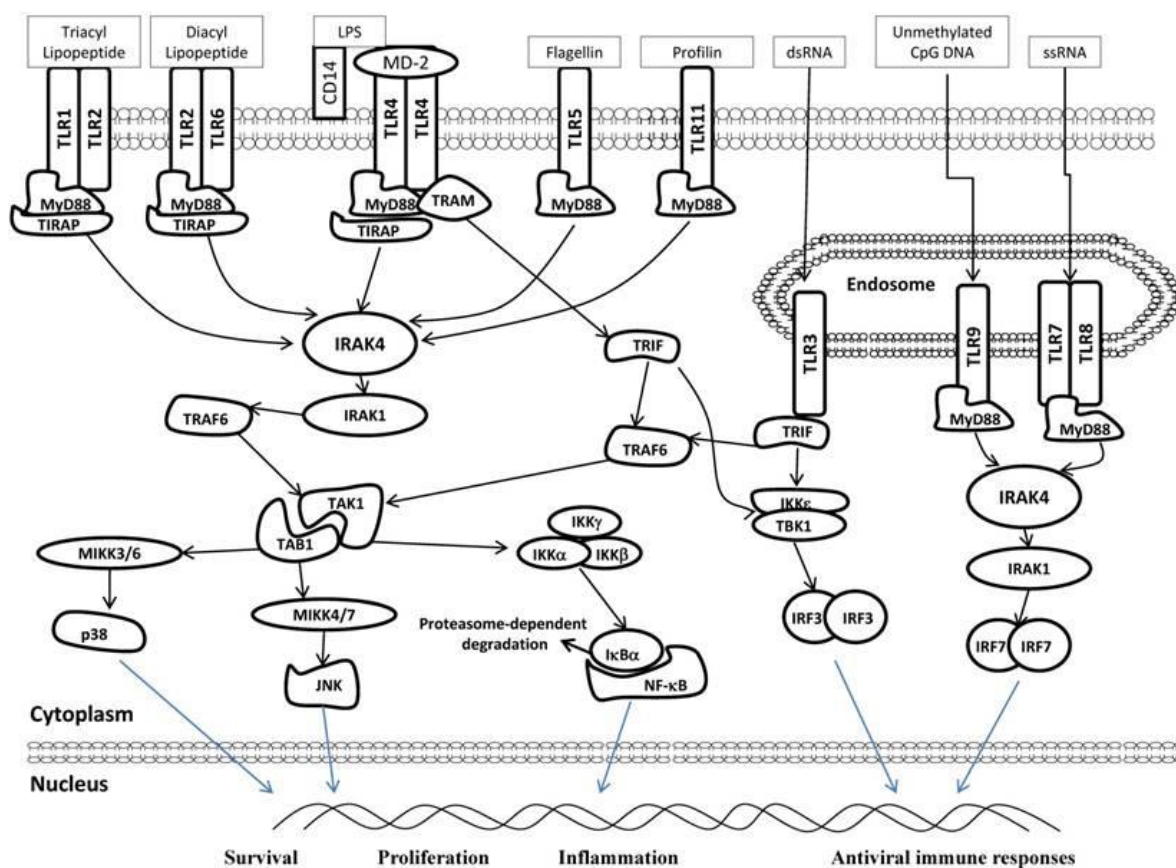
Toll-like receptory byly prvními identifikovanými PRRs. Rodina TLRs se skládá z 10 lidských (TLR 1-10) a 12 myších (TLR 1-9 a TLR 11-13) typů Toll-like receptorů (Kawasaki a Kawai, 2013). Přehled všech TLRs je zaznamenán v tabulce (Tab. I).

TLRs jsou lokalizovány na membránách buněk imunitního systému nebo začleněny do intracelulárních oddílů, např. endozomů. Jsou schopné rozeznávat přímé nebo překrývající se motivy PAMPs, jako jsou lipidy, lipoproteiny, proteiny a nukleové kyseliny (Kawasaki a Kawai, 2013).

Strukturálně se každý TLRs skládá z ektodomény, která obsahuje nesčetné repeticce obohacené leucinovými motivy (LRRs), jejichž hlavním úkolem je již zmíněná identifikace PAMPs. Dalšími složkami jsou transmembránová doména a také cytoplazmatická, rovněž

nazývána jako Toll/IL-1 receptor (TIR), (Kawasaki a Kawai, 2013), která zahajuje aktivaci cytoplazmatické signální dráhy (Kawai a Akira, 2011).

Po rozeznání motivu PAMPs a aktivace signální dráhy je stimulována odpověď imunitního systému. Existují dvě hlavní dráhy aktivace TLRs. První je zprostředkována pomocí adaptorového myeloidního diferenciačního 88 (MyD 88), ať už dependentního či independentního. Tuto cestu využívá většina TLRs. Obecně platí, že po navázání TLR s vlastním ligandem) dochází k přitažení MyD 88, který následně aktivuje NF- κ B (transkripčního nukleární faktoru- κ B), MAP kinázy (mitogen-activated protein kinases) a interferonu (IFRs). Výjimku tvoří TLR3 a také TLR4 (ovšem TLR4 má možnost aktivace přes MyD , který využívá druhou cestu aktivace, tzn, přes TRIF (TIR domain-containing adaptor inducing IFN- β). Aktivace TRIF dále vede k tvorbě antivirového interferonu I. typu, protizánětlivých cytokinů a chemokinů. (Liew a kol., 2005; Cook a kol., 2004). Dráhy TLR signalizace jsou znázorněny na následujícím obrázku (Obr. 1).



Obr. 1: Znázornění drah TLR signalizace. (převzato z So a Ouchi, 2010)

Dále může být podpořeno vyžrávání DC, které se podílejí na prezentaci antigenu. Rovněž mohou být aktivovány cytotoxické T-lymfocyty a NK buňky a zahájena fagocytóza zprostředkovaná neutrofily a makrofágy (Barton a Medzhitov 2003).

Tab. I: Přehled TLRs, včetně jejich lokalizace, adaptorové molekuly a jejich příslušných ligandů (převzato z Kaczanowska a kol. 2013).

TLR	Buněčná lokalizace	Adaptorová molekula	Ligand	Zdroj ligandu
TLR1-2	Membrána	MyD 88	Triacylované lipoproteiny, lipoteichová kyselina, peptidoglykany	Bakterie
			Zymosan	Houby
			Pam ₃ CSK ₄	Syntetické
TLR2-6	Membrána	MyD 88	Diacylované lipopeptidy	Bakterie
			HSPs, HMGB1, kyselina močová, fibronectin, ECM proteiny	Endogenní
TLR3	Endozomy	TRIF	ds RNA	Viry
			POLY I:C	Syntetické
TLR4	Membrána (popř. endozomy)	MyD 88/ TRIF	LPS, lipoteichová kyselina	Bakterie
			β-defensin 2, fibronectin EDA, HMGB1, snapin, tenascin C	Endogenní
TLR5	Membrána	MyD 88	Flagellin	Bakterie
TLR7-8	Endozomy	MyD 88	ss RNA	Viry
			CpG-A, Poly G10, Poly G3	Syntetické
TLR 9	Endozomy	MyD 88	nemetylované CpG DNA	Syntetické
TLR10	Membrána	MyD 88	Neznámé přírodní ligandy	
			Pam ₃ CSK ₄ , PamCysPamSK ₄	Syntetické
TLR11	-	-	<i>Toxoplasma gondii</i> , profilin	Prvoci
TLR12	-	-	neznámé	-
TLR13	Endozomy	MyD 88	VSV	Virus

2.6 NÁDOROVÁ IMUNOTERAPIE POUŽÍVANÁ V TÉTO PRÁCI

Nádorová imunoterapie v této práci je založena na kombinaci výše uvedených TLR ligandů a agonistů receptorů stimulujících fagocytózu. V předcházející práci Janotové a kol. (2014) bylo prokázáno, že tato kombinace je účinným prostředkem pro terapii. V práci byly kombinovány rozpustné ligandy, které mají signalizační účinek, a ligandy fagocytárních receptorů, jež se kotví na buňky nádorové. Signalizace má vliv na granulocytární infiltraci a rozvinutí procesu zánětu. Agonisté receptorů stimulujících fagocytózu mají za úkol nasměrovat buňky fagocytózy na buňky nádorové. Tento proces pak vede k destrukci těchto buněk (Janotová a kol. 2014).

V této práci byl jako hlavní TLR agonista použit Resiquimod (R-848). Pro zesílení účinku signalizace poté další TLR agonisté – POLY I:C, LTA, Pam₃CSK₄ a *Listeria monocytogenes*. Jako ligand stimulující fagocytózu byl užit manan.

2.6.2 TLR agonisté užití v této práci

2.6.1.1. Resiquimod (R-848)

R-848 je nízkomolekulární molekulou. Jeho doménou jsou silné protinádorové a protivirové účinky. U myši byl definován jako agonista TLR7, u lidí jako agonista TLR7/8. Po navázání na TLRs je aktivováno vylučování protilátek, dále tvorba cytokinů a zároveň dochází k regulaci produkce INF- γ (Hattermann a kol., 2007).

R-848 po navázání na TLR makrofágů, dendritických buněk, B-lymfocytů i NK buněk je zodpovědný za aktivaci MyD88 dependentní signální dráhy. Tento projev vede k aktivaci NF- κ B. Následně dochází k produkci prozánětlivých cytokinů a zároveň dalších mediátorů, především interferonu α (IFN α) a dalších např. IL-1 β , IL-6 a TNF- α (Zhou a Sun, 2015).

2.6.1.2 POLY I:C (polyinosinická-polycitidylická kyselina)

POLY I:C je synteticky vyrobená napodobenina ds RNA a zároveň je považována za agonistu TLR3. Po navázání na TLR3 je zahájena signální dráha přes adaptorovou molekulu TRIF a jsou aktivovány transkripční faktory, dále např. NF- κ B, prozánětlivé cytokiny, protein-1 způsobující tvorbu interferonu typu I, který může dále indukovat aktivitu NK buněk či zranění buněk dendritických (Cheng a Xu., 2010).

2.6.1.3 Lipoteichová kyselina (LTA)

LTAs se vyskytují v buněčné stěně většiny grampozitivních bakterií a jsou spojené cytoplazmatickou membránou. LTA je řazena mezi ligandy TLR2. Po spojení s TLR2 dochází k zahájení imunitní odpovědi. Jsou produkovány prozánětlivé mediátory (např. TNF- α a IL-1 β). Dále je aktivován systém komplementu a mohou být uvolňovány radikály kyslíku a dusíku z neutrofilů, popř. makrofágů (Schwandner a kol., 1999).

2.6.1.4 Pam₃CSK₄ (palmitoyl-3-cystein-serin-lysin-4)

Pam₃CSK₄ je syntetický tripalmitový lipoprotein, který napodobuje acylovaný amino konec bakteriálních lipoproteinů. Je to účinný aktivátor prozánětlivého transkripčního

faktoru NF- κ B (Aliprantis a kol, 1999). Rozpoznávací Pam3CSK4 je zprostředkováno TLR2, který spolupracuje s TLR1 prostřednictvím své cytoplazmatické domény. Poté je spuštěna signální kaskáda vedoucí k aktivaci NF- κ B (Ozinsky a kol., 2000).

2.6.1.5 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes je malá grampozitivní bakterie, která je užívána jako agonista TLR2. Vyvolává silnou nespecifickou reakci, která se vyznačuje sekrecí prozánětlivých cytokinů, např. TNF, IL-12 a dalších chemokinů (Flo a kol., 2000). Tato odpověď je zprostředkována interakcí s TLR2. Stimulace vyvolává okamžitou aktivaci NF- κ B a produkci prozánětlivých cytokinů (Hauf a kol., 1997).

2.6.2 Manan – ligand podporující fagocytózu, užitý v této práci

Jako fagocytární receptor byl v této práci užit manan, jež je dále charakterizován. **Manan** je polysacharidem nacházejícím se v buněčné stěně kvasinek, popř. gramnegativních bakterií. Tento polysacharid je složen z několika podjednotek D-manózu, které jsou spojené pomocí glykosidické vazby (Cawley a Ballou 1972). Imunitní systém rozpoznává manan pomocí dvou receptorů. Jsou jimi **manózový receptor (MR)** a **lektin vázající manózu (MBL)**, (Janeway a Medzhitov 2002).

- **Manózový receptor (MR)**

Tento receptor se vyskytuje na určitých populacích makrofágů, také dendritických buněk či endotelu. Jeho charakteristickým projevem ve struktuře je N-terminální doména obohacená o cystein. Ve struktuře se dále projevuje fibronektin typu II a několik CTLDs (C-type lectine-like domains (Martinez-Pomarez 2012).

Manózový receptor na sebe váže patogeny, např. bakterie, viry. K tomu dochází díky schopnosti rozpoznat manózové zbytky na povrchu bakterií, či virů. Po rozpoznání se podílí na následné fagocytóze či endocytóze těchto mikroorganismů, napomáhá prezentaci antigenu a intracelulární signalizaci. V neposlední řadě se podílí i na produkci prozánětlivých i antizánětlivých cytokinů (Crespo a kol., 2011).

