

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta**

**Nádorová imunoterapie založená na použití
mikroorganismů a jejich částí. Úloha tvorby
neutrofilních extracelulárních sítí.**

Diplomová práce

Bc. Julie Fáberová

Školitel: RNDr. Jan Ženka, CSc.

České Budějovice 2015

Fáberová, J., 2015: Nádorová imunoterapie založená na použití mikroorganismů a jejich částí. Úloha tvorby neutrofilních extracelulárních sítí. [Cancer immunotherapy based on the use of microorganisms and their parts. Role of neutrophil extracellular traps formation. Mgr. Thesis, in Czech.]-63 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

In the first part of the theses, I studied therapeutical effect of intratumoral application of various types of bacteria on melanoma B16-F10 bearing mice alone or in combination with another immunostimulatory compounds. Tumour size, metastasis and survival were monitored. The second part was focused on study of cytotoxic effect of neutrophils on melanoma cells and the role of neutrophil extracellular traps formation.

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

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce.

Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

České Budějovice, 15. 4. 2015

Julie Fáberová

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli RNDr. Janu Ženkovi za odborné vedení diplomové práce, za jeho trpělivost a ochotu s čímkoliv poradit, a dále za cenné rady a připomínky při psaní diplomové práce. Velký dík patří také Mgr. Veronice Caisové a Bc. Markétě Kovářové za pomoc při metodologickém zpracování *in vitro* pokusů. Dále bych ráda poděkovala členům katedry medicínské biologie za vytvoření příjemného pracovního prostředí. Samozřejmě mé poděkování také patří rodině, která mě podporovala a vytvořila dobré zázemí pro studium.

Obsah

1 Úvod	- 1 -
2 Přehled literatury	- 2 -
2.1 Nádorová onemocnění	- 2 -
2.1.1 Typické znaky nádorových buněk	- 2 -
2.1.2 Kancerogeneze.....	- 3 -
2.1.3 Příčiny vzniku nádorových onemocnění	- 3 -
2.1.4 Klasifikace nádorových onemocnění.....	- 4 -
2.2. Melanom.....	- 4 -
2.2.1 Klasifikace melanomu	- 4 -
2.2.2 Melanomové buňky B16-F10.....	- 6 -
2.3 Nádorová onemocnění a imunitní systém	- 6 -
2.3.1 Modely imunitní odpovědi na nádory	- 6 -
2.3.2 Způsoby úniku nádoru imunitní odpovědi.....	- 7 -
2.3.3 Nádorové onemocnění a vrozená imunita	- 8 -
2.3.4 Nádorové onemocnění a zánět.....	- 9 -
2.3.5 Imunitní buňky působící proti nádorovému onemocnění.....	- 10 -
2.3.5.1 Neutrofilny a nádory.....	- 10 -
2.3.5.1.1 Neutrofilní extracelulární síť.....	- 11 -
2.4 Nádorová terapie s použitím bakterií:	- 12 -
2.5. Substance použité při terapii myši C57/BL6N v diplomové práci.....	- 14 -
2.5.1 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	- 14 -
2.5.2 <i>Serratia marcescens</i>	- 15 -
2.5.3 <i>Borrelia burgdorferi</i>	- 15 -
2.5.4 Manan	- 16 -
2.5.4.1 Receptory rozpoznávající manan.....	- 16 -
2.5.4.1.1 Manóza-binding lektin (MBL)	- 16 -
2.5.4.1.2 Manózový receptor	- 17 -
2.5.5.N-Formyl-methionyl-leucyl fenyalanin (fMLF)	- 17 -
2.5.5.1 Formyl peptidové receptory (FPR).....	- 17 -
2.5.6 Resiquimod (R848)	- 18 -
2.5.7 Látky používané k ukotvení léčivých substancí na molekuly:	- 19 -
2.5.7.1 Succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate (SMCC).....	- 19 -

2.5.7.2 Tris (2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride (TCEP-HCl)	- 19 -
2.5.7.3 Biocompatible Anchor for Cell Membrane (BAM)	- 19 -
2.5.8 Cl-amidin	- 19 -
3. Cíle práce	- 20 -
4. Materiál a metody:	- 21 -
4.1 Použité chemikálie:	- 21 -
4.2 Laboratorní zvířata	- 21 -
4.3 Bakterie a buněčná linie	- 22 -
4.4 Příprava buněk myšního melanomu B16-F10 pro <i>in vivo</i> a <i>in vitro</i> experimenty	- 22 -
4.5 Transplantace nádorových buněk	- 22 -
4.6 Měření velikosti nádoru	- 23 -
4.7 Průměrná redukce nádorového růstu	- 23 -
4.8 Počítání metastáz v plicích	- 23 -
4.9 Sonikace	- 23 -
4.10 Izolace neutrofilů z kostní dřeně	- 23 -
4.11 Přečištění neutrofilů pomocí imunomagnetické separace	- 24 -
4.12 Primování neutrofilů	- 24 -
4.12.1 Primování neutrofilů pro použití s fMLF jako ligandem	- 24 -
4.12.2 Primování neutrofilů pro použití s mananem jako ligandem	- 24 -
4.13 Příprava terapeutických látek	- 24 -
4.13.1 Příprava manan-BAM	- 24 -
4.13.1.1 Příprava manan-SMCC v PBS	- 25 -
4.13.2 Kultivace <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	- 25 -
4.13.2.1 Příprava suspenze <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> v PBS	- 25 -
4.13.2.2 Příprava suspenze <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> v roztoku manan –BAM	- 25 -
4.13.3 Kultivace <i>Serratia marcescens</i>	- 25 -
4.13.3.1 Příprava suspenze <i>Serratia marcescens</i> -SMCC	- 26 -
4.13.4 Příprava suspenze <i>Borrelia burgdorferi</i> :	- 26 -
4.13.4.1 Příprava suspenze <i>Borrelia burgdorferi</i> -SMCC	- 26 -
4.13.4.2 Příprava suspenze <i>Borrelia burgdorferi</i> -SMCC v roztoku manan-SMCC	- 26 -
4.14 Příprava Resiquimodu.HCl (R848.HCl)	- 26 -
4.14.1 Příprava roztoku Resiquimodu v 0,2 mM manan-BAM	- 26 -
4.15 Statistické zpracování dat	- 27 -

4.16 Pokus č. 1: Studium vlivu dávky <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> a <i>Serratia marcescens</i> na redukci nádorového růstu, pulzní terapie.....	- 27 -
4.17 Pokus č. 2: Studium vlivu volných bakterií <i>Serratia marcescens</i> a kovalentně kotvených <i>Serratia marcescens</i> -SMCC na redukci nádorového růstu, pulzní režim	- 27 -
4.18 Pokus č. 3: Studium vlivu kovalentně vázané <i>Borrelia burgdorferi</i> , kovalentně vázaného mananu a jejich kombinace na redukci nádorového růstu, pulzní režim	- 28 -
4.19 Pokus č. 4: <i>In vitro</i> stanovení vlivu inhibice NETs na cytotoxické působení neutrofilů na melanomové buňky s vázaným f-MLF	- 28 -
4.20 Pokus č. 5: <i>In vitro</i> stanovení vlivu inhibice NETs na cytotoxické působení neutrofilů na melanomové buňky s vázaným mananem	- 29 -
4.21 Pokus č. 6: <i>In vitro</i> stanovení vlivu inhibice NETs na cytotoxické působení neutrofilů na melanomové buňky s vázaným mananem, dvojnásobný počet buněk	- 29 -
4.22 Pokus č. 7: <i>In vitro</i> stanovení vlivu inhibice NETs na cytotoxické působení neutrofilů na melanomové buňky s vázaným mananem, použití dvojnásobného a polovičního množství Cl-amidinu	- 30 -
4.23 Pokus č. 8: Studium vlivu Cl-amidinu jako inhibitoru NETs na účinek nádorové imunoterapie založené na kombinaci R848 a manan-BAM, pulzní léčba	- 30 -
5 Výsledky	- 31 -
5.1 Pokus č. 1: Studium vlivu dávky <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> a <i>Serratia marcescens</i> na redukci nádorového růstu, pulzní terapie.....	- 31 -
5.2 Pokus č. 2: Studium vlivu volných bakterií <i>Serratia marcescens</i> a kovalentně kotvených <i>Serratia marcescens</i> -SMCC na redukci nádorového růstu, pulzní režim	- 32 -
5.3 Pokus č. 3: Studium vlivu kovalentně vázané <i>Borrelia burgdorferi</i> , kovalentně vázaného mananu a jejich kombinace na redukci nádorového růstu, pulzní režim.....	- 34 -
5.4 Pokus č. 4: <i>In vitro</i> stanovení vlivu inhibice NETs na cytotoxické působení neutrofilů na melanomové buňky s vázaným fMLF	- 37 -
5.5 Pokus č. 5: <i>In vitro</i> stanovení vlivu inhibice NETs na cytotoxické působení neutrofilů na melanomové buňky s vázaným mananem	- 38 -
5.6 Pokus č. 6: <i>In vitro</i> stanovení vlivu inhibice NETs na cytotoxické působení neutrofilů na melanomové buňky s vázaným mananem, dvojnásobný počet buněk	- 39 -
5.7 Pokus č. 7: <i>In vitro</i> stanovení vlivu inhibice NETs na cytotoxické působení neutrofilů na melanomové buňky s vázaným mananem, použití dvojnásobného a polovičního množství Cl-amidinu	- 40 -
5.8 Pokus č. 8: Studium vlivu Cl-amidinu jako inhibitoru NETs na účinek nádorové imunoterapie založené na kombinaci R848 a manan-BAM, pulzní léčba	- 42 -
6 Diskuze	- 45 -
7 Souhrn.....	- 51 -
8 Seznam zkratk.....	- 52 -

1 Úvod

Nádorová onemocnění představují jeden z největších problémů tohoto tisíciletí. Každý rok je hlášeno několik tisíc nových případů onemocnění rakovinou. Z toho vyplývá, že je nutné proti tomuto onemocnění bojovat.

K terapii nádorů se obecně využívá chirurgické odstranění, radioterapie a chemoterapie. Všechny tyto složky terapie mají ovšem i nežádoucí účinky. Během chirurgického vyjmutí nádoru nemůže dojít i k vyjmutí případných metastáz, proto se tato terapie často kombinuje s radioterapií či chemoterapií. Radioterapie stejně tak jako chemoterapie působí toxicky i na zdravé buňky. Proto je důležité zavést cílenou léčbu, která nebude toxická pro zdravé tělní buňky, ale bude specificky působit pouze na buňky nádorové. Touto léčbou by mohla být imunoterapie.

Novým přístupem jak léčit rakovinové onemocnění je tedy imunoterapie. Tato terapie je založena na vlastním imunitním systému člověka, kdy je indukována protinádorová imunita, či dochází k využití imunitních mechanismů k zacílení léčby. Během této terapie nejsou poškozovány vlastní zdravé tělní buňky. Obsahem této diplomové práce je stimulace vrozené imunity pomocí bakterií a jejich částí a dále je zde diskutována i role neutrofilů a jejich neutrofilních extracelulárních sítí.

2 Přehled literatury

2.1 Nádorová onemocnění

Nádorová onemocnění jsou skupinou onemocnění charakterizovaných nekontrolovatelným buněčným množením (Cooper, 1992). Akumulace těchto buněk vede k vytvoření tumoru. Pokud tumor neinvaduje do okolních tkání, označujeme ho jako benigní. Při případné invazi do okolí ho klasifikujeme jako maligní. Maligní tumory se vyznačují metastázováním – volné rakovinotvorné buňky pocházející z původního nádoru migrují do odlehlých oblastí v těle a zakládají sekundární tumory (Almeida a kol., 2010).

2.1.1 Typické znaky nádorových buněk

Hanahan a Weinberg definovali ve své práci 6 typických znaků nádorových buněk (Obr. 1). Těchto šest vzájemně se doplňujících znaků umožňuje buňkám nádoru růst a šířit se pomocí metastázování (Hanahan a Weinberg, 2011).

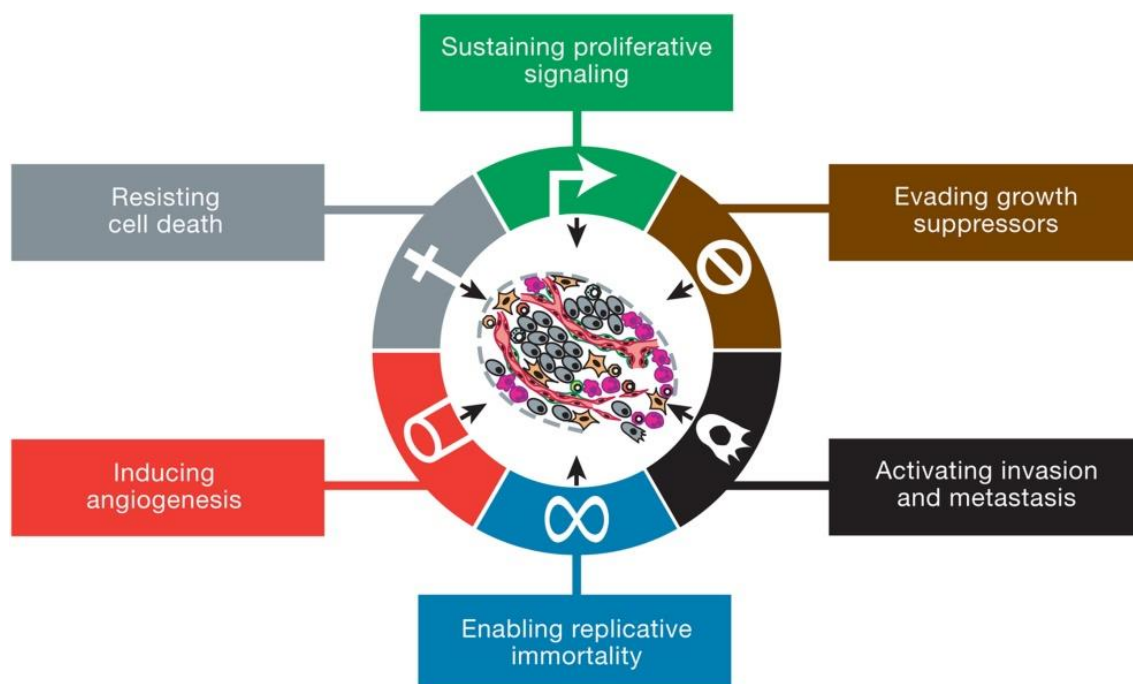
Mezi tyto znaky patří soběstačnost v růstových signálech, kdy nádorové buňky produkují mnoho svých vlastních růstových signálů. Neméně důležité je i to, že snižují svou závislost na signálech produkovaných z normální tkáně. Toto osvobození od závislosti na exogenně odvozených signálech narušuje homeostatický mechanismus, který ve zdravé tkáni slouží k zajištění správné funkce různých buněk ve tkáních. Mimo jiné nádorové buňky vykazují i necitlivost na antiproliferační signály, zatímco v normální tkáni funguje velké množství antiproliferativních signálů k zajištění buněčné homeostázy a stagnace (Hanahan a Weiberg, 2000).

Dalším znakem je vyhnutí se apoptóze, takže velikost nádorové masy není dána pouze zvýšenou proliferací, ale i sníženým odbouráváním buněk. Dalším jevem, který přispívá k vytvoření nádorové masy je přítomnost telomerázy na povrchu nádorových buněk. Telomeráza zabraňuje zkrácení telomer při replikaci a tím umožňuje nádorovým buňkám se neomezeně replikovat (Hanahan a Weiberg, 2000).

Buňky ke své funkci potřebují zásobování kyslíkem a živinami, což jim umožňuje schopnost angiogeneze. Mnoho tumorů má zvýšenou produkci VEGF a/nebo FGFs ve srovnání s okolní tkání (Hanahan a Weiberg, 2000).

Metastázování je také důležitým znakem u maligních nádorových buněk. Primární maligní nádory jsou schopné vyslat nádorové buňky, které expandují do odlehlých tkání, kde mohou založit nové nádorové kolonie. Tyto odlehlé kolonie nádorových buněk –

metastáze – způsobují 90% úmrtí (Hanahan a Wienberg, 2000).



Obr. 1: Typické znaky nádorových buněk (Hanahan a Weinberg, 2011).

2.1.2 Kancerogeneze

Vznik rakoviny, kancerogeneze, je vícestupňový proces. Tento proces rozdělujeme do tří stadií: iniciace, promoce a progresse.

Při iniciaci dochází k poškození DNA buněk působení fyzikální, chemický či biologických kancerogenů. Toto poškození, pokud nedojde k jeho opravení, může způsobit genetickou mutaci. Většina mutací je neškodná, některé mutace však poskytnou buňce výhodu (zvýšení proliferace, snížená schopnost apoptózy). Nejvíce podstatné pro vznik rakoviny jsou mutace v pro-onkogenech a inaktivujících tumor supresivních genech (Jakóbisiak a kol., 2003).

Promoce je stádium, při němž dochází ke klonální expanzi iniciované buňky, což vede k vytvoření pre-neoplastických buněk produkující uzlíky, papilomy či polypy.

Při progresi dochází k transformaci pre-neoplastických buněk do maligních, které invadují do okolní tkáně a metastazují (Jakóbisiak a kol., 2003).

2.1.3 Příčiny vzniku nádorových onemocnění

Pouze 5-10% nádorových onemocnění má dědičnou podstatu. Zbývajících 90 – 95% mají svou příčinu v prostředí a životním stylu. Mezi faktory ovlivňující vznik rakoviny patří například kouření cigaret, špatná strava, alkohol, nepřiměřený pobyt na

slunci, znečištění životního prostředí, infekce, stres, obezita a nedostatek pohybu (Anand a kol., 2008).

2.1.4 Klasifikace nádorových onemocnění

Nádory můžeme rozdělit na maligní a benigní. Maligní nádor je popsán ve Velkém lékařském slovníku (Vokurka a kol., 2004) jako nádor zhoubný, který při svém růstu ničí okolní tkáň a zakládá dceřiná ložiska (metastáze). Benigní nádor je pak popsán jako nezhoubný nádor, který roste ohraničeně a metastázy nezakládá. Může však utlačovat okolní struktury, což je nebezpečné převážně v mozku. Některé benigní nádory se po čase mohou zvrhnout v maligní. Tento proces se nazývá malignizace (Vokurka a kol., 2004).

Dalším základním dělením nádoru je rozdělení na primární a sekundární. Dle Velkého lékařského slovníku (Vokurka a kol., 2004) je primární nádor vzniklý prvotně v určitém orgánu, jako sekundární nádor se pak označují metastázy (Vokurka a kol., 2004).

2.2. Melanom

Melanom je definován jako neoplastické poškození melanocytů. Toto onemocnění se vyskytuje na kůži a v měkkých tkáních mozkových plen, mukózních membrán a horního jícnu. Melanom se vyskytuje s menší incidencí než nezhoubný typ. Množství nových případů stále roste, především ve spojení vystavení se UV paprskům. Pokud se melanom léčí v raném stadiu, šance na přežití je extrémně vysoká. Pozdější invazivní stadia je obtížné léčit (Watson, 2012).

Vznik melanomu závisí na genotypu a fenotypu, ale i na působení rizikových faktorů. Přeměna melanocytů na nádorové buňky začíná onkogenní mutací, která není opravena. Za příznivých podmínek může tento jev vyústit v nekontrolovatelný nádorový růst. Může také docházet k hromadění chromosomální nestability v buňce, což vede ke vzniku dalších mutací a k prohlubování nádorové změny (Krajsová, 2006).

Melanom má klonální charakter - vzniká z jedné mutované či více mutovaných buněk ve stejném časovém intervalu. V případě, že všechny nádorové buňky nesou stejnou mutaci, jde o polyklonální charakter. Pokud buňky obsahují větší množství různých mutací, nazýváme tento jev heteroklonálním charakterem. Výsledkem je nekontrolovatelné množení mutovaných melanocytů a jejich schopnost metastázovat (Krajsová, 2006).

2.2.1 Klasifikace melanomu

Nově vznikající melanom může být charakterizován podle klinického obrazu, kde

pomáhá ABCDE klasifikace. Čím více znaků je pozitivních, tím větší je pravděpodobnost, že daná léze je melanomem:

A – Asymmetry (asymetrie) ve struktuře, tvaru či barvě, kdy jedna část léze neodpovídá druhé části.

B – Border irregularity (nepravidelnost v ohraničení), kde hrany léze jsou členité, nepravidelné, s četnými zářezy a výběžky.

C – Colour (barva). Melanom může mít až 6 různých barev od téměř bílé až po černou, kdy pigmentace melanomu není uniformní.

D – Diameter (průměr), charakteristický pro melanom je průměr léze větší než 6 mm.

E – Evaluation (vývoj), kdy dochází ke změně léze v čase (Kittler a kol., 1999 a Krajsová, 2006).

Klinicko-histologicky i klinicky rozlišujeme základní typy melanomu – povrchově se šířící melanom, nodulární melanom, letigo maligna melanom, akrolentiginózní melanom (Breuninger a kol., 2000).

Letigo maligna melanom: Tvoří pouze 4-10 % melanomových morf. Vyskytuje se převážně v oblastech krku a hlavy a to po věku 55 let. Histologicky jde o preinvazivní formu melanomu, problém toho melanomu je, že se může přeměnit na invazivní formu melanomu.

Povrchově se šířící melanom: Tvoří 65-75% melanomů a jde o jejich nejčastější formu. Objevuje se na trupu a končetinách. Dochází jak k růstu horizontálnímu, tak vertikálnímu, který pak vede k metastázování.

Nodulární melanom: Tvoří se v 15-30% případů. Od počátku roste vertikálně a má vysokou pravděpodobnost metastázování po celou dobu růstu.

Akrolentiginózní melanom: Objevuje se na dlaních, ploskách a na distálních člancích prstů. Tento typ melanomu je velmi zhoubný a metastázuje.

Desmoplastický melanom: Vyskytuje se vzácně, s incidencí méně než 1%. Tvoří se převážně na hlavě, krku a v horní partii zad.

Amelanotické formy: Tyto formy se vyskytují v zastoupení 1-7%. Nejčastěji jsou u povrchově se šířícího melanomu, akrolentiginózního melanomu a nodulárního melanomu (Klener a kol., 2002).

2.2.2 Melanomové buňky B16-F10

Aplikace melanomu myším se provádí v laboratorních podmínkách za účelem zkoumání vlivu melanomových buněk na organismus, pochopení mechanismů při vzniku melanomů a zkoumání nových možností léčby.

Při práci v naší laboratoři se implantují myším buňky B16 - F10 (myší melanom). Melanom B16 – F10 se spontánně objevil na myši typu C57BL/6 v roce 1954. V roce 1970 v Charles Laboratories byl klon B16 – F10 převeden v buněčnou linii (Fairchild a Carson, 2011).

Melanom B16-F10 vykazuje metastázování do plic myši (Brown a kol., 2002).

Buněk typu B16 jsou 4 druhy: B16 - F0, B16 - F1, který vykazuje nízké metastázování oproti B16 - F10, B16 - F10 a B16 - BL6 (Fairchild a Carson, 2011).

2.3 Nádorová onemocnění a imunitní systém

Nádor má na svém povrchu dva druhy antigenů, nádorově specifické a s nádorem spojené.

Nádorově specifický antigen je antigen, který je prezentován pouze na povrchu nádoru. S nádorem spojený antigen je antigen, který není prezentován pouze na povrchu nádorů, ale může být prezentován i na dalších tělních buňkách (Igney a Krammer, 2002). Nádorově specifické antigeny i antigeny s nádorem spojené jsou rozpoznávány pomocí cytotoxických T lymfocytů (Mizukoshi a kol., 2011).

2.3.1 Modely imunitní odpovědi na nádory

Existují dva modely imunitní odpovědi na nádory. Prvním modelem je imunitní dohled (immunosurveillance). Byly popsány tři stádia, které vedou od imunitního dohledu až k úniku nádoru imunitnímu systému: eliminace, fáze rovnováhy (equilibrium) a únik imunitnímu systému (escape). Vznikající nádorová buňka může být ihned eliminována imunitními efektorovými buňkami, jako jsou NK buňky. Jako odpověď na imunitní selekci může docházet k transformaci nádorových buněk, vznikají tak buňky, které mají nižší imunogenicitu a stávají se rezistentními k imunitním buňkám fáze rovnováhy. Nakonec, pokud dochází k dalšímu růstu nádoru, rozpustné faktory produkované nádory (TDSFs) mohou vyvolat několik mechanismů směřující k úniku nádorů z imunitní odpovědi (Kim a kol., 2006).

Dalším modelem je Danger model. K tomu aby imunitní systém vyhodnotil něco, jako nebezpečné používá tento systém antigen prezentující buňky (APC) – jako jsou

dendritické buňky, aktivované makrofágy a B buňky stimulující T buněčnou odpověď. Danger model pak navrhuje to, že rakovinné buňky se imunitnímu systému nezdají nebezpečné, takže imunitní odpověď pomocí T lymfocytů není vůbec zahájena (Fuchs a Matzinger, 1996).

2.3.2 Způsoby úniku nádoru imunitní odpovědi

Navzdory prezentaci antigenů na povrchu nádorových buněk, dochází často k tomu, že imunitní systém na nádorové buňky nereaguje.

Jedním z obranných mechanismů nádoru je snížená prezentace antigenu na povrchu nádoru. Obecně platí, že snížená exprese antigenů je vyšší u metastáz než u primárního nádoru. U některých nádorů může snížení nádorových antigenů v počátku růstu zapříčinit rychlejší růst a vyšší počet metastáz (Kim a kol., 1975, a Maeurer a kol., 1996).

Kromě toho mutace v oblasti nádorových antigenů mohou vést ke zvýšené heterogenitě nádorových lézí. Heterogenní exprese nádorových antigenů pak snižuje schopnost imunitního systému úspěšně zacílit působení jeho buněk (Edwards, 1985).

Snížená exprese MHC I molekul na povrchu nádorových buněk brání jejich rozpoznávání imunitním systémem (Hicklin a kol., 1999).

Absolutní ztráta MHC I molekul je signálem pro NK buňky a umožňuje je NK buňkám zničit. Proto nádor potřebuje další mechanismy jak odolávat lýze pomocí NK buněk. Využívá k tomu homology MHC I (Farrell a kol., 1997).

Produkce imunosupresivních faktorů je dalším systémem, kterým nádorové buňky bojují proti imunitě. Tyto faktory mohou být exprimovány samotnými nádorovými buňkami, ale mohou je uvolňovat i nerakovinové buňky, prezentované v místě nádoru, jako imunitní, stromální nebo epiteliální buňky. Nejvýznamnějším z těchto faktorů je tumor necrosis faktor β (TGF- β) (Elgert a kol., 1998).

Může také docházet k vytvoření tolerance na T lymfocyty. Aby proběhla imunitní odpověď zprostředkovaná T lymfocyty, musí dojít k navázání kostimulačních faktorů (CD80 a CD86) na povrch T lymfocytu. Mnoho nádorových buněk tyto kostimulační faktory neprodukuje (Staveley-O'Carroll a kol., 1998).

Nádory také mohou vykazovat rezistenci vůči indukci apoptózy systémem Fas/FasL a to díky ztrátě Fas receptoru (O'Connell a kol., 1996). Fas receptor je membránový protein, který po vazbě k Fas ligandu (FasL) spustí apoptickou kaskádu (Suda a kol., 1993). Nádorové buňky mohou také exprimovat na svém povrchu Fas ligand

a tím se stát odolným vůči lymfocytárnímu ataku (Houston a kol., 2003).

2.3.3 Nádorové onemocnění a vrozená imunita

Snaha využít vrozenou imunitu jako nástroj boje s nádorovým onemocněním pramení z prací prof. Cuiho a Hickse a jejich kolegů, kteří objevili schopnost spontánní regrese a kompletní rezistence (SR/CR) u myši. Schopnost spontánní regrese či kompletní rezistence umožňuje myším odolávat i vysokým dávkám nádorových buněk, které by v malém množství byly pro divoký typ myši (WT) letální. Odolnost je umožněna rychlou infiltrací leukocytů do místa výskytu nádorových buněk jak při první tak opakované expozici. Leukocyty během rychlé infiltrace vytváří okolo nádorových buněk rosety, které jsou pak finálně ničeny pomocí cytolyzy (Hicks a kol., 2006).

Myši se spontánní regresí/kompletní rezistencí proti nádorovým buňkám (SR/CR myši) jsou odvozeny od jedince BALB/c myši, která byla v roce 1999 objevena (Hicks a kol., 2006).

Práce profesora Cuiho a jeho kolegů klade důraz na využití vrozené imunity při boji s rakovinou tvorným onemocněním. Cui a jeho kolegové se ve své práci věnují regresi nádorových buněk bez léčby, která ojediněle nastává jak u myši, tak u lidí. Spontánní regrese je zodpovědná za masivní infiltraci leukocytů do míst, kde došlo k výskytu nádorových buněk. Tyto leukocyty se pak formují v agregáty a vytváří rozety spolu s nádorovými buňkami. Dochází k cytolytickému zničení nádorových buněk bez poškození okolních tkání (Cui a kol., 2003).

Dalším počinem byla práce Cuiho a kol., kteří objevili myš kmene BALB/c, u které se neprojeví známky nádorového bujení i po opakovaných injikacích nádorových buněk. Cui a kol. odhalili, že tato vlastnost je dominantním znakem v jednom lokusu (Cui a kol., 2003).