- **Lektin vázající manózu (MBL)**

MBL je protein řazený mezi kolektiny. Obsahuje kolagenovou a lektinovou doménu. Jeho schopností je zahajovat lektinovou dráhu aktivace komplementu. MBL na sebe

navazuje karbohydráty na povrchu určitých patogenů. Před aktivací lektinové cesty komplementu musí být vytvořen komplex MBL a serinových proteáz, tzv. MASPs 1 a 2 (MBL asociované serinové proteázy), (Sompayrac, 1999), štěpící C4 a C2 za vzniku C3 konvertázy (C4b2a), (Beltrame a kol. 2015). Pomocí této konvertázy je C3 sérový protein následně štěpen na C3a a C3b fragmenty. C3b po navázání na povrch patogenu spustí komplementovou kaskádu, jejímž výsledkem je rozpad daného patogenu. C3b se mohou rovněž podílet na opsonizaci a urychlovat fagocytózu (Sompayrac, 1999).

2.7.1 Vazba mananu na nádorové buňky

V předchozí práci Janotové a kol. (2014) byla vazba na nádorové buňky zprostředkována pomocí biokompatibilní kotvy pro membrány **BAM** a bifunkčního crosslinkeru **SMCC**.

Vazbou agonistů fagocytárních receptorů na buňky nádorů lze podpořit fagocytární napadení nádorových buněk, které vede k jejich likvidaci (Janotová a kol., 2014).

- **Kotvení pomocí BAM** – jeden konec molekuly BAM je tvořen hydrofobním řetězcem kyseliny olejové, díky níž je umožněno kotvení do cytoplasmatické membrány nádorové buňky. Opačný konec navazující terapeutické látky je hydrofilní a obsahuje polyethylenglykol. Na tomto konci je rovněž umístěna NHS skupina, která umožňuje připojení ligandů. (Kato a kol., 2004).
- **Kotvení pomocí SMCC** (neboli sukcinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyklohexan-1-karboxylát) - SMCC je heterobifunkční crosslinker. Na jednom konci obsahuje maleimidovou skupinu, jež váže sulfhydrylové skupiny. Na opačném konci je obsažena NHS skupina, která umožňuje navázání terapeutické látky (Mattson a kol., 1993). V předchozích pracích Janotové a kol. bylo správné navázání SMCC s ligandem k nádorovým buňkám podpořeno pomocí aplikace TCEP (tris(2-karboxyethyl)fosfin) hodinu před aplikací terapeutika. TCEP díky redukci cystinů uvolňuje SH vazby a je podpořeno navázání SMCC s terapeutickou látkou (Janotová a kol., 2014).

3. CÍLE PRÁCE

- Vliv nádorové terapie na paralelní nádor
- Studium mechanismů terapie in vitro
- Ověření možnosti zesílení účinku terapie dalšími imunomodulátory

4. MATERIÁL A METODY

4.1 Chemikálie

- BAM - biokompatibilní kotva pro membrány, Mw 4000 (NOF)
- DMSO - dimetyl sulfoxid (Sigma- Aldrich)
- EDTA - kyselina ethylendiamintetraoctová (Sigma- Aldrich)
- FCS - fetální bovinní sérum (Sigma-Aldrich)
- GM-CSF - granulocyte macrophage colony stimulating factor (Sigma-Aldrich)
- Laminarin - z *L. digitata* (Sigma-Aldrich)
- *Listeria monocytogenes* (InvivoGen)
- LTA - lipoteichová kyselina z *Bacteria subtilis* (Sigma-Aldrich)
- Manan - ze *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma-Aldrich)
- Neutrophil Isolation Kit (Miltenyi Biotec)
- Pam₃CSK₄ - palmitoyl-3-cystein-serin-lysin-4 (InvivoGen)
- Poly I:C - polyinosinická-polycitidylická kyselina (Sigma-Aldrich)
- Resiquimod (R-848), (Tocris)
- RPMI 1640 (Sigma-Aldrich)
- SMCC - sukcinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyklohexan-1-karboxylát (Thermo)
- TCEP - tris(2-karboxyethyl)fosfin (Sigma-Aldrich)
- TNF- α – tumor necrosis factor α (Sigma-Aldrich)
- Trypsin (Sigma-Aldrich)

4.2 Laboratorní zvířata

Při všech pokusech byly užity samice myši typu C57BL/6N z chovu Charles River laboratories. Myši byly chovány ve sterilních boxech s přísunem pitné vody a krmiva ve formě suchých pelet. V místnosti byly udržovány standardní podmínky - konstantní teplota 22 °C, relativní vlhkost 65% a fotoperioda na 12/12 hodin. Myši pro pokusy byly použity po dovršení 8 týdnů a průměrné hmotnosti 18-20 g.

4.3 Buněčná linie

V experimentech byl užit myši melanom B16-F10. Buňky tohoto melanomu byly kultivovány v médiu RPMI 1640 s 10% bovinním fetálním sérem a s aditivou o následujících výsledných koncentracích: Amphotericin B 0,25 µg/ml, Penicilin G 100 j./ml a Streptomycin 100 µg/ml) L-glutaminu 292 µg/ml. Tato kultivace probíhala v termostatu při konstantní teplotě 37 °C a v atmosféře nasycené vodními parami obsahujícími 5 % podíl CO₂.

4.4 Příprava buněk B16-F10 pro *in vivo* a *in vitro* pokusy

Poté, co bylo slito kultivační médium, byly narostlé nádorové buňky 3x důkladně promyty sterilním pufrčním fyziologickým roztokem (PBS). K promytným buňkám bylo přidáno 0,5 ml trypsinizační směsi (0,25% trypsin, 0,02% EDTA v HBSS). Buňky společně s trypsinizační směsí byly inkubovány v termostatu při 37°C po dobu 3 minut, aby došlo k uvolnění adherovaných buněk. Poté byly zkontrolovány pod binolupou a trypsinizace byla ukončena přidáním 15 ml RPMI 1640 s FCS. Suspenze buněk byla slita do centrifugační zkumavky a byla provedena centrifugace (5 min/4 °C/160 g). Po centrifugaci byl slit supernatant a buněčný pelet byl rozsuspendován v RPMI 1640 bez FCS. Vzorek takto připravené suspenze byl naředěn v poměru 1 : 1 trypanovou modří (0,5% vodný roztok trypanové modří) a pomocí Bürkerovy komůrky byla spočítána aktuální koncentrace buněk v 1 ml média. Tato koncentrace byla upravena na potřebnou koncentraci.

4.5 Transplantace nádorových buněk

Myši po dovršení 8 týdnů byly oholeny na pravém boku. Při experimentu, kdy byly nádorové buňky transplantovány do pravého i levého boku, byly oholeny oba boky. Do oholené oblasti jim bylo subkutánně transplantováno 4×10^5 nádorových buněk v 0,1 ml RPMI 1640 bez séra na myš. V pokusu č. 5 proběhla kromě klasické subkutánní transplantace také transplantace nádorových buněk přímo do ocasní žíly (i.v. aplikace). Při

této aplikaci bylo injikováno 1×10^5 melanomových buněk v 50 mikrolitrech media bez séra/myš.

4.6 Měření velikosti nádorů

K měření nádoru byl užit kaliper. Měření bylo provedeno každý druhý den. Objem nádoru byl vypočten následně dosazením naměřených hodnot do vzorce:

$$V = \pi/6 * AB^2$$

(A je nejdelší naměřený rozměr a B nejkratší naměřený rozměr, zpravidla výška nádoru, obojí je uvedeno v milimetrech)

4.7 Hodnocení metastáz na plicích

Melanom B16-F10 metastazuje do plic, kde byly metastázy počítány. V pokusu č. 5 byly myši analyzovány bezprostředně po uhynutí. Poté, co byly jejich plíce vyjmuty z hrudníku, byla metastatická ložiska spočítána. Na plicích se projevovala jako černé tečky různých velikostí. Bylo provedeno určení distribuce metastáz podle velikosti a plíce byly uloženy v 4 % roztoku formaldehydu.

4.8 Výpočet průměrné redukce nádorového růstu

Výpočet redukce nádorového růstu v porovnání s kontrolní skupinou byl proveden podle vzorce:

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

Tato redukce byla stanovována ve dnech 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30 od počátku terapie. Z výsledných hodnot byla posléze stanovena získána hodnota průměrné redukce nádorového růstu vůči kontrolní skupině.

4.9 IN VITRO METODIKA

4.9.1 Inkubace nádorových buněk s ligandem

Po sklizení nádorových buněk B16-F10, podle postupu uvedeného výše (mimo RPMI 1640 + 10 % FCS bylo použito RPMI + 10% nedeaktivovaného FCS), byla koncentrace buněk upravena 1×10^6 buněk na 1 ml. Poté byla suspenze melanomových buněk napipetována na 96 jamkovou destičku. K této suspenzi byly přidány příslušné ligandy, které

byly společně s nádorovými buňkami inkubovány 30 minut při teplotě 37 °C v 5% CO₂. Po inkubaci byla destička centrifugována (2 min, 4°C, 424g) a následně byly odlity supernatanty. Po odstranění supernatantu byly všechny jamky promyty 200 µl RPMI 1640 s 10% nedeaktivovaného FCS. Následovala opět centrifugace a odlití supernatantů předchozím způsobem.

4.9.2 Izolace buněk z kostní dřeně

Neutrofilů použité pro in vitro pokus byly izolovány z kostní dřeně myši. Myši byly nejprve usmrcené stržením vazů. Pro další použití byly odejmuty obě dolní končetiny. Po zbavení kůže, šlach a svaloviny byly položeny do Petriho misky s médiem RPMI 1640 bez séra. Poté došlo k oddělení stehenní a holenní kosti. Ze všech kostí byly odstříhány obě kloubní hlavice. Takto upravené kosti byly pomocí sterilní 5ml injekční stříkačky a sterilní jehly (velikost 26G) propláchnuty médiem RPMI 1640 bez séra. Tímto postupem došlo k uvolnění kostní dřeně, která byla rozsuspendována 1ml pipetou a přenesena přes filtr (filtr BD, 50µm) do centrifugační zkumavky. Vzorek suspenze byl spočítán v Bürkerově komůrce a živnost buněk ověřena pomocí trypanové modři. Následně byla provedena centrifugace (10min, 4°C, 160g) a k peletu bylo přidáno kultivační médium dle potřeby.

4.9.3 Magnetická značení

Neutrofilů, které byly vyizolovány podle výše uvedeného postupu, byly převedené z kultivačního média do pufru (200 µl na 5x10⁷ buněk). Pufry byl připraven pomocí PBS, 2 %FCS a 2mM EDTA. K takto připraveným buňkám byla napipetována primární protilátka (50 µl na 5x10⁷ buněk). Po promíchání a inkubaci s primární protilátkou 10 minut v lednici následovalo promytí buněk v pufru (5-10 ml na 5x10⁷ buněk) a centrifugace (10 min/4 °C/160 g). Po centrifugaci byl kompletně odsátý supernatant a pelet byl rozsuspendován v pufru (400 µl na 5x10⁷ buněk). Následně byla přidána sekundární protilátka (100 µl na 5x10⁷ buněk). Buňky se sekundární protilátkou byly opět promíchány a vloženy k inkubaci do lednice na 15 minut. Posléze došlo opět k promytí v pufru, následné centrifugaci (10 min/4 °C/160 g). Pelet byl opět rozsuspendován v pufru (500 µl na 5x10⁷ buněk). Takto připravené buňky byly užity při následné magnetické separaci.

4.9.4 Magnetická separace

K vlastní magnetické separaci byla užita separační kolonka (LS column) a podstavce s magnetickým separátorem (Midi MACS separátor). Kolonka byla vložena do

separátoru a propláchnuta 3x3 ml pufru. Do kolonky byla převedena připravená buněčná suspenze. Poté bylo nutné kolonku znovu promýt 3x3 ml pufru.

Hlavním účelem této metody je vyvázání všech buněk z kostní dřeně na kolonku, vyjma neutrofilů, které kolonkou projdou. Tato metoda je založena na negativní sorpci. Směs buněk vyizolovaných z kostní dřeně se nejprve inkubuje se směsí primárních biotinilizovaných monoklonárních protilátek proti antigenům, které nejsou exprimovány na neutrofilech, a následně dochází ke značení sekundární protilátkou. Feromagnetické částice, obsažené v sekundární protilátce zajistí, že v separační kolonce dojde k zadržení všech magneticky označených buněk z kostní dřeně mimo neutrofilů. Z kolonky se tedy vyloučila pouze suspenze obsahující neutrofilů. Ty byly následně spočítány v Bürkerově komůrce a převedeny do média dle potřeby.

4.9.5 Priming neutrofilů

Neutrofilů byly rozděleny na 3 typy primingu. První skupina byla primovaná pomocí cytokinů GM-CSF (výsledná koncentrace 12 ng/ml), TNF- α (výsledná koncentrace 2,5 ng/ml) a laminarinu o výsledné koncentraci 2 μ M, druhá skupina pomocí LTA (výsledná koncentrace 5 mg/ml) a laminarinu o 2 μ M výsledné koncentraci a třetí skupina pouze 2 μ M laminarinem. Neutrofilů byly vloženy do temostatu (37 °C/5% CO₂) po dobu 20 minut.

4.10 PŘÍPRAVA LÁTEK PRO TERAPII

4.10.1 Syntéza manan-BAM₄₀₀₀

Roztok mananu byl nejdříve redukován v prostředí octanu amonného kyanoborohydridem sodným při pH 7,4 a 50 °C po dobu pěti dnů. Poté byl roztok dialyzován za použití dialyzační trubice MWCO 3500 (Serva - Heidelberg, Německo) proti PBS při 4°C.