Stejně jako lidé, myši mají efektorové imunitní buňky. Prvním druhem jsou cytotoxické T lymfocyty, které potřebují předešlou expozici patogenem, aby mohly cíleně zabíjet. NK buňky, polymorfonukleáry a makrofágy předchozí expozici patogenem nepotřebují, ale jsou schopné reagovat na specifické vzory na molekulách, které nejsou tělu vlastní. Vzhledem k reakci SR/CR myši na nádorové buňky bez předchozí expozice se dá předpokládat, že vrozená imunita bude hrát významnou roli v odpovědi na nádorové onemocnění (Hicks a kol., 2006).

2.3.4 Nádorové onemocnění a záněť

Nádorové onemocnění vyvolává rozvrat homeostázy v těle. Na tento rozvrat těla reaguje vrozená imunita spuštěním zánětlivé odpovědi (Lu a kol., 2006). Každá zánětlivá odpověď je vyvolána signální kaskádou, která je spuštěná tzv. receptory rozpoznávající motivy (Pattern recognition receptor, PRR). V případě invaze cizorodých či patogenních látek jsou PRR schopné rozpoznat vzory potencionálně patogenních částic (Pathogen-associated molecular patterns, PAMPs). V případě nádorového onemocnění v úvahu přicházejí i molekulové vzory spojené s poškozením tkání (Damage-associated molecular patterns, DAMPs)(Takeuchi a Akira, 2010).

Dosud byly odhaleny 4 různé druhy PRRs, tyto rodiny zahrnují transmembránové proteiny jako jsou Toll-like receptory (TLRs), lektinové receptory typu C (CLRs). Dále sem také patří cytoplasmatické proteiny jako je Retinoic acid-inducible gene (RIG)-I-like receptory (RLRs) and NOD-like receptory (NLRs). Tyto PRRs jsou exprimovány na povrchu nejenom makrofágů a dendritických buněk, ale také na množství neprofesionálních imunitních buněk (Takeuchi a Akira, 2010).

S výjimkou NLRs, aktivace PRRs pomocí DAMPs nebo PAMPs vede ke zvýšení transkripce genů, které se účastní zánětlivé odpovědi. Tyto geny kódují prozánětlivé cytokiny jako jsou interferon typu 1 (INF1), chemokiny, antimikrobiální proteiny, proteiny zapojené do úpravy PRR signalizace a mnoho dalších necharakterizovaných proteinů. Expres těchto genů se liší v závislosti na míře aktivovaných PRRs (Takeuchi a Akira, 2010).

Zánětlivá odpověď organismu je řízená řadou prozánětlivých cytokinů jako je TGFβ, IL-1, a IL-6. Tyto cytokiny jsou pleiotropní proteiny, které regulují buněčnou smrt v zánětlivé tkáni, upravují vaskulární endoteliální permeabilitu, příliv krvinek do zánětlivých tkání a indukují produkci proteinů akutní fáze (Takeuchi a Akira, 2010).

TLRs jsou nejlépe charakterizované PRRs. Spouští imunitní odpověď na patogeny, které se nachází vně buňky a v intracelulárních endosomech a lysozomech a reagují i na látky uvolněné při poškození tkání (DAMPs)(Akira a kol., 2006). TLRs jsou charakterizovány na leucin bohatým opakováním na N-konci a následuje transmembránová homologní Toll/IL-R doména. Bylo definováno 10 různých TLRs u lidí a u myši 12. Různé TLR jsou schopné rozpoznat různé molekulové vzorce (Bowie a O'Neill, 2000).

2.3.5 Imunitní buňky působící proti nádorovému onemocnění

Přirození zabíječi (NK buňky) jsou buňky vrozené imunity a hrají velkou roli v imunologickém dohledu na nádor. NK buňky zabíjejí MHC I deficientní buňky. Jejich funkce je kontrolována rovnováhou mezi pozitivními a negativními signály (Moretta a kol., 2000).

Dalšími buňkami vrozené imunity, které se účastní zabíjení nádorových buněk, jsou makrofágy a neutrofilny. Mohou zničit nádor přímým zabíjením, ničením nádorových cév a prostředí, a inhibicí angiogeneze. Kromě těchto buněk, nádorové antigeny mohou stimulovat i další buňky, jako jsou cytotoxické T lymfocyty (CTL) či antigen prezentující buňky (APC) buňky (Lollini a Forni, 1999).

Specifickou imunitní odpověď zajišťují T-lymfocyty a makrofágy. Makrofágy dokážou fagocytovat nádorové buňky a prezentovat jejich antigen. Po stimulaci antigenem dochází k vytváření interleukinu 1 (IL-1). Tento interleukin aktivuje pomocné T lymfocyty a dochází k jejich postupné diferenciaci na buňky, které produkují interleukin 2 (IL-2). IL-2 je zodpovědný na klonální expanzi subpopulace T lymfocytů, včetně cytotoxických lymfocytů (CD4+ a CD8+). Cytotoxické buňky jsou pak buňky zodpovědné za destrukci nádorové masy (Kelner a kol., 2002).

2.3.5.1 Neutrofilny a nádory

Neutrofilny jsou převládající leukocyty v lidské periferní krvi. Mají velmi dobře definovanou roli, jako první útok v obraně proti mikrobiálním patogenům. Vzhledem k jejich krátké životaschopnosti a zcela diferenciovanému fenotypu, jejich podíl na zánětu, který přísluší k nádorovému onemocnění, byl považován zprvu za zanedbatelný.

Neutrofilny jsou schopné fagocytózy a zabíjení invadujících mikroorganismů uvolňováním aktivovaných cytokinů (jako je tumor necrosis faktor (TNF)- α , interleukin (IL)-1, interferony (IFNs), a další) a defensinů (Mantovani a kol., 2011).

S nádorem spojené neutrofilny (TAN) mohou mít jak protitumorovou tak protumorovou funkci (Friendler a kol., 2009).

Příkladem pronádorové aktivity neutrofilů jsou některé cytokiny, které uvolňují. Cytokiny produkované neutrofilny se mohou účastnit takzvaného imunoscultingu, k tomuto jevu dochází, pokud se propojí buňky nádorové a imunitní za vzniku fenotypické alterace na straně nádoru (Reiman a kol., 2007). Příkladem je faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů (GM-SCF) produkovaný buňkami rakoviny prsu, vyvolává v kultivačních experimentech produkci onkostatinu M neutrofilny. Onkostatin M pak může

vyvolat zvýšenou produkci vaskulárního endoteliálního faktoru (VEGF) a zvyšovat invasivitu (Gueen a kol., 2005). Jiným příkladem je faktor, přítomný v mediu, které bylo získané z hepatocelulárního karcinomu, indukující uvolňování růstového faktoru hepatocytů z neutrofilů. Tento faktor pak podporuje vyšší invazivitu nádorových buněk (Imai a kol, 2005).

Ve fagolysozomu neutrofilů mohou vznikat reaktivní formy kyslíku (ROS), které mají následně úlohu v poškození membrány bakterií a mají tak chránit hostitele (Fialkow a kol., 2007). ROS mohou mít účinky jak genotoxické (iniciují poškození DNA a nádorové zřízení) či mají cytotoxický efekt, který vede k tumorové regresi (Güngör a kol, 2010, Dallegri a kol., 1991). Fagolysozom neutrofilů obsahuje několik enzymů (například NADPH oxidáza), které jsou schopné redukovat molekulární kyslík do superoxidových radikálů (O_2^-) a zapříčinit tak vnik ROS. Superoxidový radikál pak může být dále převeden pomocí neutrofil-specifického enzymu myeloperoxidázy na kyselinu chlornou (HOCl) (Fialkow a kol., 2007).

2.3.5.1.1 Neutrofilní extracelulární síť

Neutrofilny jsou schopné vytvářet extracelulární neutrofilní síť (NETs), kterými bojují proti patogenům. NETs vytváří aktivované neutrofilny. Dle výzkumu Brinkmanna a kol. NETs obsahují hladké úseky o průměru 15-17 nm a kulovité oblasti, které mají kolem 25 nm, ty pak agregují do větších závitů a průměru až 50 nm. Dále odhalili, že NETs nejsou zabaleny do žádné membrány (Brinkmann a kol., 2004).

Hlavní strukturální součástí NETs je DNA. Dále NETs obsahují proteiny z primárních granulí, jako jsou neutrofilní elastáza, katepsin G a myeloperoxidáza. Dále pak proteiny ze sekundárních i terciálních granulí, jako laktoferin a gerlatináza. Cytoplasmatické proteiny, jako je například tubulin, aktin a další v NETs přítomny nejsou (Brinkmann a kol., 2004).

Hlavní rolí extracelulárních neutrofilových sítí je zachycení mikrobů a zabránění jejich šíření z místa původní infekce, inaktivování virulentních patogenů a zabíjení mikrobů. Zachycení mikrobů je možno díky interakci s NETs (Urban a kol., 2009).

NETs se vytváří procesem zvaným NETosa. Po aktivaci neutrofilu dochází k výrazným morfologickým změnám. Minutu po aktivaci se neutrofilny zploští a pevně připojí k podkladu. Během hodiny jádro se rozpadá, chromatin se dekonduzuje a vnitřní a vnější jaderná membrána se od sebe postupně oddělují. Současně se rozpadají granule. Po jedné hodině se jaderný obal separuje do vezikul a z nukleoplasmny a cytoplasmny se stává

homogenní masa. Nakonec dohází k vypouknutí buňky, tvorbě membránové praskliny a buněčný obsah se vylije do extracelulárního prostoru, kde se zformují NETs. Tvorba NETs vyžaduje přítomnost ROS (Fuchs a kol., 2007).

Role NETs během nádorové progresie je stále špatně pochopená a málo vysvětlená. Schopnost indukovat tvorbu neutrofilních extracelulárních sítí byla potvrzena u mnoha typů nádorů. Je to nejspíše díky tomu, že NETs hrají významnou roli v samotné biologii nádoru. Podle různých studií je možné, že NETs podporují proliferaci primárního nádoru, avšak žádné studie prozatím nepotvrdily mechanismus, jakým by NETs tuto proliferaci podporovaly (Demers a kol., 2012 a Ho-Tin-Noe a kol., 2009). V souladu s tím, jsou NETs odpovědné za vznik mikroprostředí, které zachycuje patogeny. Což znamená, že nádorové buňky jsou zachyceny a vystaveny velkému množství lokálních biologicky aktivních peptidů, které upřednostňují interakci, což může napomáhat jejich proliferaci a uvolnění z primárního nádoru a inhibovat apoptózu (Zhou a kol., 2003 a Fuchs a kol., 2012).

V kontrastu s tímto tvrzením je předpoklad, že mohou mít i protinádorový charakter. Toto tvrzení je založeno na předpokladu přímého ničení nádorových buněk a aktivace imunitního systému. U několika komponent, ze kterých se NETs skládají, bylo prokázáno, že jsou pro nádory toxické. Například MPO zabíjí B-16 melanomové buňky a inhibuje jejich růst po implikaci do myši (Odajima a kol., 1996). Dalším příkladem je schopnost NETs zabít aktivované endoteliální buňky (Gupta a kol., 2012) nejspíše pomocí histonů a porušením cév, přivádějících do nádoru krev (Saffarzadeh a kol., 2012).

2.4 Nádorová terapie s použitím bakterií:

Ukazuje se, že vrozená imunita má velmi úzký vztah k nádorovým onemocněním. Tento vztah je složitý a často dvojsečný, pro- i protinádorový. Nicméně již velmi dlouho je studován vliv vrozené imunity v protinádorové terapii. Jedním z mechanismů je stimulace nádorové imunity pomocí bakterií.

Použití bakterií v protinádorové terapii bylo známo již před 150 lety. Prvně popsali regresi tumoru u pacienta po bakteriální infekci *Streptococcus pyogenes* němečtí doktoři W. Bush a F. Fehleisen (Oelschlaeger, 2010).

Koncem 19. století si americký doktor William Coley všiml, že jeho pacientovi, který trpěl rakovinou krku, se po infekci erysipelas zlepšil stav. Jako první pak zdokumentoval použití bakterií a jejich toxinů při léčbě koncového stadia rakoviny. Na konci 19. století vyvinul vakcínu, která se skládala z dvou zabitých druhů bakterií – *Streptococcus pyogenes* a *Serratia marcescens*. Pomocí této vakcíny simuloval infekci

s průvodní horečkou bez rizika skutečné infekce (Wiemann a Starnes, 2002). Tento toxin byl úspěšně používán při léčbě sarkomů, karcinomů, lymfomů, melanomů a myelomů. Tato vakcína působí na úrovni imunologické.

Další agens použitelná pro imunoterapii nádoru je *Mycobacterium bovis* Bacillus Clamette-Guérin (BCG). Kostra buněčné stěny těchto bakterií byla použita v různých případech rakovinotvorného onemocnění (Hayashi, 2009). V roce 2010 Yuk a kol. zjistili, že velmi dobré výsledky přináší kombinace BCG/CWS a ionizujícího záření. Konkrétně, pomocí BCG/CWS došlo ke zvýšení senzitivity na ionizující záření u buněk rakoviny tlustého střeva (Yuk a kol., 2010).

Imunoterapie, používaná doktorem Coleyem, odstartovala další testování různých bakterií jako protinádorových agens. Bylo zjištěno, že určité druhy anaerobních bakterií, jako je rod *Clostridium*, jsou schopné také působit protinádorově, avšak za jiných podmínek, na úrovni ataku nádorů fakultativně anaerobními bakteriemi na základě výskytu nižší tenze kyslíku v nich.

Fakultativně anaerobní bakterie jsou schopné prosperovat a žít se nádorovou tkání, která je málo zásobená kyslíkem, zatímco pokud se dostanou do kontaktu s okysličeným místem tumoru, uhynou (Malmgren a Flanigan, 1955). Problém byl, že patogenní druh *Clostridium tetani* byl schopný se dostat i mimo tumorovou tkáň vyvolat onemocnění až smrt (Malmgren a Flanigan, 1955). Proto se začalo uvažovat o použití nepatogenních kmenů bakterií. Avšak aplikace nepatogenních kmenů, jako *Clostridium butyricum*, neprokázala terapeutický účinek (Carey a kol., 1967). I další anaerobní bakterie byly testovány, zda nemají protinádorový efekt. Výrazný terapeutický efekt vykazala bakterie *Clostridium novyi*, ale opět vyvolala onemocnění a smrt. Proto se přistoupilo k testování upravené bakterie *Clostridium novyi-NT* bez letálního toxinu. *Clostridium novyi-NT* se často používá v kombinaci s radioterapií, imunoterapií či dalšími chemoterapiemi v experimentech (Dang a kol., 2001).

Salmonella typhimurium je používána ve své atenuované formě, zbavená genů *msbB* a *purI*, které způsobují její cytotoxicitu a závislost na vnějším zdroji purinu (VPN 20009). Tato závislost znemožňuje bakterii množit se v normálních tkáních, ale umožňuje jí se množit v nádorech, kde je volný purin k dispozici. Mimo toto, tato bakterie má schopnost růst jak v anaerobních tak aerobních podmínkách a díky tomu může kolonizovat i malé metastázy (Toso a kol., 2007).

Většina anaerobních bakterií, vytváří také vysoce odolné spóry, které jsou schopné

přežít nepříznivé podmínky (prostředí s vysokým obsahem kyslíku), kde se nemnoží a nerostou. Jakmile se však dostanou do příznivých podmínek, například vnitřní prostředí tumoru, spóry vyklíčí a bakterii se daří, což je ideální pro nádorový targeting (Diaz a kol., 2005).

Bakterie mohou být při léčbě tumorů využity také jako vektory pro genovou terapii. Například nevirulentní a vysoce imunogenní kmen *Salmonella typhimurium* X4550 je používána jako vektor pro interleukin 2 (IL-2). Dochází tak k aktivaci imunitního systému proti malignitám v játrech (Saltzman a kol., 1996).

Při léčbě tumorů mohou být využity i bakteriální toxiny. Například Diphtheria toxin se přes metabolickou kaskádu aktivuje na funkční fragment. Tento proces pak vede k inhibici syntézy proteinů, což může vyústit v následnou lýzu buňky či zahájení apoptózy (Louie a kol., 1997 a Frankel a kol., 2002).

2.5. Substance použité při terapii myši C57/BL6N v diplomové práci

2.5.1 *Stenotrophomonas maltophilia*

Stenotrophomonas maltophilia je gram-negativní bakterie, která způsobuje nosokomiální infekce.

Stenotrophomonas maltophilia je jediným zástupcem rodu *Stenotrophomonas*. Tento rod navrhli v roce 1993 Palleroni a Bradbury, aby došlo ke správnému taxonomickému zařazení (Palleroni a Bradbury, 1993). Hugh izoloval *Stenotrophomonas maltophilia* v roce 1958 po orofaryngeálním výtěru z pacienta trpícím karcinomem úst (Hugh a Leifson, 1963).

Stenotrophomonas maltophilia je velká přibližně 0,5 – 2,5 μm dlouhá a nevytváří spóry. Tato bakterie má polární rozvětvený bičík a je striktně aerobní (Hugh a Leifson, 1963).

Zajímavou vlastností bakterií *Stenotrophomonas maltophilia* je, že při fyziologickém pH jsou kladně nabitá, což umožňuje její adhezi na záporně nabitě povrchy, jako je například sklo či ocel. Touto vlastností se *Stenotrophomonas maltophilia* značně liší od ostatních bakterií, jejichž náboj při fyziologickém pH je negativní (Jucker a kol., 1996). Izelektrický bod *Stenotrophomonas maltophilia* je IPE = 11 (Jucker a kol., 1996).

2.5.2 *Serratia marcescens*

Serratia marcescens je gram-negativní bakterií, která patří do čeledi Enterobacteriaceae. Původně byla tato bakterie klasifikována jako nepatogenní saprofytická bakterie, žijící ve vodě a půdě. K odhalení *Serratia marcescens* jako původce nosokomiálních infekcí a případných úmrtí, došlo v druhé polovině 19. Století (Hejazi a Falkiner, 1997).

Serratia marcescens je oportunní bakterie, která způsobuje infekce u imunokompromitovaných jedinců (Grimont a Grimont, 2006).

Serratia marcescens má typicky červené zbarvení svých kolonií. Za toto zbarvení je zodpovědný nedifuzibilní červený pigment Prodigiosin, který je sekundárním produktem enzymatické kondenzace, probíhající v bakterii (Green a Williams, 1957). Optimální teplota pro růst této bakterie je 30°C, a roste při pH od 5.0 do 11.0 (Hardjito a kol., 2002).

Serratia marcescens má na svém povrchu negativní náboj (Dickson a Koohmaraie, 1989). Isoelektrický bod této bakterie je IPE = 3,9 (Van der Mei a kol., 1992).

2.5.3 *Borrelia burgdorferi*

Borrelia burgdorferi je bakterií, která způsobuje Lymskou boreliózu přenášenou klíšťaty. V současnosti je známo více druhů původce Lymské boreliózy – *Borrelia burgdorferi* sensu lato, a to například *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* a *Borrelia afzelii* (Picken a kol., 1998).

Borrelia burgdorferi je spirochetou. (Charon a kol., 1992) Velikost spirochet se pohybuje v rozmezí od 4 do 30 μm. Na každé z nich je v průměru umístěno 7 perismatických bičků. *Borrelia burgdorferi* je kataláza pozitivní a mikroaerofilní (Russel a kol., 1984).

Bakterie je gram-negativní a dobře barvitelná Giemsou a Warthin-Starry barvením. Bakterie jsou viditelné pouze v mikroskopu s černým polem nebo ve fázově kontrastním mikroskopu. Optimální teplota pro růst *Borrelie burgdorferi* je 34 – 37°C (Barbour a kol., 1983).

V *Borrelia burgdorferi* nebyla prokázána přítomnost klasického enterobakteriálního lipopolysacharidu (LPS). Za tento jev je zodpovědná především absence volného lipidu A (Takayama a kol., 1987). Avšak obsahuje LPS-like substance (Schwarzová a Čižnár, 2004).

Borrelia burgdorferi sensu stricto, používaná v našem pokusu, se vyskytuje v Severní Americe a i v Evropě, nevyskytuje se však v Asii. V Americe existuje pouze jeden genotyp *Borrelie burgdorferi* sensu stricto, zatímco v Evropě je její výskyt podmíněn velkou genetickou variabilitou (Picken a kol., 1998).

Kromě imunomodulace imunitní odpovědi pomocí bakterií byly v diplomové práci testovány i další sloučeniny, které měly za úkol podpořit redukci nádorového růstu. Těmito sloučeninami byly manan, fMLF a resiquimod.

2.5.4 Manan

Manan je základní složkou stěny kvasinek. Je to velmi rozvětvený polysacharid a skládá se hlavně z D-manózy. Skladby mananu je následující: postranní řetězce se vážou stylem α -(1 \rightarrow 2) a α -(1 \rightarrow 3) k hlavnímu řetězci, který je spojen vazbami α -(1 \rightarrow 6) (Jones a Ballou, 1969). Manóza je umístěná na redukujícím konci hlavního řetězce (Jones a Ballou, 1969).

Manan obvykle obsahuje ve své struktuře fosfor a dusík. Fosfor je začleněn v oligosacharidech obsahujících fosfor a dusík v hexoaminech a proteinech (Jones a Ballou, 1969). Buňky vrozené imunity rozpoznávají manan pomocí manan binding lektinu a pomocí manózového receptoru.

2.5.4.1 Receptory rozpoznávající manan

2.5.4.1.1. Manóza-binding lektin (MBL)

MBL je sérový protein, který se tvoří v játrech. Tento protein se váže za přítomnosti Ca^{2+} iontu na manózu a N-acetylglukosamid na povrchu kvasinek, gram-negativních bakterií či jiných buněk (Matsushita a Fujita, 1992). Tento protein je syntetizován jako monomer, který má doménu rozpoznávající C-terminální karbohydrát, vrchní oblast a kolagenovou oblast. CRD oblast se skládá z pěti skládaných listů, dvou α -helikálních a čtyřech rozšířených šroubovic. Protein se syntetizuje v podobě monomerů. Monomery formují trimery a trimery se shromažďují do oligomerů. Hexamer z trimerů pak představuje nejvyšší uspořádání (Epstein a kol., 1996). Manóza-binding protein patří do rodiny kolektinů, které jsou charakterizovány tím, že mají jak lektinovou tak kolagenovou doménu (Reid a Turner, 1994).

MBL může aktivovat komplement pomocí lektinové cesty. Specifická pro MBL je cesta přes serinové proteázy MASP-1 a MASP-2 (mannose-binding protein associated

serine proteases). Navázání vede k rozštěpení komplementových složek C4 a C2 (Thiel a kol., 1997, a Matsushita a Fujita, 1992).

2.5.4.1.2 Manóзовý receptor

Manóзовý receptor je transmembránový glykoprotein velký 175 kDa. Je exprimován na makrofázích, dendritických buňkách a nevasculárních endotelových buňkách (Takahashi a kol., 1998).

Receptor se skládá z 5 domén: aminoterminální, extracelulární oblast bohatá na cystein; doména obsahující opakující se fibronectin typu II; doména rozpoznávající osmi členný tandem lektinu podobných karbohydrátů; transmembránová doména a intracelulární karboxy-terminální konec (Maureen a kol., 1990, a Harris a kol., 1992).

Ektodoména manóзовého receptoru má 8 karbohydrát rozpoznávajících domén, které rozpoznávají vzorce cukru, které jsou na povrchu různých bakterií, kvasinek, parazitů, hub a manozylovaných ligandů (Takahashi a kol., 1998).

2.5.5.N-Formyl-methionyl-leucyl fenylalanin (fMLF)

Neutrofilové představují asi 50 – 60% leukocytů, které cirkulují v krvi, a jsou vysoce specializované pro jejich primární funkci, kterou je fagocytóza a destrukce mikroorganismů přes vytváření superoxidového anionu a uvolňování granulí obsahující proteázu. Správné zacílení leukocytů je závislé na lokálně uvolňovaných chemotaktických faktorech. Bakteriální peptid N-formyl-methionyl-leucyl-fenylalanin (fMLF) je jedním z chemotaktických faktorů a je vysoce zdatným chemoatraktantem leukocytů (Hayashi a kol., 2013).

fMLF interaguje s receptory na povrchu neutrofilů a aktivuje neutrofilové pomocí drah spřažených s G-proteinem (Hayashi a kol., 2013).

fMLF a jiné peptidy začínající formylmethioninem jsou rozeznávány formyl peptidovými receptory.

2.5.5.1 Formyl peptidové receptory (FPR)

N-formyl peptidové receptory jsou transmembránové receptory, které obsahují sedm hydrofobních transmembránových domén (Gao a Murphy, 1993).

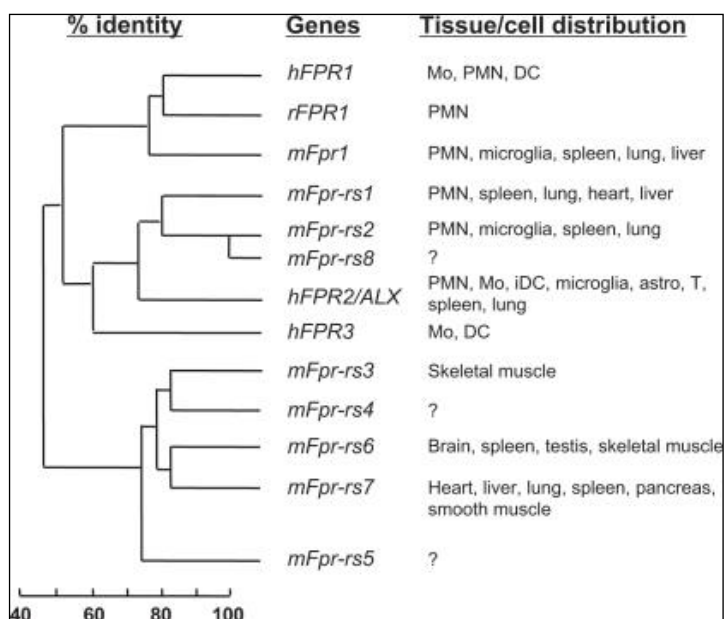
FPR jsou převážně na leukocytech, ale mohou být přítomny i na jiných buňkách, jako jsou nezralé dendritické buňky, krevní destičky, fibroblasty a mikrogliaální buňky (Migeotte a kol., 2007).

Máme tři různé druhy lidských formyl peptidových receptorů: FPR1, FPR2/ALX,

FPR3, geny pro formyl peptidové receptory jsou uloženy na chromosomu 19q13.3., všechny sdílí poměrně velké oblasti homologie (Ye a kol., 2009).

U myši bylo zjištěno 8 formyl peptidových receptorů (mfpr). Při srovnání lidských a myších FRP bylo zjištěno, že homology lidských a myších rodin sdílejí dva genové klastry. Lidský hFRP1 a myši mfrp1 sdílení až 77% homologii, zatímco hFRP2 s mfrp2 přibližně 76% homologii. Srovnání homologie u lidských, myších a králičích formyl peptidových receptorů je na obrázku č. 2 (Gao a kol., 1998).

Rozpoznání fMLF a dalším molekul začínajících na formylmethionin pomocí FRP vede k chemotaxi, aktivaci těchto buněk i ke stimulaci fagocytózy (Hayashi a kol., 2013).



Obr. 2: Srovnání homologií u lidských, myších a králičích formyl peptidových receptorů (Gao a kol., 1998).

2.5.6 Resiquimod (R848)

Resiquimod známý také jako R848 je členem velké imidazoquinolinové rodiny a funguje jako modifikátor imunitní odpovědi. Tato látka je schopná aktivovat imunitní odpověď tím, že indukují cytokiny a to především INF- α a IL-12. Tyto cytokiny jsou pak ve velkém zodpovědné za stimulaci monocytů, makrofágů a dendritických buněk (Tomai a kol., 1995).

Některé imunologicky aktivní látky bylo, jak bude dále rozvedeno, nutno kotvit k nádorovým buňkám. K těmto účelům byly použity níže uvedené látky.

2.5.7 Látky používané k ukotvení léčivých substancí na molekuly:

2.5.7.1 Succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate (SMCC)

SMCC je nerozštěpitelný a membránově propustný agens, který je schopný tvořit příčnou vazbu. Obsahuje amin-reaktivní N-hydroxysuccinimidovou (NHS ester) a sylvhydriyl-reaktivní maleimidovou skupinu. Při pH 7-9, reaktivní skupiny NHS esterů reagují s primárními aminy za vzniku stabilní amidové vazby. Při pH 6,5-7,5 reagují maleimidové skupiny a vytváří stabilní thioesterové vazby (Thermo Fisher Scientific Inc. Rockford, IL).

2.5.7.2 Tris (2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride (TCEP-HCl)

TCEP-HCl je látka, která je vysoce účinná v redukování proteinů a peptidických disulfidických vazeb při pokojové teplotě při nižším pH, a to od pH 1,5 – pH 8,5, kdy i při pH 1,5 je plně funkční (Han a Han, 1994), což koresponduje s pH nádoru. pH uvnitř nádoru je kyselejší a pohybuje se v rozmezí pH 5,8 až pH 7,6, na rozdíl od normální okolní tkáně, jejíž hodnota pH je v rozmezí pH 7,00 – pH 8,06 (Tannock a Rotin, 1989).

Tato látka redukuje dokonce alkylové disulfidy. TCEP je rezistentní vůči oxidaci na vzduchu (Thermo Fisher Scientific Inc. Rockford, IL).

2.5.7.3 Biocompatible Anchor for Cell Membrane (BAM)

BAM obsahuje olejovou skupinu, která slouží jako kotva do hydrofobní buněčné membrány a polyethylenglykol (PEG), který zvyšuje hydrofilní vlastnosti sloučeniny. Reaktivní skupiny jsou umístěné na koncích PEG řetězců, což jim umožňuje vázat fyziologicky aktivní látky (interakce s NH₂ skupinou) nebo vázání na povrchy různých materiálů (NOF Corporation, 2015).