K mananu-NH₂ (pH 7,3) byl přidán 7,3 mM BAM₄₀₀₀ v DMSO. Takto připravená směs byla promíchána a ponechána 2 hodiny při pokojové teplotě. Reakce byla zastavena přidáním 1 M TRIS/HCl (pH 8). Následovala dialýza v dialyzační trubici MWCO 3500 (Serva - Heidelberg, Německo) proti PBS při 4 °C přes noc za stálého míchání. Po provedení dialýzy byl získán 0,2 mM roztok manan-BAM₄₀₀₀ v PBS.

4.10.2 Syntéza manan-SMCC

Nejprve byl připraven manan-NH₂ způsobem popsaným výše u syntézy manan-BAM. K 0,22 mM manan-NH₂ (pH 7,4) bylo přidáno SMCC rozpuštěné ve DMSO. Takto

připravená směs byla inkubována 40 minut při pokojové teplotě. Přes noc byla provedena dialýza v dialyzační trubici o MWCO 3500 proti PBS při 4 °C. Po úpravě koncentrace byl získán 0,2 mM roztok manan-SMCC v PBS.

4.10.3 Příprava Resiquimodu (Resiquimod.HCl)

Hydrochlorid byl získán tak, že k R-848 bylo přidáno ekvimolární množství HCl. Koncentrace R-848 byla upravena na 0,5 mg v 1 ml PBS. Roztoky použité v následujících pokusech byly připraveny rozpuštěním R-848.HCl v PBS, 0,2 mM roztoku mananu-BAM v PBS a 0,2 mM roztoku manan-SMCC v PBS.

4.10.4 Příprava *Listeria*-SMCC

1×10^{10} bakterií *Listeria monocytogenes* bylo rozsuspendováno v 1 ml PBS. Z toho bylo odebráno 500 μ l bakterií a rozsuspendováno v 5 ml 0,2 mM manan-SMCC připraveného výše uvedeným způsobem. Dále bylo přidáno 1,25 mg SMCC (62,5 μ l roztoku 2 mg SMCC bylo rozpuštěno ve 100 μ l DMSO). Takto připravená směs byla ponechána 40 minut při pokojové teplotě a následovala dialýza v dialyzační trubici MWCO 3500 proti PBS při 4 °C přes noc za stálého míchání.

4.11 Analýza dat

Statistika dat byla zpracována a vyhodnocena v programu STATISTICA 12. Statistická významnost byla určena pomocí ANOVY, doplněná post-hoc Tukey testem a Unequal testem. Grafy sledující přežívání myši byly vyhodnoceny pomocí testu Log-rank. Ve všech grafech byla užita střední chyba průměru (SEM).

5. EXPERIMENTY

5.1 Pokus č. 1: Vliv nádorové terapie pomocí směsí R-848.HCl, mannan-SMCC a LTA na paralelní nádor

Pro tento experiment bylo užito 18 myší. Každé myši byly transplantovány melanomové buňky do pravého i levého boku. Dvanáctý den po injikaci byly myši rozděleny do 3 skupin (A, B, C) po 6 myších. Každá myš byla chována ve sterilním boxu.

Každá skupina byla léčena jinou terapeutickou látkou podle schématu uvedeného níže.

Schéma pokusu a rozdělení myší podle příslušného terapeutika:

- A) i. t aplikace 50 μ l 50 mM roztoku TCEP v PBS, po hodině i.t. aplikace 50 μ l roztoku 0,5 mg R-848.HCl/ml 0,2mM manan-SMCC v PBS
- B) i. t aplikace 50 μ l 50 mM roztoku TCEP v PBS, po hodině i.t. aplikace 50 μ l roztoku 0,5 mg R-848.HCl + 3 mg LTA/ ml 0,2 mM manan-SMCC v PBS
- C) i. t aplikace 50 μ l roztoku 50 mM TCEP, po hodině i.t. aplikace 50 μ l PBS (kontrola)

Terapie byla zahájena v den terapie 0, tzn. dvanáctý den po transplantaci melanomových buněk. Terapeutická látka byla podána celkem dvanáctkrát intratumorálně pouze do pravého nádoru ve čtyřech pulzech (0,1,2,...8,9,10,..., 16, 17, 18,..., 24, 25, 26). Každý druhý den byla změřena velikost obou nádorů a rozměry byly zaznamenány. Po ukončení léčby byly myši dále sledovány a bylo zaznamenáno jejich přežití.

5.2 Pokus č. 2: In vitro studium cytotoxického působení neutrofilů primovaných pomocí LTA na nádorové buňky s vázaným mannan-BAM

V předchozím metodickém postupu bylo popsáno sklizení nádorových buněk a jejich inkubace s ligandem. Rovněž byla zmíněna izolace neutrofilů z kostní dřeně a následná magnetická separace. Buňky B16-F10 byly upraveny na výslednou koncentraci 1×10^6 na 1ml a u neutrofilů byla získána koncentrace $2,5 \times 10^6$ buněk na 1ml.

Do 18 jamek na 96 -U jamkovou desku bylo napipetováno 100 μ l suspenze melanomových buněk B16-F10 v RPMI 1640 s 10% nedeaktivovaného FCS. Do určených jamek byl napipetován mannan-BAM ve stejném mediu (viz Tab. 2) tak, že bylo dosaženo 0,024 mM výsledné koncentrace. K ostatním jamkám bez ligandu bylo napipetováno 100 μ l RPMI 1640 s 10% nedeaktivovaného FCS. Poté následovala 30 minutová inkubace buněk

v CO₂ termostatu při 37°C s ligandem postupem popsaným výše, souběžně byl proveden priming neutrofilů (viz. 4.9.5). Po centrifugačním promytí buněk bylo do příslušných jamek napipetováno 200 µl primovaných neutrofilů podle následující tabulky (Tab. II). A do zbývajících bylo přidáno 200 µl RPMI 1640 s 10% nedeaktivovaného FCS. Následovala dvouhodinová inkubace, po které byly buňky převedeny do 1ml ependorfy. Byla přidána trypanová modř v poměru 1:1 a buňky byly spočítány v Bürkerově komůrce.

Tab. II: Schéma jamek porovnávaných v *in vitro* pokusu.

Skupina	B16-F10 (abs. počet)	Ligand	Neutrofilý (abs.počet)	Aktivace
A	100 000	Mannan-BAM	-	-
B	100 000	Mannan-BAM	500 000	GM-CSF +TNF- α
C	100 000	-	500 000	GM-CSF +TNF- α
D	100 000	Mannan-BAM	500 000	LTA+laminarin
E	100 000	-	500 000	LTA+laminarin
F	100 000	Mannan-BAM	500 000	laminarin

5.3 Pokus č. 3: Zjištění možnosti přímého použití TCEP v terapeutikách obsahujících mannan-SMCC a TLR agonisty

Pro tento experiment bylo užito 24 myši. Každé myši byly transplantovány melanomové buňky do pravého boku. Dvanáctý den po injikaci byly myši rozděleny do 4 skupin (A, B, C, D) po 6 myších. Každá myš byla chována ve sterilním boxu.

Každá skupina byla léčena jinou terapeutickou látkou podle schématu uvedeného níže.

Schéma pokusu a rozdělení podle příslušného terapeutika:

- A) i. t aplikace 50 μ l 50 mM roztoku TCEP v PBS, po hodině i.t. aplikace 50 μ l roztoku 0,5 mg R-848 + 0,5 mg POLY I:C + 1ml Listeria-SMCC/ ml 0,2 mM mannan-SMCC v PBS
- B) i. t aplikace 50 μ l roztoku 0,5 mg R-848 + 0,5 mg POLY I:C + 0,5 mg LTA/ml 0,2 mannan-SMCC in 50 mM TCEP v PBS
- C) i. t aplikace 50 μ l roztoku 0,5 mg R-848 + 0,5 mg POLY I:C/ml 0,2 mM mannan-SMCC in 50mM TCEP v PBS
- D) i. t aplikace 50 μ l roztoku PBS (kontrola)

Terapie byla zahájena v den terapie 0, tzn. dvanáctý den po transplantaci melanomových buněk. Terapeutická látka byla podána celkem dvanáctkrát intratumorálně pouze do pravého nádoru ve čtyřech pulzech (0, 1, 2,..., 8, 9,10,..., 16, 17, 18,..., 24, 25, 26). Skupině A bylo nejprve intratumorálně aplikováno TCEP (50mM roztok TCEP v PBS) v množství 50 μ l. Po uplynutí 1 hodiny bylo podáno intratumorálně 50 μ l směsi obsahující R-848 + POLY I:C + Listeria-SMCC + mannan-SMCC. Ostatním skupinám bylo aplikováno 50 μ l terapeutika odpovídající rozpisu uvedeného výše. Každý druhý den byla změřena velikost nádoru a rozměry byly zaznamenány. Po ukončení léčby byly myši dále sledovány a bylo zaznamenáno jejich přežití.

Po 120 dnech byla u myši, které přežily, provedena retransplantace. Následně bylo sledováno, zda se nádor uchytil.

5.4 Pokus č. 4: Terapie melanomu pomocí R-848, manan-BAM a dalších TLR agonistů

Pro tento experiment bylo užito 24 myší. Každé myši byly transplantovány melanomové buňky do pravého boku. Dvanáctý den po injekci byly myši rozděleny do 4 skupin (A, B, C, D) po 6 myších. Každá myš byla chována ve sterilním boxu.

Každá skupina byla léčena jinou terapeutickou látkou podle schématu uvedeného níže.

Schéma pokusu a rozdělení podle příslušného terapeutika:

- A) i. t aplikace 50 μ l roztoku 0,5 mg R-848 + 0,5 mg POLY I:C + 0,5 mg Pam₃CSK₄/ml 0,2 mM manan-BAM v PBS
- B) i. t aplikace 50 μ l roztoku 0,5 mg R-848 + 0,5 mg POLY I:C + 1 mld *Listeria*/ml 0,2 mM manan-BAM v PBS
- C) i. t aplikace 50 μ l roztoku 0,5 mg R-848 + 0,5 mg POLY I:C/ml 0,2 mM manan-BAM v PBS
- D) i. t aplikace 50 μ l roztoku PBS (kontrola)

Terapie byla zahájena v den terapie 0, tzn. dvanáctý den po transplantaci melanomových buněk. Terapeutická látka byla podána celkem dvanáctkrát intratumorálně do pravého nádoru ve čtyřech pulzech (0, 1, 2, ..., 8, 9, 10, ..., 16, 17, 18, ..., 24, 25, 26). Všem skupinám bylo aplikováno 50 μ l terapeutika odpovídající rozpisu uvedenému výše. Každý druhý den byla změřena velikost nádoru a rozměry byly zaznamenány. Po ukončení léčby byly myši dále sledovány a bylo zaznamenáno jejich přežití.

Po 120 dnech byla u myší, které přežily, provedena retransplantace. Následně se sledovalo, zda se nádor znovu uchytil.

5.5 Pokus č. 5: Terapie melanomu pomocí směsi R-848, POLY I:C, mannan-BAM a LTA, sledování výskytu metastáz

Pro tento experiment bylo užito 24 myši. Každé myši byly transplantovány melanomové buňky do pravého boku a rovněž jim byly melanomové buňky aplikovány intravenosně. Dvanáctý den po injekci byly myši rozděleny do 2 skupin (A, B) po 12 myších a byla zahájena jejich léčba (den terapie 0). Skupina A byla léčena směsí R-848, POLY I:C, mannan-BAM a LTA. Druhá skupina byla kontrolní. Skupině B bylo podáváno PBS. Každá myš byla chována ve sterilním boxu samostatně. Terapie byla zahájena v den terapie 0, tzn. 12. den po transplantaci melanomových buněk. Terapeutická látka byla podána celkem dvanáctkrát intratumorálně do pravého nádoru ve čtyřech pulzech (0, 1, 2, ..., 8, 9, 10, ..., 16, 17, 18, ..., 24, 25, 26). Oběma skupinám bylo aplikováno 50 μ l terapeutika odpovídající rozpisu uvedeného níže. Každý druhý den byla změřena velikost nádoru a rozměry byly zaznamenány. Po ukončení léčby (26. den) bylo sledováno přežití myši a po úhynu byl bezprostředně vyhodnocen výskyt plicních metastáz.

Schéma skupin:

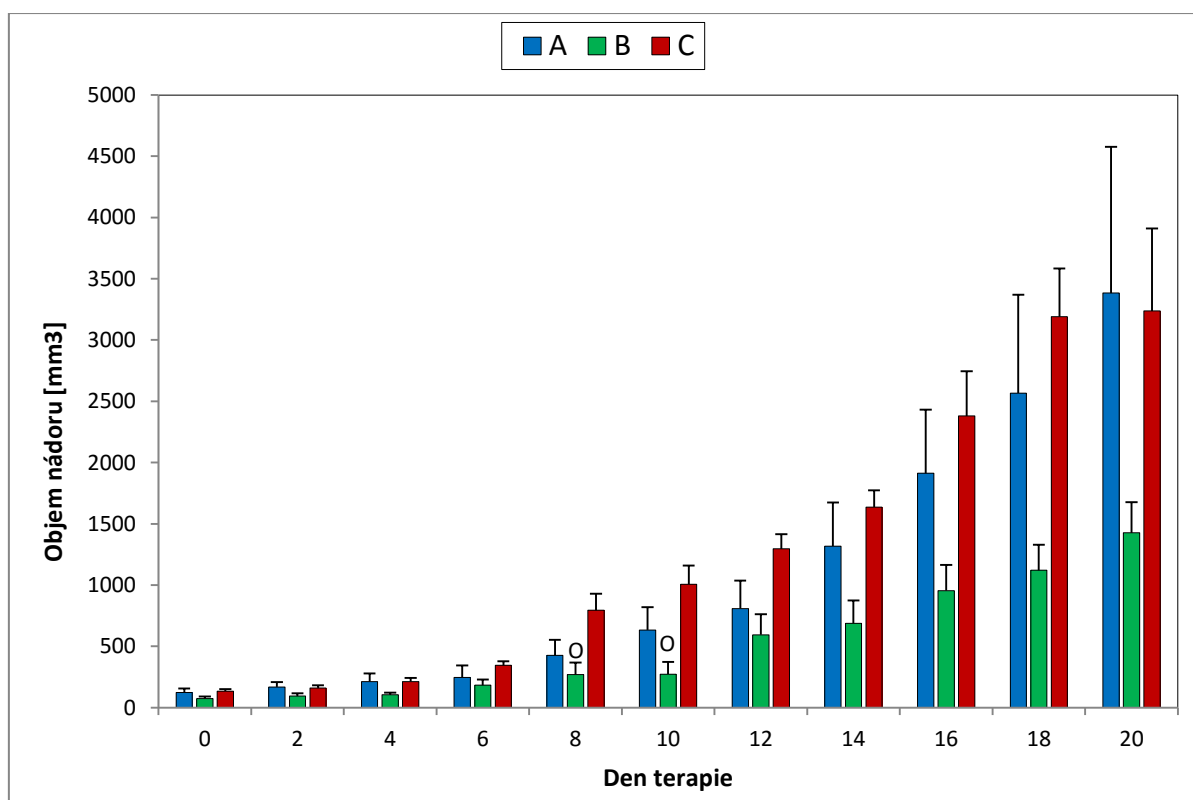
- A) i.t. aplikace 50 μ l roztoku 0,5 mg R-848 + 0,5 mg POLY I:C + 0,5 mg LTA/ml 0,2 mM mannan-BAM v PBS
- B) i.t. aplikace 50 μ l roztoku PBS

6. VÝSLEDKY

6.1 Pokus č. 1: Vliv nádorové terapie pomocí směsí R-848.HCl, manan-SMCC a LTA na paralelní nádor

Hlavním cílem tohoto pokusu bylo zjistit, zda nádorová imunoterapie pomocí směsí R-848.HCl, manan-SMCC a LTA má vliv na růst paralelního neléčeného nádoru.

Z grafu (Obr. 2) je patrné, že při léčbě pomocí směsí R-848.HCl, manan-SMCC a LTA (skupina B, zelený sloupec) je výrazná redukce nádorového růstu oproti kontrole. Stejná směs neobsahující LTA (TLR 2) má prakticky bezvýznamný vliv na růst nádoru.



Obr. 2 : Vliv nádorové terapie na redukcí růstu paralelního neléčeného nádoru.

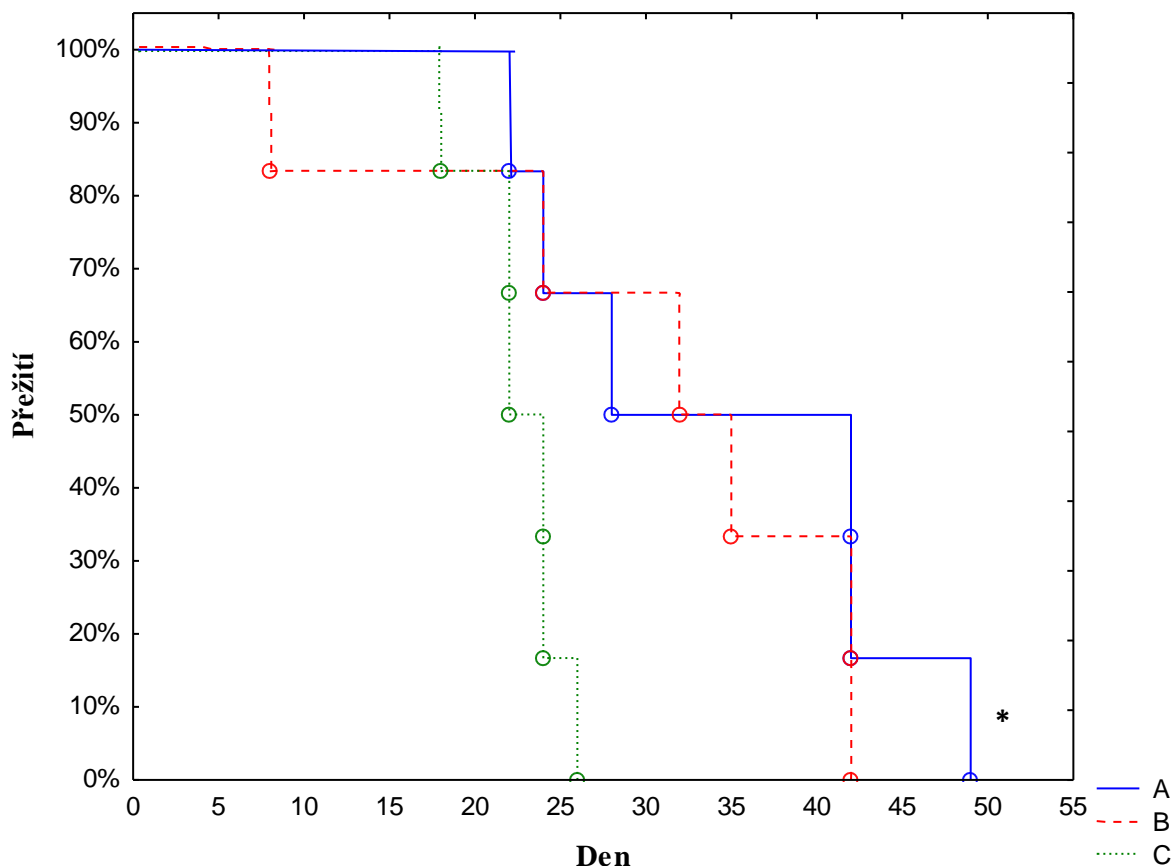
A – R-848.HCl + mannan-SMCC, **B** – R-848.HCl + mannan-SMCC + LTA , **C** – PBS (kontrola)

Hladiny statisticky významného rozdílu:

○ $P < 0,05$ vztaženo ke kontrolní skupině C

Tento graf byl ukončen 20. den terapie. Po dvacátém dni terapie došlo k rapidnímu úhynu testovaných myší, což by zkreslovalo analýzu dat.

Z následujícího obrázku (Obr. 3) je viditelný vliv paralelního nádoru na přežití myši. U skupiny A bylo prokázáno statisticky významné přežití. Skupina A přežila v průměru 34,5 dne, skupina B 23,5 dne a kontrolní skupina C 22,7 dne. Z těchto výsledků je viditelné, že zatížení myšního organismu bylo vysoké.



Obr. 3: Vliv paralelního nádoru na přežití myši.

A – R-848.HCl + mannan-SMCC, **B** – R-848.HCl + mannan-SMCC + LTA, **C** – PBS (kontrola)

Hladiny statistiky významného rozdílu:

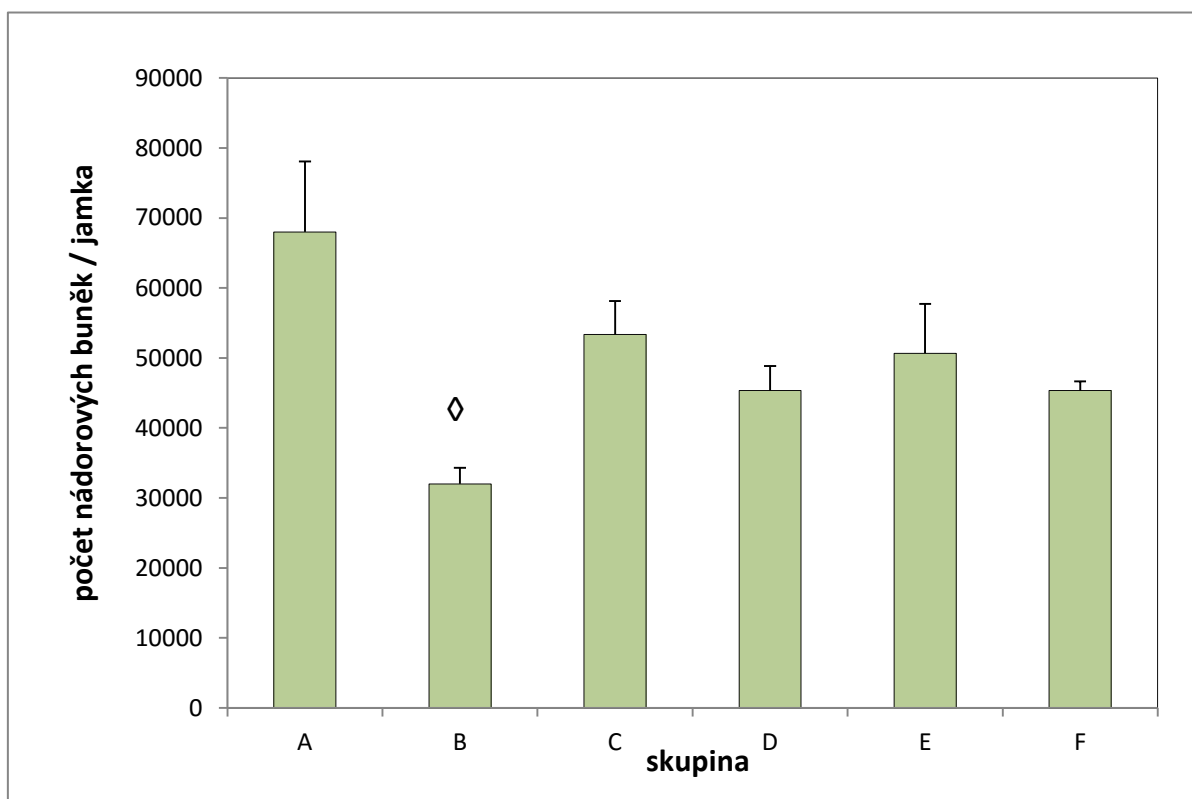
* $P \leq 0,05$ vztaženo ke kontrolní skupině C

6.2 Pokus č. 2: In vitro studium cytotoxického působení neutrofilů primovaných pomocí LTA na nádorové buňky s vázaným manan-BAM

Cílem druhého pokusu provedeného in vitro bylo zjistit, zda použití LTA (TLR2) v in vivo experimentech má přímý vliv na cytotoxické působení neutrofilů.

V pokusu, který je popsán na následujícím grafu (Obr. 4), je viditelné, že nejvyšší cytotoxický efekt vykazovala skupina, kde nádorové buňky byly značené mannan-BAM a neutrofilily primované pomocí GM-CSF, TNF- α a kostimulované laminarinem (skupina B). U této skupiny byl prokázán statisticky významný rozdíl vůči kontrole. U skupin, kde bylo

přítomno LTA, ať už s nádorovými buňkami značenými mannan-BAM nebo ne, došlo ke slabému cytotoxickému efektu, který nebyl statisticky významný.



Obr. 4: Vliv primovaných neutrofilů na cytotoxické působení.

A – nádorové buňky značené mannan-BAM

B – nádorové buňky značené mannan-BAM + neutrofilů primované směsí GM-CSF + TNF- α + laminarin

C – nádorové buňky + neutrofilů primované směsí GM-CSF + TNF- α + laminarin

D – nádorové buňky značené mannan – BAM + neutrofilů primované směsí LTA + laminarin

E – nádorové buňky + neutrofilů primované směsí LTA + laminarin

F – nádorové buňky + neutrofilů primované laminarinem

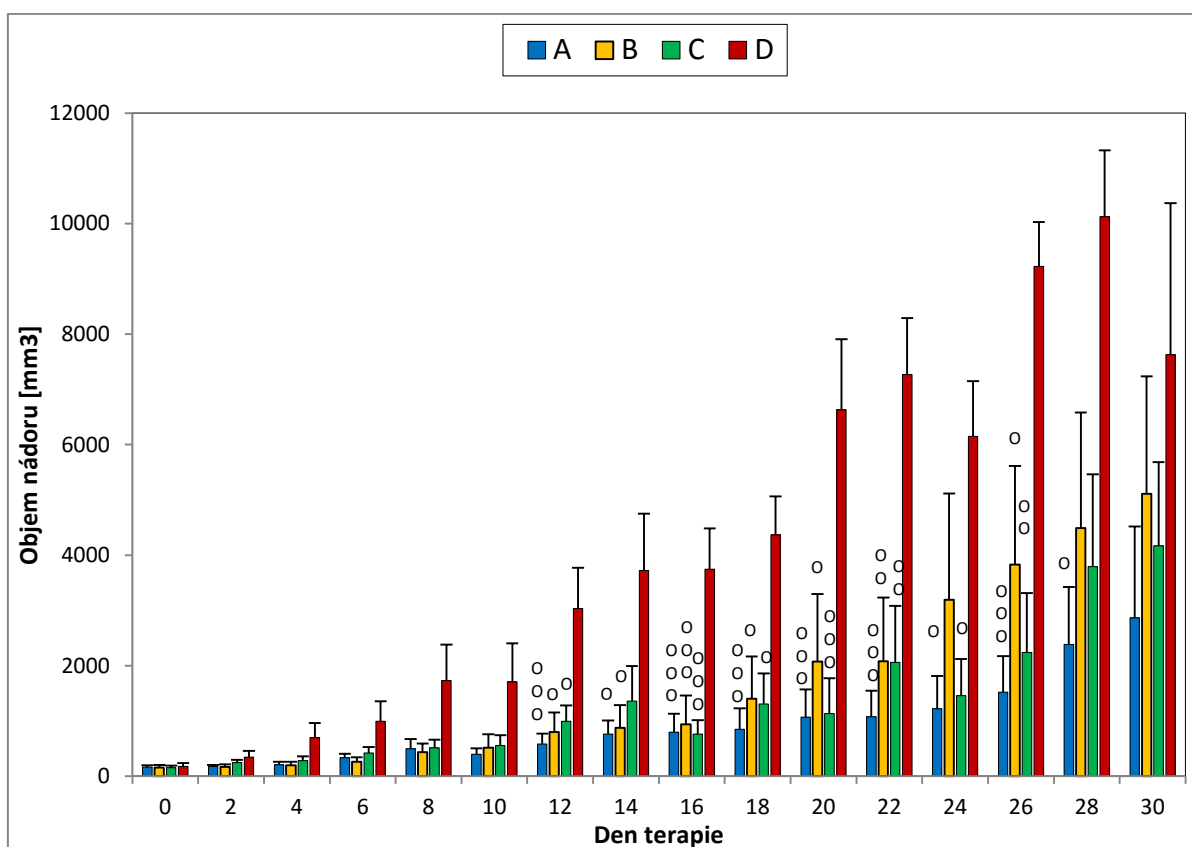
Hladiny statisticky významného rozdílu:

◇ P < 0,05 vztaheno ke skupině A

6.3 Pokus č. 3: Zjištění možnosti přímého použití TCEP v terapeutikách obsahujících mannan-SMCC a TLR agonisty

Hlavním smyslem tohoto pokusu bylo zjistit, zda je terapie ovlivněna aplikací roztoku TCEP hodinu před aplikací příslušné směsi terapeutika.

Z grafu (Obr. 5) je patrné, že při terapii dosahuje nejvyšší redukce nádorového růstu kombinace použití roztoku TCEP hodinu před aplikací samotného terapeutika R-848 + POLY I:C + Listeria-SMCC + mannan-SMCC (skupina A). Hodnota této redukce je 76,86 %. Aplikace roztoku TCEP přímo ve směsi s terapeutikem je srovnatelná u obou testovaných skupin. Ve skupině, kde byla testována terapie R-848 + POLY I:C + LTA + mannan-SMCC+TCEP (skupina B), činí průměrná redukce nádorového růstu 65,62 %. V další skupině, kde byla používána terapie R-848 + POLY I:C + mannan-SMCC + TCEP, dosahuje nádorový růst redukce o 67,93 %.



Obr. 5: Vliv přímého přidání TCEP do směsi terapeutika.

A - TCEP/ R-848 + POLY I:C + Listeria-SMCC + manan-SMCC, **B** - R-848 + POLY I:C + LTA + mannan-SMCC+TCEP, **C** - R-848 + POLY I:C + mannan-SMCC + TCEP, **D** - PBS (kontrola)

Hladiny statisticky významného rozdílu:

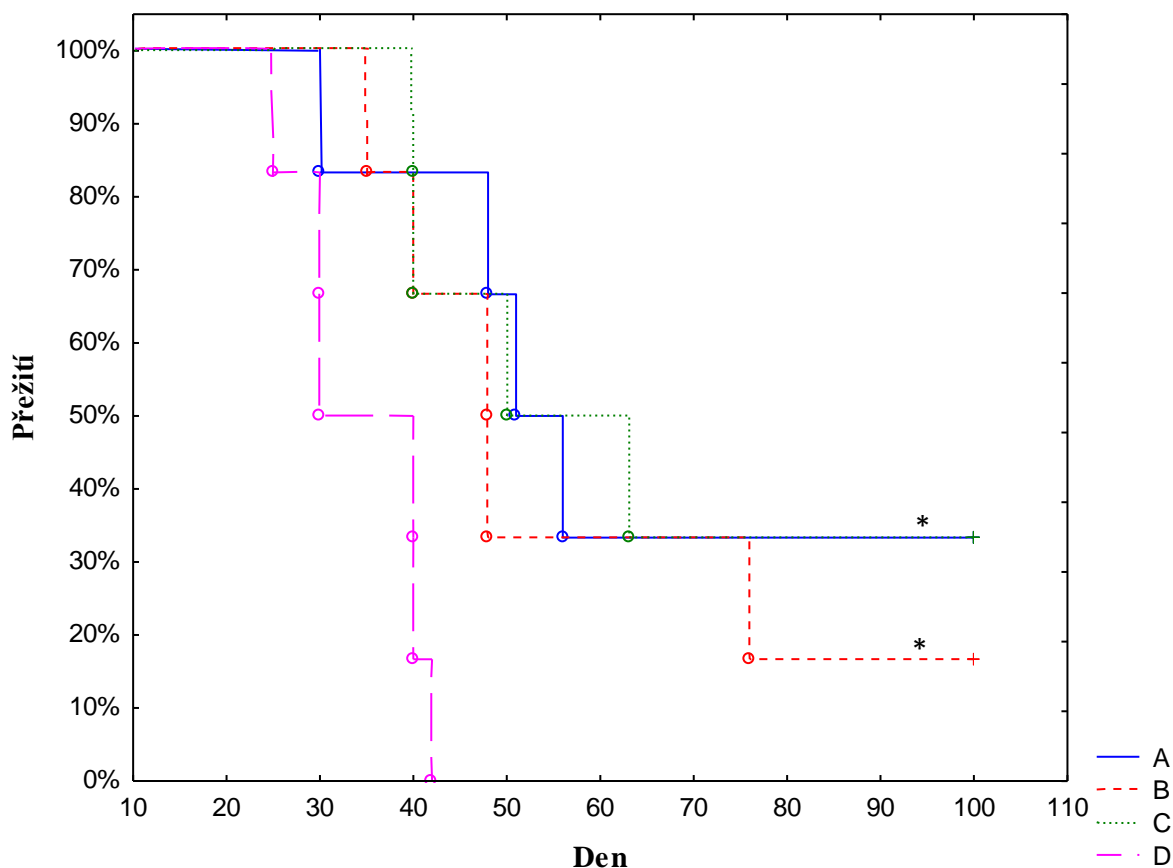
O $P \leq 0,05$ vztaženo ke kontrolní skupině D

OO $P \leq 0,01$ vztaženo ke kontrolní skupině D

OOO $P \leq 0,005$ vztaženo ke kontrolní skupině D

V následujícím grafu je zobrazeno přežití myši po skončení terapie. Ve skupině léčené TCEP/ R-848 + POLY I:C + Listeria-SMCC + mannan-SMCC dvě myši přežily

hranici 100 dnů, stejně tak ve skupině léčené pomocí R-848 + POLY I:C + mannan-SMCC + TCEP. V poslední léčené skupině pomocí R-848 + POLY I:C + LTA + mannan-SMCC + TCEP dosáhla hranice 100 dnů 1 myš. Průměr přežití u všech léčených skupin je srovnatelný. Ve skupině A dosahuje 64,2 dne, ve skupině B 57,6 dne a ve skupině C 65,5. Ve skupině kontrolní je vykazována hodnota 34,5 dne.



Obr. 6: Přežití myši po terapii s přímým přidáním TCEP do směsi terapeutika.

A - TCEP/ R-848 + POLY I:C + Listeria-SMCC + mannan-SMCC, **B** - R-848 + POLY I:C + LTA + mannan-SMCC+TCEP, **C** - R-848 + POLY I:C + mannan-SMCC + TCEP, **D** - PBS (kontrola)

Hladiny statisticky významného rozdílu:

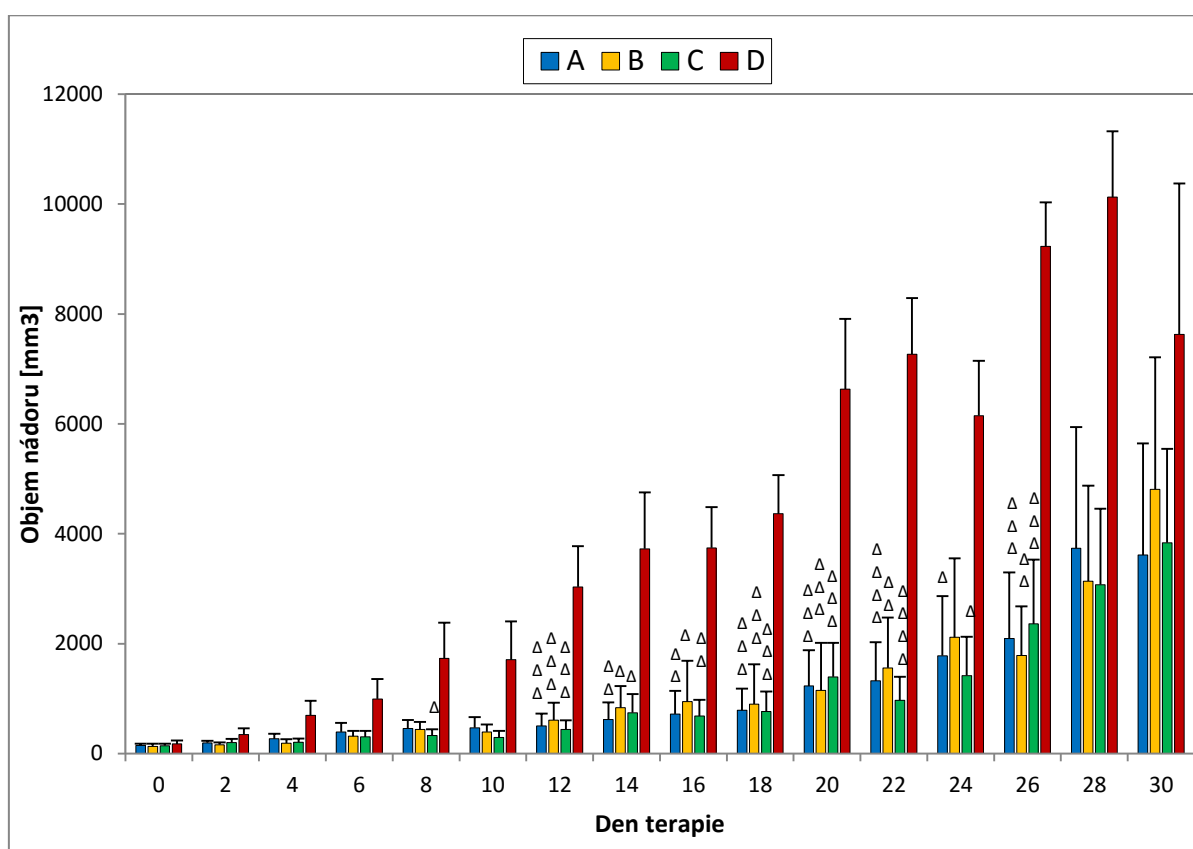
* $P \leq 0,05$ vztaheno ke kontrolní skupině D (platí pro skupiny A,B i C)

Po 120 dnech přežití byla provedena retransplantace. U všech myši, které retransplantaci absolvovaly, se ani po 40 dnech nádor neobjevil a rovněž na plicích nebyly nalezeny žádné metastázy.

6.4 Pokus č. 4: Terapie melanomu pomocí R-848, mannan-BAM a dalších TLR agonistů

Účelem čtvrtého pokusu bylo otestovat další kombinace terapie pomocí R-848, mannan – BAM a POLY I:C. K základní směsi byli přidáni další TLR agonisté – Pam3CSK4 a *Listeria monocytogenes*.

Výsledky pokusu jsou znázorněny na následujícím grafu (Obr. 7). Ve skupině A bylo užito Pam₃CSK₄ (TLR 1/2) a došlo k průměrné redukci nádorového růstu o 73,99 %. Ve skupině B, kde byla užita *Listeria* (TLR 2), byla průměrná redukce 72,67 %. Nejvyšší redukce nádorového růstu dosáhla skupina C, která nebyla ovlivněna dalším TLR agonistou. Hodnota průměrné redukce nádorového růstu činí 76,41 %.