V in vitro pokusech byla použita látka pro inhibici neutrofilních extracelulárních sítí, a to Cl-amidin.

2.5.8 Cl-amidin

Tvorba neutrofilních sítí je podmíněna dekonzenzováním chromatinových struktur. Histonová hypercitrulinace, která souvisí s dekonzenzací chromatinu, je katalyzována peptidylarginine deiminázou 4 (PAD 4) během procesu formování NETs (Li a kol., 2010). Cl-amidine je chemická látka, která funguje jako inhibitor peptidylarginin deimináz, včetně PAD 4, čímž brání samotnému vzniku NETs (Bicker a kol., 2013).

3. Cíle práce

- Definovat vhodnou bakterii pro nádorovou imunoterapii.
- Objasnit množství vhodné bakterie pro efektivní použití.
- Inhibovat tvorbu neutrofilní extracelulární sítě za účelem ověření role neutrofilů a tvorby těchto sítí během imunitního zásahu na nádorové buňky.

4. Materiál a metody:

4.1 Použité chemikálie:

- BAM (Biocompatible Anchor for Cell Membrane (NOF EUROPE))
- Cl-amidin (Merck)
- DMSO (Sigma Aldrich)
- EDTA - kyselina ethylendiamintetraoctová (Sigma Aldrich)
- FCS - bovinní fetální sérum (HyClone)
- fMLF (Sigma Aldrich)
- GM-CSF (Sigma Aldrich)
- Krevní agar (P-Lab a.s., Česká republika)
- Laminarin z *Laminaria digitata* (Sigma Aldrich)
- Lipopolysacharid (LPS) z *Escherichia coli* (Sigma Aldrich)
- MACS - Neutrophil Isolation Kit Mouse (Miltenyi Biotec)
- Manan ze *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma Aldrich)
- Resiquimod (R-848) (TOCRIS)
- RPMI 1640 (Sigma Aldrich)
- SMCC (Thermo Scientific)
- TCEP (Thermo Scientific)
- TNF α (Sigma Aldrich)
- Trypanová modř (Sigma Aldrich)
- Trypsin (Sigma Aldrich)
- Králičí sérum (Sigma Aldrich)
- BSKH medium (Sigma Aldrich)

4.2 Laboratorní zvířata

Pro pokusy byly použity myši C57BL/6N, pouze samice. Myši byly dodány firmou Charles River Laboratories. Myši byly v zahájení pokusu staré 8 týdnů, s váhou 18-20 g. Myši byly chovány za standartních podmínek při fotoperiodě 12/12 a měly neomezený přístup k vodě a granulované potravě.

4.3 Bakterie a buněčná linie

V pokusech byly použity buňky *Stenotrophomonas maltophilia* kmen CCM 1640, a *Serratia marcescens* kmen CCM 303, získané z České sbírky mikroorganismů (Brno), které byly kultivované při 37°C na krevním agaru.

Dále byly použity bakterie *Borrelia burgdorferi* sensu stricto B31, americký referenční kmen. Bakterie byly pěstovány na BSKH mediu s 6% králičím sérem. Tyto bakterie byly pěstovány na Parazitologickém ústavu Biologického centra AV ČR, České Budějovice.

V pokusech byly použity buňky myšího melanomu B16-F10, které byly věnovány darem prof. Říhovou z Mikrobiologického ústavu AV ČR, Praha. Buňky byly kultivovány v RPMI 1640 a 10% přidavkem bovinního séra (FCS), s přidavkem antibiotik 1%, glutaminu 1% a merkaptoethanolu 0,5%. Kultivace probíhala v termostatu při teplotě 37°C v atmosféře nasycené vodními parami obsahující 5% oxidu uhličitého.

4.4 Příprava buněk myšího melanomu B16-F10 pro *in vivo* a *in vitro* experimenty

Z kultivační nádoby s narostlými B16-F10 buňkami se nejprve odstranilo médium. Buňky se propláchly sterilním fyziologickým roztokem (PBS) celkově 3x. Po propláchnutí byla provedena trypsinizace s použitím 0,5 ml směsi, která obsahovala 0,02% trypsin a 0,02% EDTA v PBS. Buňky byly vloženy do termostatu a inkubovány 2-4 minuty při 37°C, dokud nedošlo k uvolnění adherovaných buněk. Po jejich uvolnění došlo k zastavení trypsinizace přidáním média RPMI 1640 s 10% FCS a buňky byly rozvolněny pomocí Pausterovy pipety. Následovala centrifugace 10 minut při 150 g a 4°C. Buněčný pelet byl rozsuspenzován v požadovaném médiu. Vzorek suspenze byl smísen 1:1 s trypanovou modří a pomocí Bürkerovy komůrky byl stanoven počet buněk a jejich životnost.

4.5 Transplantace nádorových buněk

Před transplantací myších melanomových buněk B16-F10 bylo potřeba myši oholit na pravém boku přibližně do poloviny zad. Do tohoto místa pod kůži bylo poté aplikováno pomocí injekčních stříkaček 0,1 ml suspenze buněk melanomu B16-F10 v RPMI 1640 bez séra obsahující 400 000 buněk.

4.6 Měření velikosti nádoru

Nádory byly měřeny v době probíhání pokusu. Pro měření velikosti nádoru byl použit speciální kaliper. Byl měřen největší rozměr nádoru, hodnota A, a nejmenší rozměr nádoru (výška nádoru směrem od těla), hodnota B. Výsledný objem nádoru byl z těchto hodnot vypočítán pomocí vzorce $V = \pi/6 AB^2$ (Inaba a kol., 1986).

4.7 Průměrná redukce nádorového růstu

Průměrná redukce nádorového růstu ve srovnání s kontrolní skupinou byla vypočítána podle následujícího vzorce:

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

průměrný objem nádoru v kontrolní skupině

Průměrná redukce (%) byla spočtena pro 4., 6., 8., 10., 12. a 14. den terapie. Z těchto hodnot byla vypočtena průměrná hodnota, která udává v procentech průměrnou redukci nádorového růstu.

4.8 Počítání metastáz v plicích

Plíce byly myším vyjmuty a prohlédnuty pod binolupou. Na plicích byla spočítána metastatická ložiska, které se jeví jako černé tečky různých velikostí. (Vetvicka a kol., 2007)

4.9 Sonikace

Daná suspenze byla ozvučována 10 x 10 s v ledové lázni. Po každém ozvučení byla suspenze schlazena na 20 s. K sonikaci byl použit sonikátor HIELSCHER VP200S.

4.10 Izolace neutrofilů z kostní dřeně

Z usmrcené myši byly sterilně vyjmuty stehenní a holenní kosti. Kosti byly opláchnuty v izopropanolu a vloženy do Petriho misky s připraveným RPMI 1640 s 10% FCS s přidavkem antibiotik 1%, glutaminu 1% a merkptoethanolu 0,5%. Opatrně byly odstříhány hlavice kostí na obou stranách kosti a kost propláchnuta připraveným médiem RPMI 1640 s 10% FCS s přidavkem antibiotik 1%, glutaminu 1% a merkptoethanolu 0,5%, čímž byla kostní dřev vytažena do média. Kostní dřev byla rozsuspenzována v médiu pomocí pipety, poté přefiltrována přes BD filtr (Falcon, 70 μm). Buňky kostní dřevě byly spočítané v Bürkerově komůrce pomocí trypanovy modři v poměru 1:1. Buňky

byly centrifugovány na 10 minut při 150 g. Poté byly buňky převedeny do kultivačního média podle potřeby.

4.11 Přečištění neutrofilů pomocí imunomagnetické separace

Pro imunomagnetické přečištění neutrofilů byl použit systém negativní sorbce MACS Miltenyi Biotec Neutrophil Isolation Kit Mouse. Nejprve bylo potřeba připravit buffer smícháním PBS s 2% FCS a s 2mM EDTA v množství 48,8 PBS, 1 ml 2% FCS a 200 μ l 2mM EDTA na 50 000 000 buněk. Samotná magnetická separace byla provedena přes kolonku LS Columns MACS (Miltenyi Biotec GmbH) a podle pokynů v návodu dodávaného společně s kitem MACS Miltenyi Biotec Neutrophil Isolation Kit mouse.

4.12 Primování neutrofilů

4.12.1 Primování neutrofilů pro použití s fMLF jako ligandem

Neutrofilily byly primovány pomocí GM-CSF a TNF α . K vyizolovaným a přečištěným neutrofilům bylo přidáno GM-CSF na výslednou koncentraci 12 ng/ml a TNF α na výslednou koncentraci 2,5 ng/ml. Tato směs byla inkubována 20 minut.

4.12.2 Primování neutrofilů pro použití s mananem jako ligandem

Neutrofilily byly primovány pomocí GM-CSF, TNF α stejně jako v předchozím bodě, primovací směs ale v tomto případě obsahovala navíc volný laminarin (výsledná koncentrace byla 2 mikromolární).

4.13 Příprava terapeutických látek

4.13.1 Příprava manan-BAM

K přípravě této látky bylo nejprve potřeba aminovat manan pomocí redukční aminace (Torosantucci a kol. 2005). Tato redukční aminace byla provedena tak, že došlo k redukci mananu v prostředí octanu amonného pomocí kyanoborohydridu sodného po dobu 5 dnů při teplotě 50°C a pH 7,5. Po uplynutí doby redukce byla přes noc provedena dialýza v dialyzační hadici o MWCO 3500 proti PBS při 4°C. Navázání molekuly BAM na aminoskupinu bylo provedeno podle Kato a kol. (2004) při pH 7,3. Směs byla poté dialyzována přes noc za stálého míchání v dialyzační hadici o MWCO 3500 proti PBS při teplotě 4°C. Výsledkem byl 0,2 mM roztok manan-BAM v PBS.

4.13.1.1 Příprava manan-SMCC v PBS

K přípravě této látky byl nejprve výše popsaným způsobem připraven aminovaný manan. Poté bylo k mananu-NH₂ přidáno ekvimolární množství SMCC rozpuštěné v DMSO. Proběhla inkubace 40 minut při pokojové teplotě. Na aminoskupinu mananu se navázal SMCC a koncentrace vzniklého manan-SMCC byla upravena na 0,2 mM, roztok byl v PBS.

4.13.2 Kultivace *Stenotrophomonas maltophilia*

Nejprve bylo potřeba rekonstituovat lyofilizát *Stenotrophomonas maltophilia* v PBS. Materiál byl vyset na krevní agar a probíhala kultivace přes noc při 37°C. Kolonie *Stenotrophomonas maltophilia* byly sklizeny a zamraženy v PBS při teplotě -70°C. Před prvním použitím byly bakterie ozářeny UV zářením po dobu 20 minut. Suspenze ostře stočena 10 minut při 10 000 g při 4°C a rozsuspenzována v požadovaném roztoku.

4.13.2.1 Příprava suspenze *Stenotrophomonas maltophilia* v PBS

Stenotrophomonas maltophilia získaná výše uvedeným způsobem byla rozsuspenzována v PBS na požadovanou koncentraci 500 milionů bakterií *Stenotrophomonas maltophilia* na 1 ml či 1000 milionů bakterií *Stenotrophomonas maltophilia* na 1 ml.

4.13.2.2 Příprava suspenze *Stenotrophomonas maltophilia* v roztoku manan –BAM

Stenotrophomonas maltophilia získaná výše uvedeným způsobem byla rozsuspensována ve směsi 0,2 mM roztoku manan-BAM v PBS na koncentraci 500 milionů bakterií na 1 ml.

4.13.3 Kultivace *Serratia marcescens*

Nejprve bylo potřeba rekonstituovat lyofilizát *Serratia marcescens* v PBS. Materiál byl vyset na krevní agar a probíhala kultivace přes noc při 37°C. Kolonie *Serratia marcescens* byly sklizeny a zamraženy v PBS při teplotě -70°C. Před prvním použitím byla suspenze bakterie *Serratia marcescens* ozářená po dobu 60 minut pod UV zářením. Pro upravení koncentrace na výslednou koncentraci 500 milionů bakterií na 1 ml či 1000 milionů bakterií na 1 ml bylo použito PBS.

4.13.3.1 Příprava suspenze *Serratia marcescens*-SMCC

K suspenzi bakterií *Serratia marcescens* získané výše popsáním způsobem bylo přidáno PBS a SMCC rozpuštěné v DMSO (nadbytečné množství, nezreagované činidlo zhydrolyzuje). Vzniklá suspenze byla inkubována 40 minut při pokojové teplotě. Pro upravení koncentrace bylo použito PBS. Následovala dialýza přes noc za stálého míchání v dialyzační hadici o MWCO 3500 oproti PBS při teplotě 4°C. Výsledkem byla suspenze *Serratia marcescens*-SMCC připravená o koncentrací 500 milionů bakterií na 1 ml či o koncentraci 1000 milionů bakterií na 1 ml.

4.13.4 Příprava suspenze *Borrelia burgdorferi*:

K sonikované suspenzi *Borrelia burgdorferi* v PBS s množstvím proteinu na 2,8 mg/ml bylo přidáno PBS, aby bylo dosaženo požadované koncentrace. Vznikla tak výsledná suspenze bakterie *Borrelia burgdorferi* o koncentraci 0,5 mg proteinu v 1 ml.

4.13.4.1 Příprava suspenze *Borrelia burgdorferi*-SMCC

K sonikované suspenzi *Borrelia burgdorferi* v PBS s 2,8 mg proteinu/ml bylo přidáno PBS a SMCC rozpuštěné v DMSO (nadbytek, nezreagované činidlo zhydrolyzuje). Směs byla inkubována 40 minut při pokojové teplotě. Vznikla tak suspenze *Borrelia-burgdorferi*-SMCC o koncentraci 0,5 mg proteinu na 1 ml.

4.13.4.2 Příprava suspenze *Borrelia burgdorferi*-SMCC v roztoku manan-SMCC

K sonikované suspenzi *Borrelia burgdorferi* v PBS s 2,8 mg proteinu/ml byl přidán roztok manan-SMCC v PBS a SMCC rozpuštěné v DMSO. Vzniklá směs byla inkubována 40 minut při pokojové teplotě. Po inkubaci vznikla výsledná suspenze *Borrelia burgdorferi*-SMCC s 0,5 mg proteinu/ml v 0,2 mM mananu-SMCC.

4.14 Příprava Resiquimodu.HCl (R848.HCl)

Z R848 byl připraven nejprve pomocí ekvivalentu HCl hydrochlorid (zvýšení rozpustnosti). Ten byl následně rozpouštěn v PBS či roztoku manan-BAM dle potřeby.

4.14.1 Příprava roztoku Resiquimodu v 0,2 mM manan-BAM

R848.HCl připravený výše byl rozpuštěn v 0,2 mM roztoku mana-BAM v PBS na výslednou koncentraci 0,5 mg/ml roztoku.