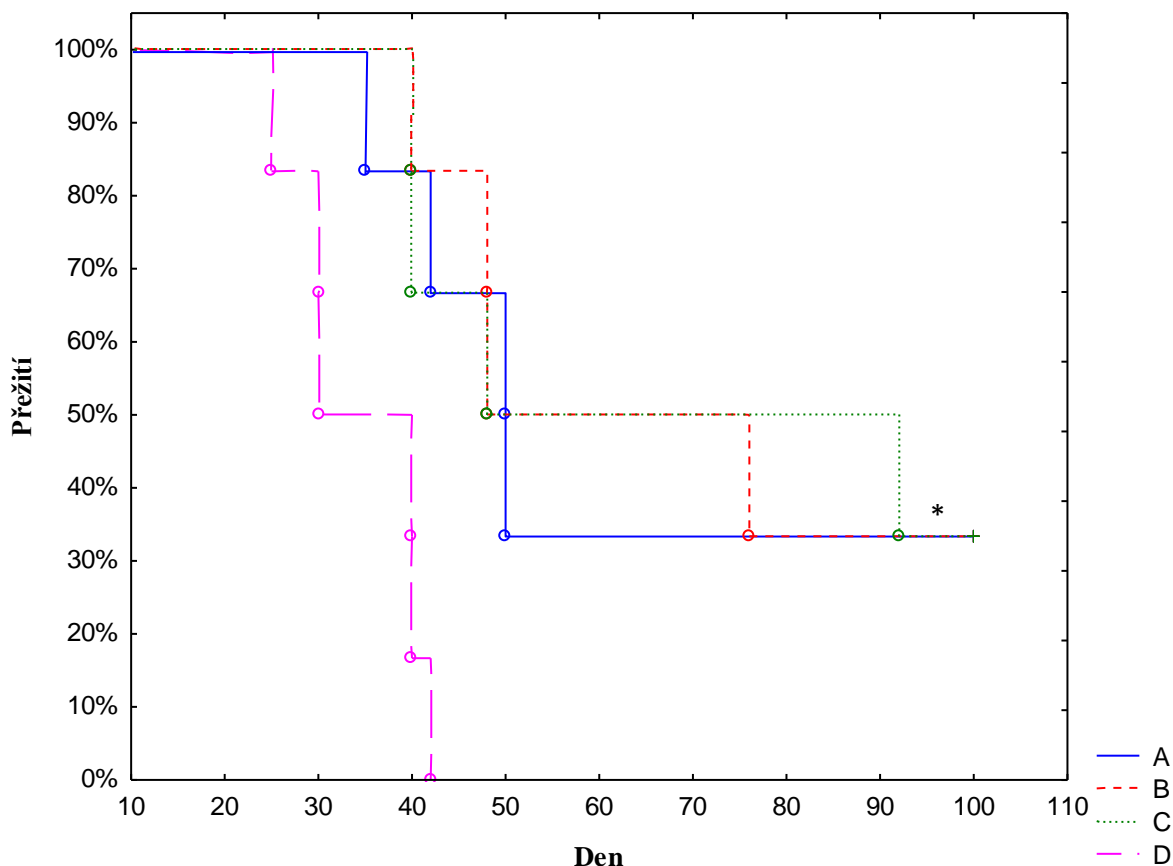


Obr. 7: Vliv na terapii nádoru pomocí R-848, mannan-BAM, POLY I:C a dalších TLR agonistů. A - R-848 + POLY I:C + Pam3CSK4+ mannan-BAM, B - R-848 + POLY I:C + *Listeria* + mannan-BAM, C - R-848 + POLY I:C + mannan-BAM, D - PBS (kontrola)

Hladiny statisticky významného rozdílu:

- Δ $P \leq 0,05$ vztaženo ke kontrolní skupině D
- ΔΔ $P \leq 0,01$ vztaženo ke kontrolní skupině D
- ΔΔΔ $P \leq 0,005$ vztaženo ke kontrolní skupině D
- ΔΔΔΔ $P \leq 0,001$ vztaženo ke kontrolní skupině D

V nadcházejícím obrázku (Obr. 8) je znázorněno přežití myši z tohoto pokusu. Ve všech třech skupinách přežily 2 myši. Průměr přežití myši je u všech myši srovnatelné. Ve skupině A činí hladina přežití 62,84 dne, ve skupině B 68,67 dne a ve skupině C 70 dní. Přežití myši v kontrolní skupině mělo hodnotu 34,5 dne.



Obr. 8: Přežití myši u terapie pomocí R-848, manan-BAM a dalších TLR agonistů

A - R-848 + POLY I:C + Pam3CSK4+ manan-BAM, **B** - R-848 + POLY I:C + Listeria + mannan-BAM, **C** - R-848 + POLY I:C + manan-BAM, **D** - PBS (kontrola)

Hladiny statisticky významného rozdílu:

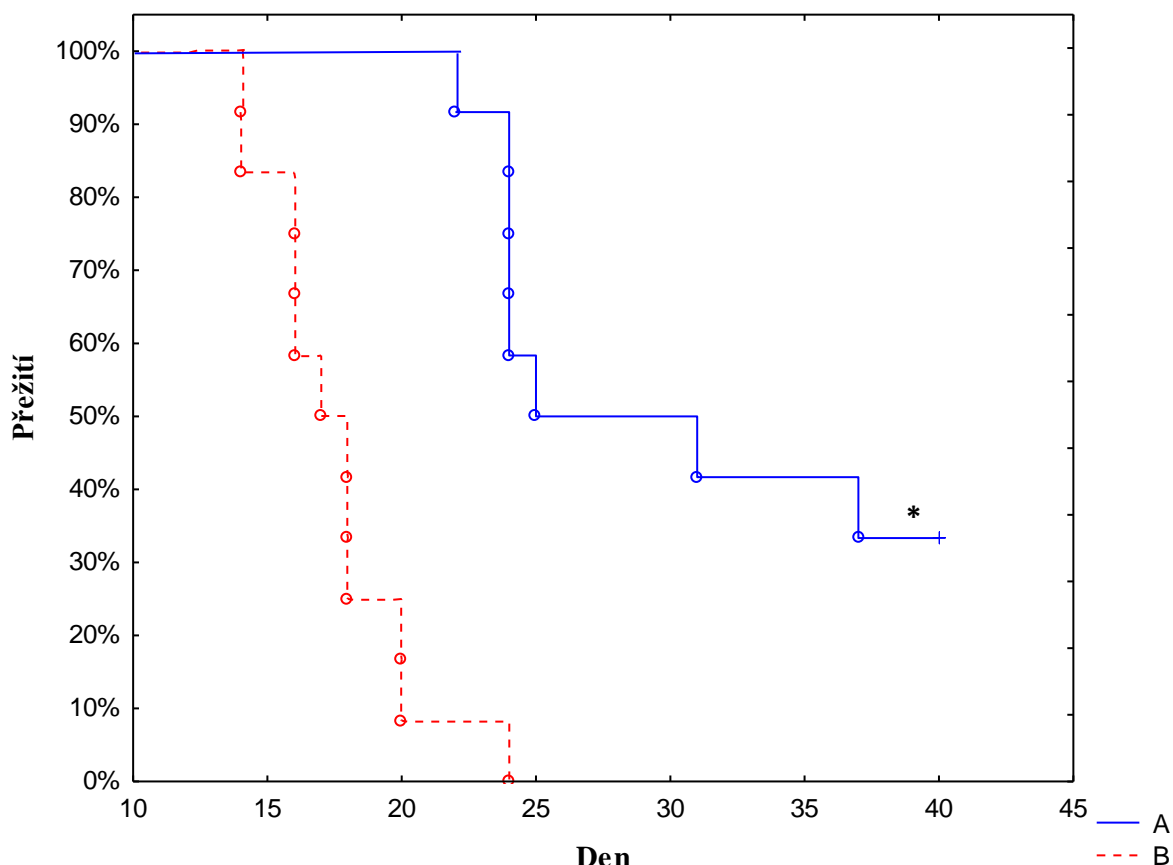
* $P \leq 0,05$ vztaženo ke kontrolní skupině D (platí pro skupinu A, B i C)

Po 120 dnech přežití byla provedena retransplantace. U všech myši, které retransplantaci absolvovaly, se ani po 40 dnech nádor neobjevil a při následné pitvě nebyly zjištěny žádné metastázy.

6.5 Pokus č. 5: Terapie melanomu pomocí směsi R-848, POLY I:C, manan-BAM a LTA, sledování výskytu metastáz

Cílem tohoto pokusu bylo sledování výskytu metastáz u myši, které byly zatíženy vysokou dávkou melanomových buněk způsobujících metastazování na plicích.

V průběhu pokusu bylo sledováno přežití myši, které je zobrazeno na následujícím grafu (Obr. 9). Z grafu je patrné, že u léčené skupiny (skupina A) je výrazně delší přežití než u skupiny kontrolní. Toto prodloužení přežití je statisticky velmi výrazné.



Obr. 9: Vliv na přežití myši po terapii R-848, POLY I:C, manan-BAM a LTA.

A- R-848, POLY I:C, manan-BAM a LTA, **B-** PBS (kontrola)

Hladiny statisticky významného rozdílu:

* $P \leq 0,0005$ vůči kontrolní skupině B

Po úhynu myši byly vyjmuty plíce a byl sledován výskyt metastáz, který je zaznamenán v následující tabulce (Tab. III).

Tab. III: Záznam výskytu metastáz u jednotlivých myší po úhynu v rámci pokusu. Rozdělení metastáz podle velikosti.

Myš	Den úhynu	Počet metastáz dle velikosti				Celkový počet metastáz
		0-1 mm	1-2 mm	2-3 mm	3 - více mm	
A 1	přežití					
A 2	24	26	21	4	9	60
A 3	přežití					
A 4	37	34	27	14	11	86
A 5	24	54	28	14	6	102
A 6	25	21	27	19	8	75
A 7	přežití					
A 8	31	29	14	13	3	59
A 9	přežití					
A 10	24	61	16	6	4	87
A 11	22	70	31	6	2	109
A 12	24	34	35	11	16	96
B 1	20	11	13	3	1	28
B 2	18	35	9	2	2	48
B 3	18	33	28	8	6	75
B 4	14	60	75	10	3	148
B 5	17	63	12	5	4	84
B 6	18	38	16	8	6	68
B 7	20	17	18	4	7	46
B 8	16	25	21	17	2	65
B 9	24	18	26	2	-	46
B 10	14	80	25	2	-	107
B 11	16	107	12	7	-	126
B 12	16	51	35	15	4	105

Z výsledků je patrné, že intenzita metastazování je u léčené a kontrolní skupiny stejná.

Výsledky tohoto pokusu jsou zaznamenány k 40. dni od zahájení pokusu.

7. DISKUZE

V imunoterapii se díky její šetrnosti velmi často spatřuje budoucnost léčby nádorových onemocnění. V nádorové imunoterapii byla provedena řada experimentů, jejichž cílem bylo vyvinout účinnou „zbraň“ v boji proti nádorům.

Tato práce je dalším dílem v odpovědi na otázku nádorové imunoterapie, jíž se zabývá skupina pod vedením Jana Ženky. Cílem studie je objasnit některé dosud nepopsané otázky a nalézt další zdokonalení užívané osvědčené terapie, která se zakládá na kombinaci TLR signalizaci a aktivaci fagocytózy nádorových buněk. Myšlenka TLR signalizace pomocí rozpustných ligandů spojených s aktivací ligandů receptorů stimulujících fagocytózu vychází z předchozí práce Underhilla a Gantnera (2004). V práci Janotové a kol. (2014) byl tento systém potvrzen jako účinný, z čehož vychází další experimenty provedené naším týmem.

V **prvním experimentu** jsme se snažili zjistit vliv účinku terapie na druhý paralelní neléčený nádor. Dosavadní poznatky, objevující se v práci Kumžákové (2015), ukazují, že do procesu imunoterapie založené na kombinaci TLR agonistů s ligandy aktivujícími fagocytózu může být zapojena i imunita specifická působící systémově. Pro dokázání tohoto jevu jsme se rozhodli použít právě model založený na dvou paralelních nádorech, kdy pravý nádor byl lokálně léčen a druhý byl sledován. Díky sledování druhého neléčeného nádoru byla umožněna analýza efektu terapie. Z pokusu je průkazné, že růst neléčeného nádoru byl u myši léčených pomocí terapie R-848.HCl, LTA a manan-SMCC přibližně dvakrát pomalejší, což podporuje názor o zapojení imunity specifické.

Ve **druhém experimentu** jsme se zabývali otázkou mechanismu imunoterapie založené na kombinaci TLR signalizace a použití ligandů stimulujících fagocytózu. Z předchozích prací Janotové a kol. (2014), Kovářové (2015), Jačkové (2015), Vácové (2015) i z posledních měření (Ženka, ústní sdělení) vyplývá zásadní význam neutrofilní infiltrace.

Neutrofilny jsou klíčovými efektorovými buňkami vrozené imunity. Velmi rychle se dostávají do místa infekce a zánětu, aby poskytly včasnou obranu proti invazi mikroorganismů. Tato funkce je usnadněna expresí TLR na neutrofilech, umožňující rozpoznávání široké škály PAMPs a tím aktivaci odpovědi na invazi patogenů. TLR aktivace vede k důležitým buněčným procesům zahrnujícím vznik reaktivních forem kyslíku – ROS

(reactive oxygen species), produkci cytokinů či zvýšení přežití (Prince a kol., 2011). V práci Friendlera a kol. (2009) byla prokázána existence dvou typů tumor associated neutrophils (TAN), a to protinádorových (N1) a pronádorových (N2). Změna N1 na N2 je způsobena imunosupresivním TGF β . Po blokaci TGF β dochází k účinkům N1, což zahrnuje zvýšenou schopnost zabít nádorové buňky, zvýšit expresi cytokinů a aktivovat CTL (Friendler a kol., 2009).

V předchozím *in vitro* experimentu provedeným Kovářovou (2015) bylo potvrzeno cytotoxické působení primovaných neutrofilů pomocí GM-CSF, TNF- α a laminarinu na nádorové buňky s ukotveným mananem. Stejný výsledek byl potvrzen i v *in vitro* pokusu provedeném v této práci. Pro dosažení účinku je nutná přítomnost komplementu, který je aktivován lektinovou cestou. Dále je nutná kostimulace CR3 laminarinem a priming neutrofilů cytokiny, v tomto případě GM-CSF a TNF- α . Tato myšlenka vychází z prací Větvičky a kol. (1996), která se rovněž zaměřuje na systém, kdy se neutrofilové soustředí na rozpoznávání iC3b opsonizovaných částic. K vazbě těchto částic na CR3 receptor je nutné zajistit primování receptoru. Tento priming je zajištěn pomocí vazby polysacharidů na lektinovou doménu CR3. V práci Větvičky je užit rozpustný betaglukan o molekulové váze 19,6 kDa a tím bylo dosaženo primingu CR3 neutrofilů. Dále byla navozena cytotoxicita proti nádorovým buňkám, které byly opsonizovány iC3b. Podle poznatků Větvičky a kol. je důležité užit betaglukany o nízké molekulové váze, jelikož na rozdíl od betaglukanů o vysoké molekulové váze jsou schopné kostimulovat CR3 pro vazbu na iC3b opsonizované částice (Větvička a kol., 1996). Proto byl v našich pracích užit nízkomolekulární laminarin.

Cílem druhého experimentu bylo rovněž zjistit, zda LTA, jež se v našich pracích ukazuje jako vhodný TLR agonista, je schopen sám primingu neutrofilů. Priming neutrofilů pomocí TLR agonistů by mohl zvýšit schopnost pronikat do tkání, prodloužit životaschopnost neutrofilů a tím i jejich funkční schopnost v místě zánětu (Condliffe a kol., 1998). V provedeném experimentu se ukázalo, že tomu tak není. V tomto systému LTA primované vykazovaly pouze slabý cytotoxický efekt, ať už byly nádorové buňky značené či neoznačené mananem-BAM.

Třetí pokus byl pouze screeningového charakteru. Hlavním úkolem bylo najít odpověď na otázku, zda by nebylo možné zjednodušení experimentů s kotvením manan-SMCC tak, že by redukční činidlo (TCEP), potřebné pro zajištění vazby manan-SMCC na membránové proteiny, bylo aplikováno zároveň s terapeutikem, nikoli hodinu dopředu, jak bylo užíváno dosud. V pokusu byla užitá naše doposud nejlepší terapie pomocí R-848,

POLY I:C, Listeria-SMCC a mannan-SMCC, kdy bylo TCEP aplikováno hodinu před aplikací terapeutika. Tato terapie v tomto pokusu ukázala nejvyšší hodnotu průměrné redukce nádorového růstu (78,68 %). Terapeutické látky, u nichž bylo redukční činidlo podáváno přímo ve směsi léčiva, ukázaly, že jejich účinek nebyl tak významný, jak jsme očekávali.

Zjednodušení terapie ukázaly paralelně prováděné pokusy kolegyně Masákové. Požadované snížení počtu lokální aplikace terapeutika lze snadno dosáhnout pomocí manan-BAM. Při použití kotvy manan-BAM lze snížit počet injikované aplikace na polovinu, díky jednokrokové terapii. Tato forma terapie navíc prokazuje velmi dobré výsledky (Masáková, in prep.). Kotvení pomocí manan-BAM je schopné přizpůsobovat antigenní vlastnosti buněk nádorových bez jakéhokoliv poškození, což je vnímáno jako velké plus (Kato a kol., 2004). Z tohoto důvodu byl manan-BAM užit i v následujících experimentech.

Dosavadní zkušenosti ukazují, že základní terapii založenou na R-848, kotveném mananu a případně POLY I:C lze zlepšit dalšími agonisty TLR receptorů. Proto byla ve **čtvrtém experimentu** užita *Listeria monocytogenes* (agonista TLR2) a Pam₃CSK₄ (agonista TLR 1/2). Ani jedna testovaná látka se bohužel neprojevila jako vhodný ligand a ani jedna terapie nedosáhla předpokládaných hodnot. Zajímavé jsou ale výsledky u *Listerie monocytogenes*.

Z dávných pokusů prováděných v 19. století se užití bakterií v nádorové terapii projevilo jako velmi vhodné. Proslavený Coleyho toxin, tvořený směsí kultur bakterií *Streptococcus pyogenes* a *Serratia marcescens*, ve volné formě dosahoval výborných výsledků v imunoterapii sarkomů (Coley, 1891). Tento pokus byl impulzem pro využití i dalších bakteriálních motivů v nádorové terapii. V tomto pokusu byla užita již zmíněná *Listeria monocytogenes*, která vyvolává silnou nespecifickou reakci, vyznačující se sekrecí prozánětlivých cytokinů, např. TNF, IL-12 a dalších chemokinů (Flo a kol., 2000)

Listeria v našem experimentu nefungovala tak, jak bylo očekáváno. V pokusech popisovaných Kumžákovou (2015), kde byla *Listeria* kotvená pomocí SMCC, bylo ale její užití velice efektivní.

Použitelnost TLR agonistů je ovšem různorodá. V paralelních pokusech provedených kolegyní Masákovou bylo zjištěno, že LTA (TLR2 agonista) je velmi účinný (Masáková, in prep.). Vysvětlení je možno spatřovat v různé stimulaci tvorby prozánětlivých cytokinů i ve vlivu na vyzrávání dendritických buněk. Přesné vysvětlení bude ale vyžadovat další rozsáhlé studium této problematiky.

Úspěšná terapie pomocí R-848, POLY I:C, LTA a manan-BAM užitá v práci Masákové byla použita v posledním **pátém pokusu** studovaném v této práci. Jeho smyslem bylo pozorovat vliv terapie na redukci výskytu a intenzity metastáz, jelikož se tento jev vyskytoval v předchozích experimentech provedených naším týmem. Metastázy jsou momentálně nejčastější příčinou úmrtí pacientů trpících rakovinou. Komplexní a redundantní cesty, zahrnující nádorovou buňku a mikroprostředí, zprostředkovávají nádorovou invazi, přežití a zachycení v krevním řečišti, s následným přenosem a vývojem na vzdáleném místě. Pochopení těchto cest a jejich dynamických interakcí by mohlo pomoci v zacílení metastáz (Steege, 2006).

Myši jsme silně zatížili jak primárním nádorem, tak velmi vysokou dávkou melanomových buněk způsobujících velmi četný výskyt metastáz na plicích. Toto rapidní zatížení organismu a vysoká intenzita metastáz způsobila velmi četné a rychlé úhyny v kontrolní skupině. Kontrolní myši uhynuly přibližně 3 krát rychleji než v experimentech pouze s primárním nádorem a přežití myši, které byly léčené, v tomto experimentu vykazuje rovněž velmi vysokou statistickou významnost, kdy $P \leq 0,0005$ vůči kontrole. Na počet metastáz na plicích uhynulých myši ovšem nebyl pozorován významný efekt. Studium tohoto jevu ovšem vyžaduje další podrobné prozkoumání této problematiky.

8. ZÁVĚREČNÉ SHRnutí

- Byl prokázán systémový efekt nádorové imunoterapie založené na R-848 a LTA v kombinaci s kotveným mananem.
- Byl ověřen cytotoxický vliv neutrofilů na nádorové buňky s kotveným mananem.
- Lipoteichová kyselina, která je jeví jako vhodný TLR agonista, není schopna sama o sobě primovat neutrofilly.
- Použití redukčního činidla TCEP přímo ve směsi s terapeutikem se ukázalo jako nevyhovující.
- Terapie založená na R-848, kotveném mananu-BAM, POLY I:C ukázala, že přidání dalších ligandů *Listeria monocytogenes* či Pam₃CSK₄ se projevilo jako nevhodné.
- V pokusu, kde byl myší organismus zatížen vysokou dávkou metastatických buněk v krvi, byl prokázán významný vliv imunoterapie na přežití léčených jedinců. Na intenzitu metastazování ovšem nebyl pozorován žádný vliv.

9. SEZNAM ZKRATEK

- ADCC - buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách (*antibody dependent cellular cytotoxicity*)
- APC - antigen prezentující buňka (*antigen presenting cell*)
- ADCP - buněčná fagocytóza závislá na protilátkách (*antibody dependent cellular phagocytosis*)
- BAM - biokompatibilní kotva pro membrány (*biocompatible anchor for cell membrane*)
- CDC - cytotoxicita závislá na komplementu (*complement dependent cytotoxicity*)
- CLRs - C-typ lektinové receptory
- CRP - C-reaktivní protein
- CTLs - cytotoxické T lymfocyty
- DAMPs – *damage associated molecular pattern*
- DC - dendritické buňky
- DMSO - dimetyl sulfoxid
- EDTA - kyselina ethylendiamintetraoctová
- FCS - fetální bovinní sérum (*fetal calf serum*)
- FPRs – formyl peptidové receptory
- GM – CSF - faktor stimulující vznik kolonií granulocytů a makrofágů (*granulocyte macrophage colony stimulating factor*)
- HMGB1 – *high mobility group box*
- HSPs – proteiny teplotního šoku (*heat shock proteins*)
- IL - interleukin
- INF - interferon
- KIRs – *killer cell immunoglobulin-like receptors*
- LTA - lipoteichová kyselina
- MAB - monoklonální protilátka
- MAP kináza – mitogenem aktivovaná protein kináza (*mitogen-activated protein kinases*)
- MBL - lektin vázající manózu, manan (*manan binding lectin*)
- MHC - hlavní histokompatibilní komplex (*major histocompatibility complex*)
- MyD 88 - *Myeloid differentiation primary response gene 88*
- NF- κ B – nukleární faktor *kappa B* (*nuclear factor kappa B*)
- NK buňky - přirození zabíječi (*Natural killer*)
- NLR - NOD like receptory

Pam₃CSK₄ - palmitoyl-3-cystein-serin-lysin-4

PAMPs – molekulové vzory spojené s patogeny (*pathogen associated molecular patterns*)

PBS – sterilní pufovaný fyziologický roztok

POLY I:C – polyinosinická -polycitidylická kyselina

PRRs – receptory rozpoznávající molekulové vzory (*pattern recognition receptors*)

R848 - resiquimod

SMCC - sukcinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyklohexan-1-karboxylát

TCEP - tris(2-karboxyethyl)fosfin

TAA - tumor asociované antigeny (*tumor associated antigens*)

TGF - transformující růstový faktor (*transforming growth factor*)

TLRs - Toll-like receptory

TNF - *tumor necrosis faktor*

TSA - tumor specifické antigeny (*tumor specific antigens*)

10. LITERATURA

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

Alleva, D. G., Burger, C. J., & Elgert, K. D. (1994). Tumor-induced regulation of suppressor macrophage nitric oxide and TNF-alpha production. Role of tumor-derived IL-10, TGF-beta, and prostaglandin E2. *The Journal of Immunology*, *153*(4), 1674-1686.

Aliprantis, A. O., Yang, R. B., Mark, M. R., Suggett, S., Devaux, B., Radolf, J. D., Klimpel, G. R., Godowski, P., & Zychlinsky, A. (1999). Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science*, *285*(5428), 736-739.

Becker, J. C., Houben, R., Schrama, D., Voigt, H., Ugurel, S., & Reisfeld, R. A. (2010). Mouse models for melanoma: a personal perspective. *Experimental Dermatology*, *19*(2), 157-164.

Beltrame, M. H., Catarino, S. J., Goeldner, I., Boldt, A. B. W., & de Messias-Reason, I. J. (2014). The lectin pathway of complement and rheumatic heart disease. *Frontiers in Pediatrics*, *2*.

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

Bianchi, R., Adami, C., Giambanco, I., & Donato, R. (2007). S100B binding to RAGE in microglia stimulates COX-2 expression. *Journal of Leukocyte Biology*, *81*(1), 108-118.

Blattman, J. N., & Greenberg, P. D. (2004). Cancer immunotherapy: a treatment for the masses. *Science*, *305*(5681), 200-205.

Bonilla, F. A., & Oettgen, H. C. (2010). Adaptive immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *125*(2), S33-S40.

Brada, M., Ford, D., Ashley, S., Bliss, J. M., Crowley, S., Mason, M., Rajan, B., & Traish, D. (1992). Risk of second brain tumour after conservative surgery and radiotherapy for pituitary adenoma. *BMJ*, *304*(6838), 1343-1346.

Cheng, Y. S., & Xu, F. (2010). Anticancer function of polyinosinic-polycytidylic acid. *Cancer Biology & Therapy*, *10*(12), 1219-1223.

Condliffe, A. M., Kitchen, E., & Chilvers, E. R. (1998). Neutrophil priming: pathophysiological consequences and underlying mechanisms. *Clinical Science*, *94*(5), 461-471.

Cook, D. N., Pisetsky, D. S., & Schwartz, D. A. (2004). Toll-like receptors in the pathogenesis of human disease. *Nature Immunology*, *5*(10), 975-979.

Crespo, H., Reina, R., Glaria, I., Ramírez, H., de Andrés, X., Jáuregui, P., Luján, L., Martínez-Pomeres, L., Amorena, B., & de Andrés, D. F. (2011). Identification of the ovine mannose receptor and its possible role in Visna/Maedi virus infection. *Vet Res*, *42*(1), 28.

Cui, Z., Willingham, M. C., Hicks, A. M., Alexander-Miller, M. A., Howard, T. D., Hawkins, G. A., Miller, M. S., Weir, H. M., Du, W., & DeLong, C. J. (2003). Spontaneous regression of advanced cancer: identification of a unique genetically determined, age-dependent trait in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(11), 6682-6687.

Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature Immunology*, *3*(11), 991-998.

Elfeil, W., Shanshan, L., Reham, A., & Yu, W. (2013). Pattern recognition receptors mini review. *Global Animal Science Journal*, *1*, 1118-1127.