4.15 Statistické zpracování dat

Ke zpracování dat byly využívány programy Microsoft Office, Microsoft Excel a Microsoft Word. Ke statistickému zpracování byl používán program STATISTICA 12, a to konkrétně ANOVA, One Way s Tuckey post-hoc testem. Ke statistickému zpracování úhynů myši byl použit test analýzy přežití Log-rank v programu STATISTICA 12.

4.16 Pokus č. 1: Studium vlivu dávky *Stenotrophomonas maltophilia* a *Serratia marcescens* na redukci nádorového růstu, pulzní terapie

V pokuse bylo použito 30 myši typu C57BL/6N. Myšim bylo injekčně transplantováno 400 000 buněk myšního melanomu B16-F10. Dvanáctý den po aplikaci byla započata léčba. Myšim bylo intra tumorálně aplikována dávka 50 μ l léčiva v intervalech 0., 1., 2. ... 8., 9., 10. ... 16., 17., 18. ... 24., 25., 26. den od zahájení terapie. V den 0 byla změřena velikost nádoru. Měření velikosti nádoru, která se opakovala každý druhý den, byla zaznamenána a vyhodnocena.

Terapeutika používaná u jednotlivých skupin:

- Skupina A: *Stenotrophomonas maltophilia* 1000 mil/ ml PBS
- Skupina B: *Stenotrophomonas maltophilia* 500 mil/ml PBS
- Skupina C: *Serratia marcescens* 1000 mil/ml PBS
- Skupina D: *Serratia marcescens* 500 mil/ml PBS
- Skupina K: kontrolní PBS

Po ukončení terapie byla sledována délka přežití jednotlivých myši.

4.17 Pokus č. 2: Studium vlivu volných bakterií *Serratia marcescens* a kovalentně kotvených *Serratia marcescens*-SMCC na redukci nádorového růstu, pulzní režim

V pokuse bylo použito 18 samic myši C57BL/6N, každé z nich bylo injekčně transplantováno 400 000 buněk myšního melanomu B16-F10 v 0,1 ml RPMI bez séra. Dvanáctý den od transplantace nádorových buněk byly myši rozděleny do tří skupin A, B, K po šesti myších. Tentýž den byla zahájena terapie. Myšim byla podávána terapeutika intratumorální (*i. t.*) aplikací v množství 50 μ l v pulzech 0.,1.,2. a 8.,9.,10. den od zahájení terapie. U skupiny A (*Serratia marcescens*-SMCC) bylo hodinu před aplikací terapeutické látky injikováno do nádoru 50 mikrolitů 50 mM roztoku TCEP-HCl. V den 0 byla změřena velikost nádoru, která byla každý druhý den přeměřována, získané hodnoty byly zaznamenány a zpracovány.

Terapeutika použitá u jednotlivých skupin:

- Skupina A: TCEP, po 60 minutách *Serratia marcescens*-SMCC 500 mil/ml PBS
- Skupina B: *Serratia marcescens* 500 mil/ml PBS
- Skupina K: kontrolní PBS

Po ukončení léčby byla sledována délka přežití jednotlivých myší

4.18 Pokus č. 3: Studium vlivu kovalentně vázané *Borrelia burgdorferi*, kovalentně vázaného mananu a jejich kombinace na redukci nádorového růstu, pulzní režim

V pokuse bylo použito 20 myší C57BL/6N. Každé z nich bylo injekčně aplikováno 400 000 melanomových buněk B16-F10 v 0,1 ml RPMI bez séra. Dvanáctý den od transplantování nádorových buněk byly myši rozřazeny do 4 skupin: A, B, C a K. Týž den byla zahájena terapie. Myším bylo podáváno intratumorálně 50 µl terapeutika v pulzech 0., 1., 2. a 8., 9., a 10. den od zahájení terapie. Nejprve jim byla aplikována látka pro kovalentní navázání 50 mikrolitů 50 mM roztoku TCEP-HCl, po 60 minutách jim byla aplikována druhá, terapeutická látka. V den 0 byla změřena velikost nádoru, měření se opakovala každý druhý den a získané hodnoty byly zaznamenány a zpracovány.

Terapeutika použitá u jednotlivých skupin:

- Skupina A: TCEP, po 60 minutách *Borrelia burgdorferi*-SMCC v PBS
- Skupina B: TCEP, po 60 minutách 0,2 mM manan-SMCC v PBS
- Skupina C: TCEP, po 60 minutách *Borrelia burgdorferi*-SMCC 0,2 mM manan-SMCC v PBS
- Skupina K: kontrolní PBS

Po ukončení léčby byly myši usmrceny pomocí cervikální dislokace a byly jim vyjmuty plíce, kdy bylo spočítáno množství metastází.

4.19 Pokus č. 4: *In vitro* stanovení vlivu inhibice NETs na cytotoxické působení neutrofilů na melanomové buňky s vázaným f-MLF

Pro tento pokus byly použity dvě myši C57BL/6N, ze kterých byly vyizolovány neutrofilové buňky a nádorové buňky typu B16-F10. Pro pokus byla použita U destička, 96 jamková.

Nejprve byla provedena izolace neutrofilů z kostní dřeně myší. Neutrofilové buňky byly přečištěny pomocí magnetické separace a došlo ke sklizení nádorových buněk. Neutrofilové buňky byly naředěny tak, aby byla výsledná koncentrace 2,5 milionů neutrofilů na 1 ml. Nádorové buňky byly naředěny tak, aby bylo dosaženo koncentrace 1 milion nádorových buněk v 1 ml. Dále byl připraven roztok ligandu 0,1 mM f-MLF-BAM v RPMI s 10%

FCS.

Byla použita destička s U dnem a bylo pracováno v tripletech. Nejprve bylo provedeno kotvení f-MLF-KK-BAM na nádorové buňky (100 000 B16-F10/jamka, 0,05 mM výsledná koncentrace f-MLF-KK-BAM v mediu). Kontrolní melanomové buňky byly ponechány bez ligandu.

Po napipetování ligandu k nádorovým buňkám byla destička vložena na 30 minut do CO₂ termostatu při 37°C. Po uplynutí 30 minut se destička stočila při 424 g na 2 minuty při 4°C a ocákla se. Jamky s ligandem i kontrolní jamky byly ještě jednou promyty 200 µl RPMI s 10% FCS a destička se opět stočila na 424 g na 2 minuty při 4°C a ocákla se.

Souběžně probíhalo primování neutrofilů (viz výše, GM-CSF + TNF α). Do příslušných jamek bylo přidáno 200 µl, tedy 500 000, primovaných neutrofilů na jamku. Do jamek kontrolních pak bylo přidáno samotné medium.

Do jamek, kde byl testován vliv Cl-amidinu byla tato látka přidána na výslednou 0,1 mM koncentraci. Vše bylo spolu rozsuspenzováno pomocí pipety s širokým otvorem a vloženo do CO₂ termostatu při 37°C na 2 hodiny.

Po uplynutí kultivační doby byl obsah jamky rozsuspenzován pomocí pipety. Celý obsah byl vyjmut z jamky a smíchán v poměru 1:1 s trypanovou modří. Buňky, nádorové buňky B16-F10 i neutrofilů, byly dále spočítány pomocí Bürkerovy komůrky.

4.20 Pokus č. 5: *In vitro* stanovení vlivu inhibice NETs na cytotoxické působení neutrofilů na melanomové buňky s vázaným mananem

Tento experiment byl proveden stejně jako předchozí s tím, že ligand (manan-BAM) byl vázán při 0,02 mM výsledné koncentraci a FCS v séru nebylo tepelně inaktivované (odstranění komplementu), jako tomu bylo v předchozím pokuse.

4.21 Pokus č. 6: *In vitro* stanovení vlivu inhibice NETs na cytotoxické působení neutrofilů na melanomové buňky s vázaným mananem, dvojnásobný počet buněk

Tento pokus byl proveden stejně jako pokus předchozí (pokus č. 5) s rozdílem v počtu buněk. Neutrofilů byly naředěny tak, aby byla výsledná koncentrace 5 milionů neutrofilů na 1 ml. Nádorové buňky pak byly naředěny tak, aby bylo dosaženo koncentrace 2 miliony nádorových buněk v 1 ml.

4.22 Pokus č. 7: In vitro stanovení vlivu inhibice NETs na cytotoxické působení neutrofilů na melanomové buňky s vázaným mananem, použití dvojnásobného a polovičního množství Cl-amidinu

Tento pokus probíhal obdobně jako předchozí uváděný pokus č. 5. Rozdílem zde bylo odlišné použití množství inhibitoru Cl-amidinu. A to jeho poloviční množství s výslednou koncentrací 0,05 mM a jeho dvojnásobné množství 0,2 mM.

4.23 Pokus č. 8: Studium vlivu Cl-amidinu jako inhibitoru NETs na účinek nádorové imunoterapie založené na kombinaci R848 a manan-BAM, pulzní léčba

Pro tento pokus bylo použito 30 myší typu C57BL/6N. Myším bylo injekčně transplantováno 400 000 myších melanomových buněk B16-F10. Dvanáctý den po transplantaci byla zahájena léčba. Myším bylo intratumorálně aplikováno 50 μ l léčiva v intervalech 0.,1.,2. a 8.,9.,10. den od zahájení léčby. V den 0 byla změřena velikost nádoru, měření byla opakována každý druhý den, zaznamenána a vyhodnocena.

Terapeutika používána u jednotlivých skupin:

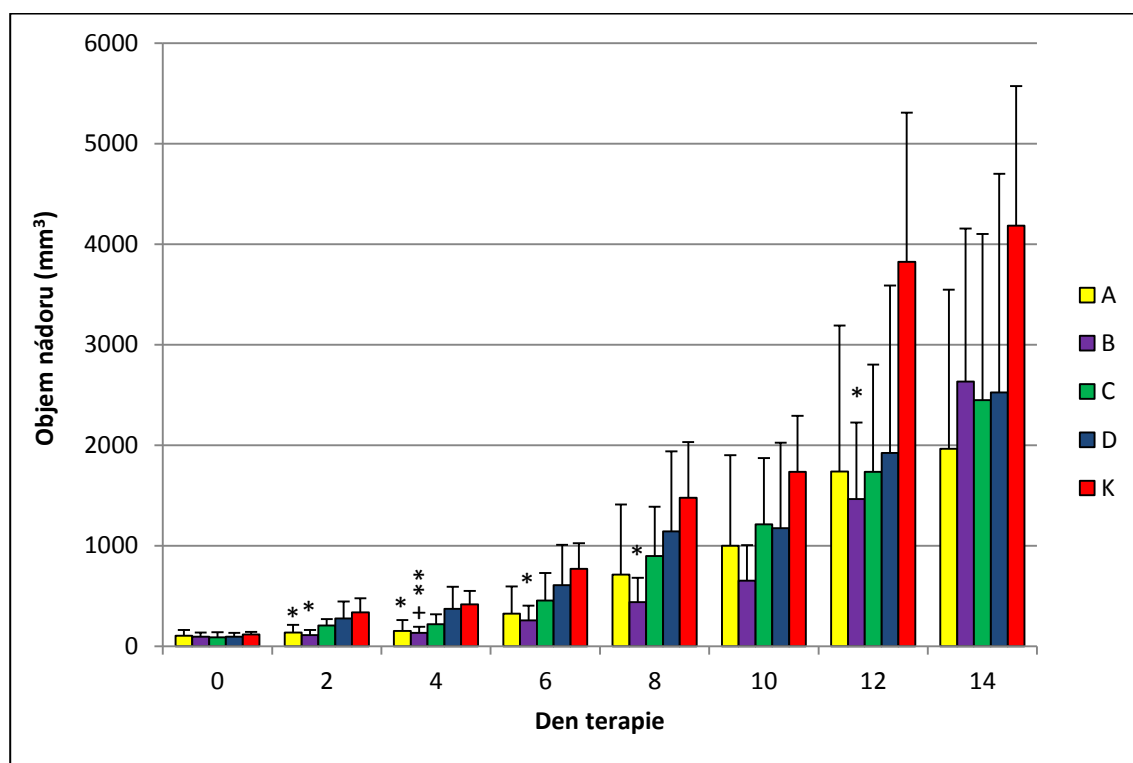
- Skupina A: 0,5 mg R848/ 0,2 mM manan-BAM v PBS
- Skupina B: 0,5 mg R848 v PBS
- Skupina C: 0,5 mg R848/ 0,2 mM manan-BAM s 4 mM Cl-amidin v PBS
- Skupina D: 0,2 mM manan-BAM v PBS
- Skupina K: kontrolní PBS

Po ukončení terapie byly myši usmrceny pomocí cervikální dislokace, byly jim vyjmuty plíce a spočítány metastáze.

5 Výsledky

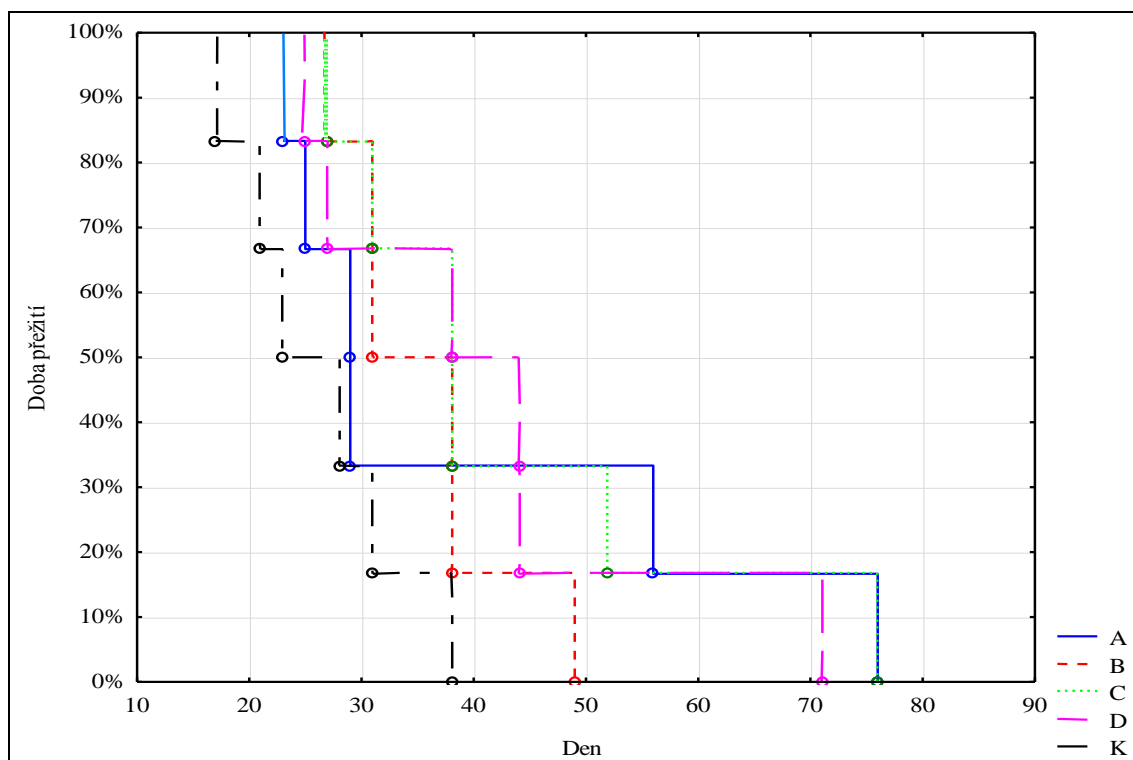
5.1 Pokus č. 1: Studium vlivu dávky *Stenotrophomonas maltophilia* a *Serratia marcescens* na redukci nádorového růstu, pulzní terapie

Tento pokus byl proveden za účelem porovnat efektivitu zvýšené dávky *Stenotrophomonas maltophilia* a *Serratia marcescens* na redukci nádorového růstu. Došlo k pozorování rozdílu v průměrné redukci nádorového růstu u skupin se stejnou bakterií, avšak odlišnou koncentrací. U *Stenotrophomonas maltophilia* 500 mil/ml byla průměrná nádorová redukce 71,93%, zatímco při koncentraci 1000 mil/ml pouze 52,4%. U *Serratia marcescens* byla pozorována obecně nižší redukce nádorového růstu, což je patrné z grafu na obrázku č. 3. *Serratia marcescens* o koncentraci 500 mil/ml měla průměrnou redukci nádorového růstu 28,74% oproti koncentraci 1000 mil/ml, která dosáhla 41,79%. Statistické významnosti i v pokročilejších dnech terapie dosáhla skupina B, *Stenotrophomonas maltophilia* 500 mil/ml.