Emmett, M. S., Symonds, K. E., Rigby, H., Cook, M. G., Price, R., Metcalfe, C., Orlando, A., & Bates, D. O. (2010). Prediction of melanoma metastasis by the Shields index based on lymphatic vessel density. *BMC Cancer*, *10*(1), 208.

Facciabene, A., Motz, G. T., & Coukos, G. (2012). T-regulatory cells: key players in tumor immune escape and angiogenesis. *Cancer Research*, 72(9), 2162-2171.

Farmer, J. D., Packard, N. H., & Perelson, A. S. (1986). The immune system, adaptation, and machine learning. *Physica D: Nonlinear Phenomena*, 22(1), 187-204.

Figdor, C. G., van Kooyk, Y., & Adema, G. J. (2002). C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells. *Nature Reviews Immunology*, 2(2), 77-84.

Fidler, I. J. (1975). Biological behavior of malignant melanoma cells correlated to their survival in vivo. *Cancer Research*, 35(1), 218-224.

Fidler, I. J. (1990). Critical factors in the biology of human cancer metastasis: twenty-eighth GHA Clowes memorial award lecture. *Cancer Research*, 50(19), 6130-6138.

Finn, O. J. (2008). Cancer immunology. *New England Journal of Medicine*, 358(25), 2704-2715.

Flo, T. H., Halaas, Ø., Lien, E., Ryan, L., Teti, G., Golenbock, D. T., Sundan, A., & Espevik, T. (2000). Human toll-like receptor 2 mediates monocyte activation by *Listeria monocytogenes*, but not by group B streptococci or lipopolysaccharide. *The Journal of Immunology*, 164(4), 2064-2069.

Fridlender, Z. G., Sun, J., Kim, S., Kapoor, V., Cheng, G., Ling, L., Worthen, G. S., & Albelda, S. M. (2009). Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF- β : "N1" versus "N2" TAN. *Cancer cell*, 16(3), 183-194.

Fu, H., Karlsson, J., Bylund, J., Movitz, C., Karlsson, A., & Dahlgren, C. (2006). Ligand recognition and activation of formyl peptide receptors in neutrophils. *Journal of Leukocyte Biology*, 79(2), 247-256.

Garcia-Lora, A., Algarra, I., & Garrido, F. (2003). MHC class I antigens, immune surveillance, and tumor immune escape. *Journal of Cellular Physiology*, 195(3), 346-355.

Goldszmid, R. S., Idoyaga, J., Bravo, A. I., Steinman, R., Mordoh, J., & Wainstok, R. (2003). Dendritic cells charged with apoptotic tumor cells induce long-lived protective CD4⁺ and CD8⁺ T cell immunity against B16 melanoma. *The Journal of Immunology*, 171(11), 5940-5947.

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674

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

Hauf, N., Goebel, W., Fiedler, F., Sokolovic, Z., & Kuhn, M. (1997). *Listeria monocytogenes* infection of P388D1 macrophages results in a biphasic NF- κ B (RelA/p50) activation induced by lipoteichoic acid and bacterial phospholipases and mediated by I κ B α and I κ B β degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(17), 9394-9399.

Haynes-Gilmore, N., Banach, M., Edholm, E. S., Lord, E., & Robert, J. (2014). A critical role of non-classical MHC in tumor immune evasion in the amphibian *Xenopus* model. *Carcinogenesis*, bgu100.

Huang, S., Hendriks, W., Althage, A., Hemmi, S., Bluethmann, H., Kamijo, R., Vilcek, J., Zinkernagel, R. M., & Aguet, M. (1993). Immune response in mice that lack the interferon-gamma receptor. *Science*, 259(5102), 1742-1745.

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

Janeway Jr, C. A., & Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annual Review of Immunology*, 20(1), 197-216.

Janotová, T., Jalovecká, M., Auerová, M., Švecová, I., Bruzlová, P., Maierová, V., Kumžáková, Z., Čunátová, Š., Vlčková, Z., Caisová, V., Rozsypalová, P., Lukáčová, K., Vácová, N., Wachtlová, M., Salát, J., Lieskovská, J., Kopecký, J., & Ženka, J. (2014). The Use of Anchored Agonists of Phagocytic Receptors for Cancer Immunotherapy: B16-F10 Murine Melanoma Model. *PLoS ONE*, 9(1), e85222.

Jewett, A., & Bonavida, B. (1994). Activation of the human immature natural killer cell subset by IL-12 and its regulation by endogenous TNF- α and IFN- γ secretion. *Cellular Immunology*, 154(2), 273-286.

Kaczanowska, S., Joseph, A. M., & Davila, E. (2013). TLR agonists: our best frenemy in cancer immunotherapy. *Journal of Leukocyte Biology*, 93(6), 847-863.

Kato, K., Itoh, C., Yasukouchi, T., & Nagamune, T. (2004). Rapid protein anchoring into the membranes of mammalian cells using oleyl chain and poly (ethylene glycol) derivatives. *Biotechnology Progress*, 20(3), 897-904.

Kawai, T., & Akira, S. (2011). Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity*, 34(5), 637-650.

Kawasaki, T., & Kawai, T. (2013). Toll-like receptor signaling pathways. *Frontiers in immunology*, 5, 461-461.

Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M., & Kuchroo, V. K. (2009). IL-17 and Th17 Cells. *Annual Review of Immunology*, 27, 485-517.

Kovářová, M. (2015). Použití neutrofilů v nádorové imunoterapii. Diplomová práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. České Budějovice.

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

- Liew, F. Y., Xu, D., Brint, E. K., & O'Neill, L. A. (2005). Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. *Nature Reviews Immunology*, 5(6), 446-458.
- Lu, Y., Hong, S., Li, H., Park, J., Hong, B., Wang, L., Zheng, Y., Liu, Z., Xu, J., He, J., Qian, J., Yi, Q., & Yang, J. (2012). Th9 cells promote antitumor immune responses in vivo. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(11), 4160-4171.
- Malik, S., & Waxman, J. (1992). Cytokines and cancer. *BMJ*, 305(6848), 265-267.
- Martinez-Pomares, L. (2012). The mannose receptor. *Journal of Leukocyte Biology*, 92(6), 1177-1186.
- Martins, F. C., & de Oliveira, C. F. (2008). Chemotherapy and the future: microdialysis as a local administration technique. *European Journal of Gynaecological Oncology*, 30(1), 5-8.
- Markovic, S. N., Erickson, L. A., Rao, R. D., McWilliams, R. R., Kottschade, L. A., Creagan, E. T., Weenig, R. H., Hand, J. L., Pittelkow, M. R., Pockaj, B. A., Vachon, C. M., Schield, S. E., Laman, S. D., Cameron, J. D., Maples W. J., Pulido, J. S., & Bardia, A. (2007, March). Malignant melanoma in the 21st century, part 1: epidemiology, risk factors, screening, prevention, and diagnosis. In *Mayo Clinic Proceedings* (Vol. 82, No. 3, pp. 364-380). Elsevier.
- Mattson, G., Conklin, E., Desai, S., Nielander, G., Savage, M. D., & Morgensen, S. (1993). A practical approach to crosslinking. *Molecular Biology Reports*, 17(3), 167-183.
- Medzhitov, R., & Janeway, C. A. (1997). Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Current Opinion in Immunology*, 9(1), 4-9.
- Medzhitov, R., & Janeway, C. (2000). Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunological Reviews*, 173(1), 89-97.
- Nakamura, K., Yoshikawa, N., Yamaguchi, Y., Kagota, S., Shinozuka, K., & Kunitomo, M. (2002). Characterization of mouse melanoma cell lines by their mortal malignancy using an experimental metastatic model. *Life Sciences*, 70(7), 791-798.

O'Connell, J., Bennett, M. W., O'Sullivan, G. C., O'Callaghan, J., Collins, J. K., & Shanahan, F. (1999). Expression of Fas (CD95/APO-1) ligand by human breast cancers: significance for tumor immune privilege. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 6(4), 457-463.

Old, L. J., & Chen, Y. T. (1998). New paths in human cancer serology. *The Journal of Experimental Medicine*, 187(8), 1163-1167.

Ozinsky, A., Underhill, D. M., Fontenot, J. D., Hajjar, A. M., Smith, K. D., Wilson, C. B., Schroeder, L., & Aderem, A. (2000). The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(25), 13766-13771.

PrabhuDas, M., Bowdish, D., Drickamer, K., Febbraio, M., Herz, J., Kobzik, L., Krieger, M., Loike, J., Means, T. K., Moestrup, S. K., Post, S., Sawamura, T., Silverstein, S., Wang, Petersen, S. V., Thiel, S., & Jensenius, J. C. (2001). The mannan-binding lectin pathway of complement activation: biology and disease association. *Molecular Immunology*, 38(2), 133-149.

Philipps, C., McMillan, M., Flood, P. M., Murphy, D. B., Forman, J., Lancki, D., Womack, J. L., Goodenow, R. S., & Schreiber, H. (1985). Identification of a unique tumor-specific antigen as a novel class I major histocompatibility molecule. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(15), 5140-5144.

Prince, L. R., Whyte, M. K., Sabroe, I., & Parker, L. C. (2011). The role of TLRs in neutrophil activation. *Current Opinion in Pharmacology*, 11(4), 397-403.

Raval, R. R., Sharabi, A. B., Walker, A. J., Drake, C. G., & Sharma, P. (2014). Tumor immunology and cancer immunotherapy: summary of the 2013 SITC primer. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 2(1), 1-11.

- Ridge, J. P., Di Rosa, F., & Matzinger, P. (1998). A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4⁺ T-helper and a T-killer cell. *Nature*, 393(6684), 474-478.
- Rigel, D. S., & Carucci, J. A. (2000). Malignant melanoma: prevention, early detection, and treatment in the 21st century. *CA: a Cancer Journal for Clinicians*, 50(4), 215-236.
- Scott, A. M., Wolchok, J. D., & Old, L. J. (2012). Antibody therapy of cancer. *Nature Reviews Cancer*, 12(4), 278-287.
- Schwandner, R., Dziarski, R., Wesche, H., Rothe, M., & Kirschning, C. J. (1999). Peptidoglycan-and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *Journal of Biological Chemistry*, 274(25), 17406-17409.
- Sebag-Montefiore, D., Stephens, R. J., Steele, R., Monson, J., Grieve, R., Khanna, S., Quirke, P., Couture, J., Myint, A. S., Griffiths, G., Thompson, L. C., Parmar, M., & Bessell, E. (2009). Preoperative radiotherapy versus selective postoperative chemoradiotherapy in patients with rectal cancer (MRC CR07 and NCIC-CTG C016): a multicentre, randomised trial. *The Lancet*, 373(9666), 811-820.
- Sell, S. (2004). Stem cell origin of cancer and differentiation therapy. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 51(1), 1-28.
- Smith, K. A. (1988). Interleukin-2: inception, impact, and implications. *Science*, 240(4856), 1169-1176.
- So, E. Y., & Ouchi, T. (2010). The application of Toll like receptors for cancer therapy. *Int J Biol Sci*, 6(7), 675-681.
- Sompayrac, L. (1999). How the Immue System Works, 4th eddition. *Blackwell Sciece*, 152p.
- Steeg, P. S. (2006). Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. *Nature Medicine*, 12(8), 895-904.

Sudhakar, A. (2009). History of cancer, ancient and modern treatment methods. *Journal of Cancer Science & Therapy*, 1(2), 1.

Thomas, J. A., & Badini, M. (2011). The role of innate immunity in spontaneous regression of cancer. *Indian Journal of Cancer*, 48(2), 246.

Trinchieri, G. (2003). Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology*, 3(2), 133-146.

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

Vácová, N. (2015). Použití agonistů fagocytárních receptorů pro terapii nádorových onemocnění a studium možnosti zesílení jejich účinků současnou stimulací TLR receptorů. Diplomová práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. České Budějovice.

Vetvicka, V., Thornton, B. P., & Ross, G. D. (1996). Soluble beta-glucan polysaccharide binding to the lectin site of neutrophil or natural killer cell complement receptor type 3 (CD11b/CD18) generates a primed state of the receptor capable of mediating cytotoxicity of iC3b-opsonized target cells. *Journal of Clinical Investigation*, 98(1), 50.

Villalba, M., Rathore, M. G., Lopez-Royuela, N., Krzywinska, E., Garaude, J., & Allende-Vega, N. (2013). From tumor cell metabolism to tumor immune escape. *The International Journal of Biochemistry & Cell biology*, 45(1), 106-113.

Wang, R. F. (2001). The role of MHC class II-restricted tumor antigens and CD4+ T cells in antitumor immunity. *Trends in Immunology*, 22(5), 269-276.

Yamagiwa, S., Gray, J. D., Hashimoto, S., & Horwitz, D. A. (2001). A role for TGF- β in the generation and expansion of CD4+ CD25+ regulatory T cells from human peripheral blood. *The Journal of Immunology*, 166(12), 7282-7289.

Zhou, Z. X., & Sun, L. (2015). Immune effects of R848: evidences that suggest an essential role of TLR7/8-induced, Myd88-and NF- κ B-dependent signaling in the antiviral immunity of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Developmental & Comparative Immunology*, 49(1), 113-120.

Zitvogel, L., Apetoh, L., Ghiringhelli, F., André, F., Tesniere, A., & Kroemer, G. (2008). The anticancer immune response: indispensable for therapeutic success?. *The Journal of Clinical Investigation*, 118(6), 1991-2001.