Obr. 3: Vliv koncentrace *Stenotrophomonas maltophilia* a *Serratia marcescens* na redukci nádorového růstu: **A** – *Stenotrophomonas maltophilia* 1000 ml/ml, **B** – *Stenotrophomonas maltophilia* 500 ml/ml, **C** – *Serratia marcescens* 1000 ml/ml, **D** – *Serratia marcescens* 500 ml/ml, **K** – kontrolní PBS. * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$ ve srovnání s kontrolní skupinou (K); + $P \leq 0,05$ ve srovnání se *Serratia marcescens* 500 ml/ml (D).

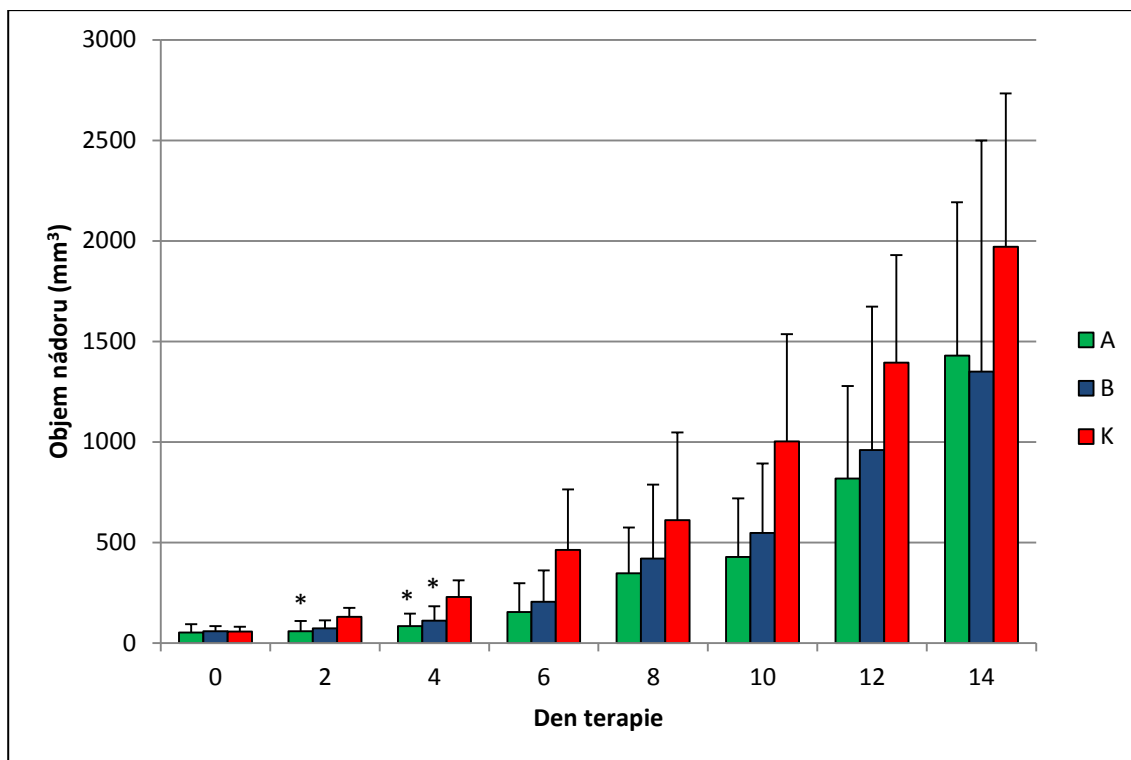
Na obrázku č. 4 je znázorněno přežívání jednotlivých myší ve skupinách. Žádná myš nedosáhla přežití 100 dní a více a rozdíly v přežití nebyly statisticky významné.



Obr. 4: Vliv koncentrace *Stenotrophomonas maltophilia* a *Serratia marcescens* na přežívání: A – *Stenotrophomonas maltophilia* 1000 mil/ml, B – *Stenotrophomonas maltophilia* 500 mil/ml, C – *Serratia marcescens* 1000 mil/ml, D – *Serratia marcescens* 500 mil/ml, K – kontrolní PBS.

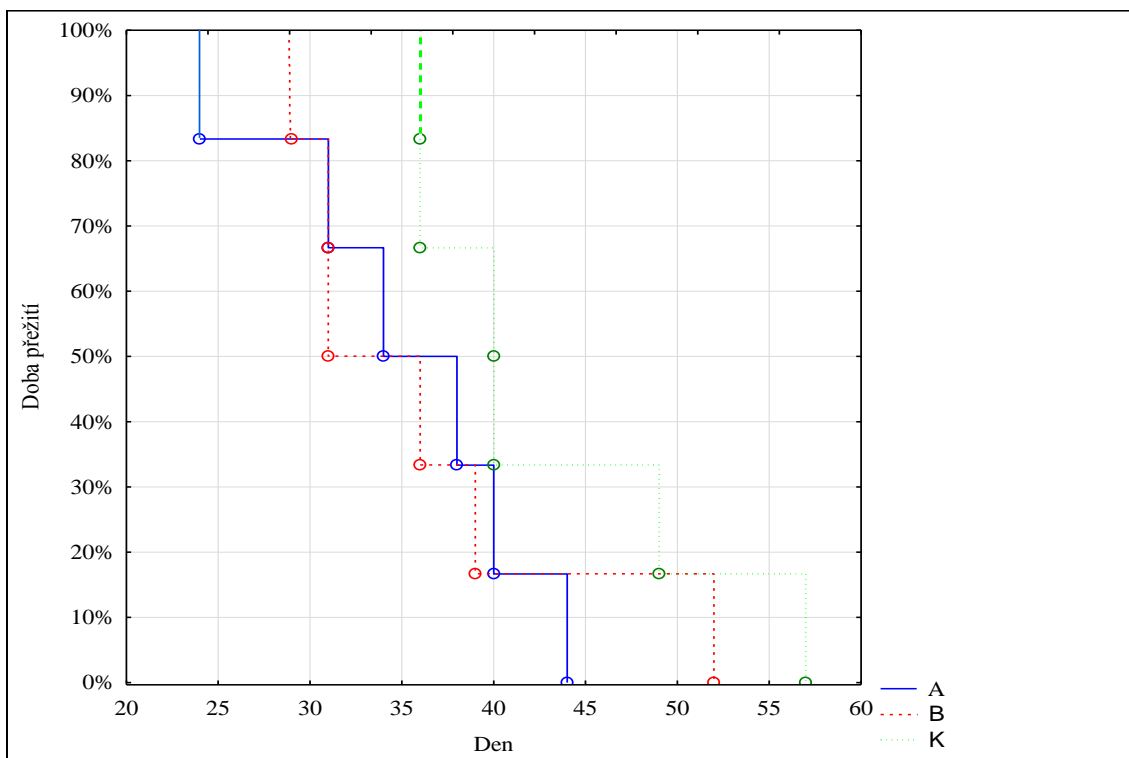
5.2 Pokus č. 2: Studium vlivu volných bakterií *Serratia marcescens* a kovalentně kotvených *Serratia marcescens*-SMCC na redukci nádorového růstu, pulzní režim

Cílem tohoto pokusu bylo zjistit, zda kovalentní vázání *Serratia marcescens* na nádorové buňky vyvolá vyšší terapeutický efekt než volná bakterie. Z obrázku č. 5 vyplývá, že obě terapeutika (A, B) snižují velikost nádoru oproti kontrolní skupině (K). Ve skupině s kovalentně vázanou bakterií (A) došlo k 49,93% průměrné redukci nádoru. Průměrná redukce nádoru volnými bakteriemi (B) byla téměř o 10% nižší než u skupiny A, a to 40,85%. Obě léčené skupiny dosáhly v počátečních dnech terapie statistické významnosti oproti kontrole.



Obr. 5: Vliv *Serratia marcescens* a *Serratia marcescens*-SMCC na redukci nádorového růstu: **A** – *Serratia marcescens* 500mil/ml-SMCC, **B** – *Serratia marcescens* 500 mil/ml, **K** – kontrolní PBS. * $P \leq 0,05$ ve srovnání s kontrolní skupinou (K).

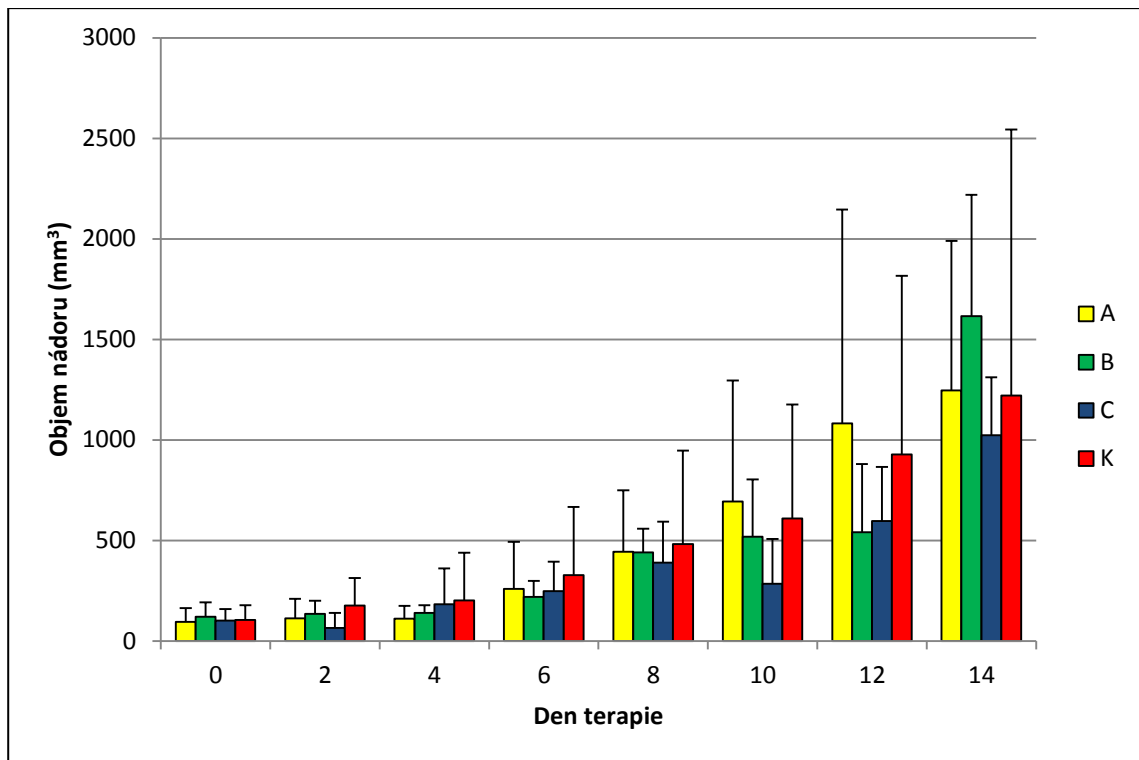
Na obrázku č. 6 je znázorněno přežívání jednotlivých léčených skupin. Léčené skupiny A (*Serratia marcescens*-SMCC) a B (*Serratia marcescens*) nedosáhly delší doby přežití ve srovnání s kontrolní skupinou K. Rozdíly mezi skupinami nebyly statisticky významné.



Obr. 6: Vliv *Serratia marcescens* a *Serratia marcescens*-SMCC na dobu přežívání: **A** - *Serratia marcescens* 500 mil/ml-SMCC, **B** - *Serratia marcescens* 500 mil/ml, **K** - kontrolní PBS.

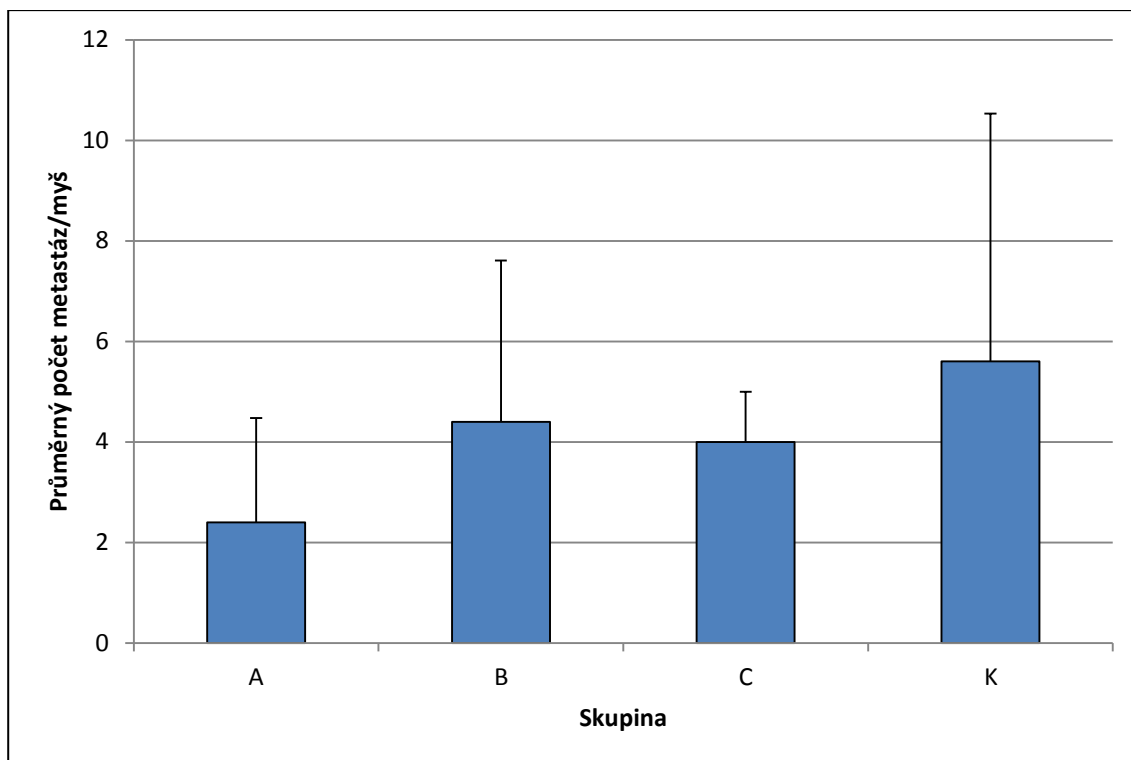
5.3 Pokus č. 3: Studium vlivu kovalentně vázané *Borrelia burgdorferi*, kovalentně vázaného mananu a jejich kombinace na redukci nádorového růstu, pulzní režim

V tomto pokuse byl sledován vliv kovalentně vázané *Borrelia burgdorferi* a kovalentně vázaného mananu na redukci nádorového růstu. Z grafu na obrázku č. 7 vyplývá, že k výrazné redukci oproti kontrolní skupině (K) nedošlo v žádné z léčených skupin. Nejvyšší redukce nádoru, a to 41,74%, bylo dosaženo 10. den terapie kombinací *Borrelia burgdorferi*-SMCC/manan-SMCC. Žádná skupina nedosáhla v žádném dni statisticky významné redukce nádorového růstu ve srovnání s kontrolou.



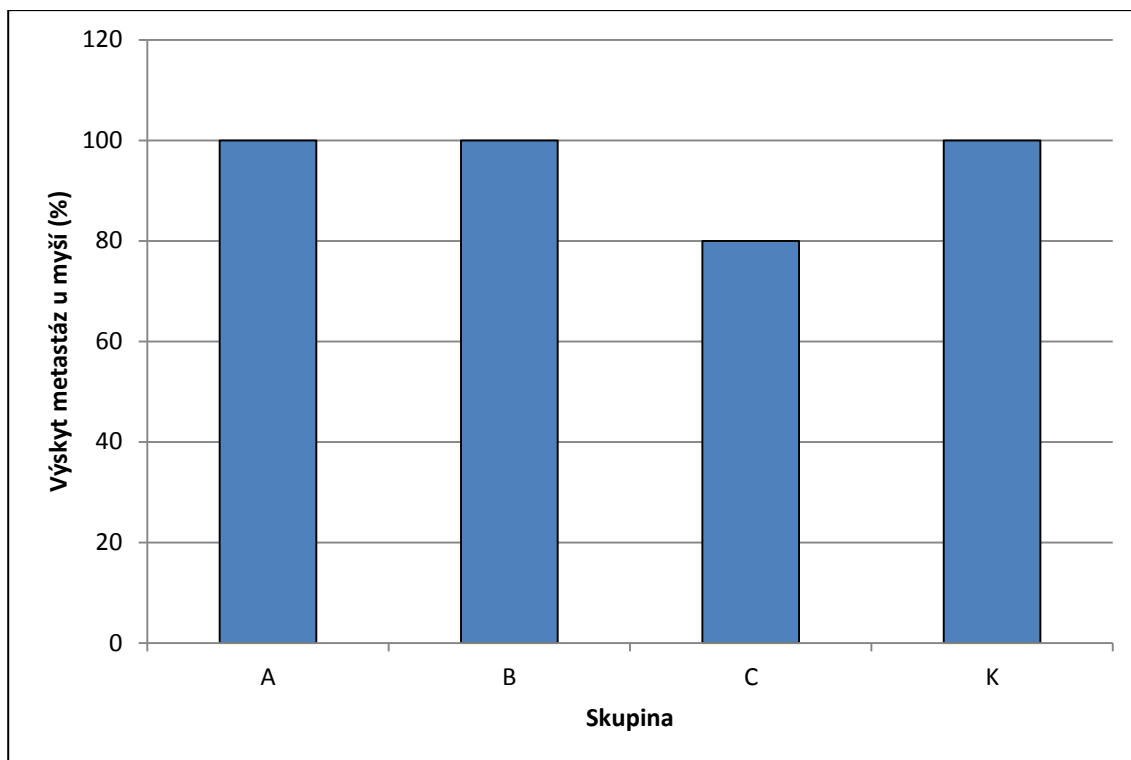
Obr. 7: Vliv kovalentně vázané *Borrelia burgdorferi* a kovalentně vázaného mananu na redukci nádorového růstu: **A** - *Borrelia burgdorferi*-SMCC, **B** - manan-SMCC, **C** - *Borrelia burgdorferi*-SMCC s manan-SMCC, **K** - kontrolní PBS.

Na obrázku č. 8 je znázorněn vliv léčby na průměrný počet metastáz v plicích v jednotlivých skupinách. Jak je z grafu patrné, v kontrolní skupině K byl přítomný nejvyšší počet metastáz.



Obr. 8: Vliv kovalentně vázané *Borrelia burgdorferi* a kovalentně vázaného mananu na průměrný počet metastáz v plicích: **A** - *Borrelia burgdorferi*-SMCC, **B** - manan-SMCC, **C** - *Borrelia burgdorferi*-SMCC s manan-SMCC, **K** - kontrolní PBS.

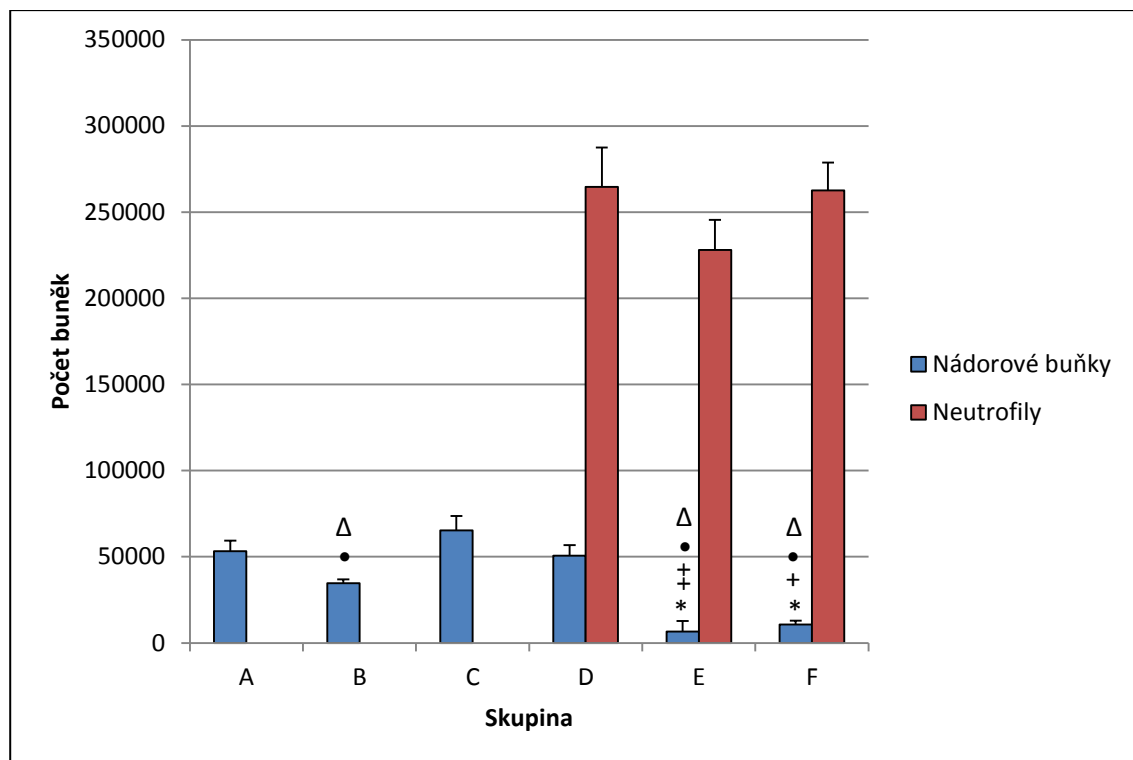
Na dalším uváděném grafu, obrázek č. 9, je znázorněn procentuální výskyt metastáz v jednotlivých skupinách. Ve všech skupinách byl výskyt metastáz vysoký, mimo skupiny C (*Borelia burgrorferi*-SMCC s manan-SMCC) a činil 100%.



Obr. 9: Vliv kovalentně vázané *Borrelia burgdorferi* a kovalentně vázaného mananu na procentuální výskyt metastáz v plicích: **A** - *Borrelia burgdorferi*-SMCC, **B** – manan-SMCC, **C** – *Borrelia burgdorferi*-SMCC s manan-SMCC, **K** – kontrolní PBS.

5.4 Pokus č. 4: *In vitro* stanovení vlivu inhibice NETs na cytotoxické působení neutrofilů na melanomové buňky s vázaným fMLF

Nejprve bylo ověřeno, jak vyplývá z obrázku 10, že Cl-amidin, který byl použit jako inhibitor tvorby NETs, na nádorové buňky nepůsobí toxicky a ze srovnání skupin D a F plyne, že nepůsobí toxicky ani na neutrofilů. Co se týče cytotoxického působení neutrofilů na nádorové buňky s vázaným f-MLF, ve skupině E došlo k výraznému cytotoxickému efektu a redukci B16-F10 o 87,5 %. Jak je patrné z obrázku č. 10, při zablokování neutrofilních extracelulárních sítí pomocí Cl-amidinu došlo ke změně množství degradovaných nádorových buněk oproti skupině, kde inhibitor NETs přítomný nebyl, průměrná redukce nádorových buněk v této skupině dosáhla 80%. To znamená, že Cl-amidin snížil cytotoxické působení neutrofilů o 8,6% a je možno uvažovat o tom, že těchto 8,6% představuje podíl cytotoxického působení neutrofilů na nádorové buňky prostřednictvím tvorby NETs.

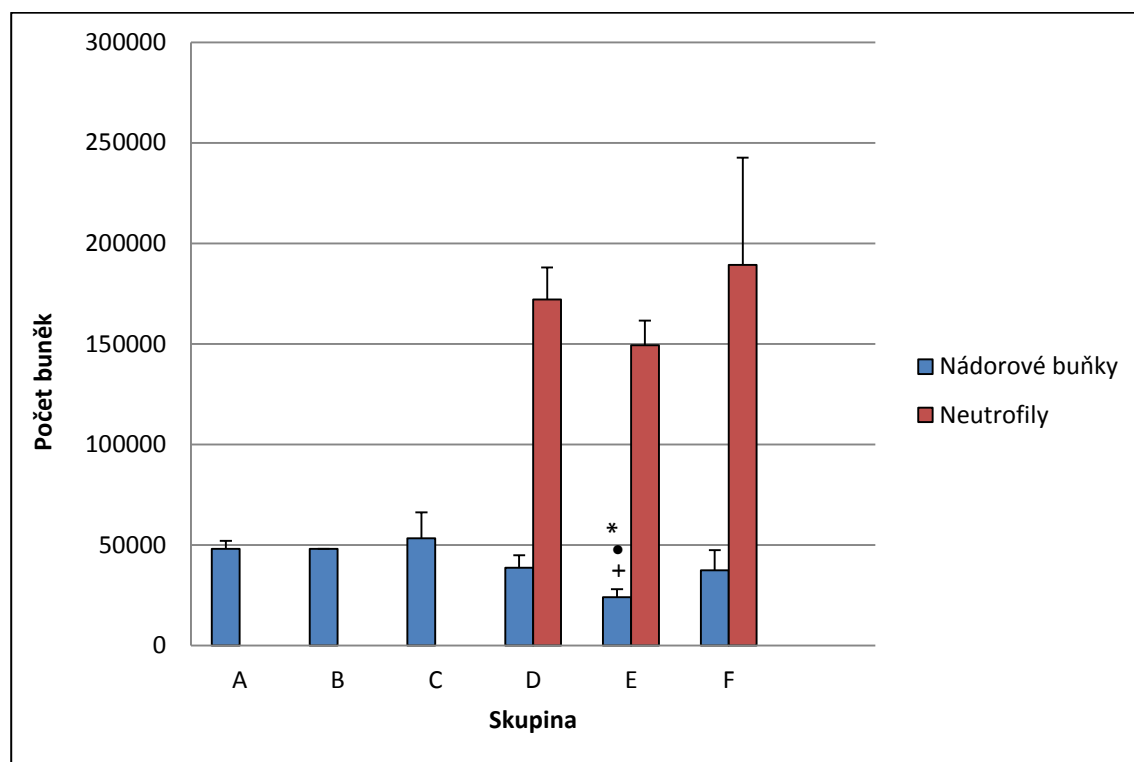


Obr. 10: Cytotoxický test za použití inhibitoru Cl-amidinu. **A** - B16-F10, **B** - B16-F10 s ligandem f-MLF-BAM, **C** - B16-F10 s inhibitorem Cl-amidinem, **D** - B16-F10 a neutrofilly, **E** - B16-F10 s ligandem f-MLF-BAM a neutrofilly, **F** - B16-F10 s ligandem f-MLF-BAM a neutrofilly a inhibitorem 0,1 mM Cl-amidinem. * $P \leq 0,0005$ ve srovnání s B16-F10 (A); + $P \leq 0,005$, ++ $\leq 0,001$ ve srovnání s B16-F10 s ligandem f-MLF-BAM (B); • $P \leq 0,0005$ ve srovnání s B16-F10 s inhibitorem Cl-amidinem (C); $\Delta P \leq 0,0005$ ve srovnání s B16-F10 a neutrofilly (D).

5.5 Pokus č. 5: *In vitro* stanovení vlivu inhibice NETs na cytotoxické působení neutrofilů na melanomové buňky s vázaným mananem

V dalším *in vitro* (Obr. 11) pokusu byla tvorba NETs zainhibována pomocí Cl-amidinu v případě, že nádorové buňky byl jako ligand navázán manan. To bylo spojeno s pozorováním výraznějšího efektu Cl-amidinu při potlačení cytotoxického působení neutrofilů na nádorové buňky. Oproti skupině E (B16-F10 s ligandem manan-BAM a neutrofilly), kde došlo k redukci počtu nádorových buněk o 50% oproti kontrolní skupině A, došlo u skupiny F, která obsahovala navíc inhibitor Cl-amidin k redukci nádorových buněk pouze o 22,22%. Cl-amidin tedy snížil cytotoxický účín neutrofilů o 55,56%. Je možno tedy uvažovat, že takto velký je podíl tvorby NETs na cytotoxickém působení neutrofilů na nádorové buňky s mananem a ze srovnání s předchozím pokusem vyplývá, že u vázaného manan-BAM je tedy spoluúčast tvorby NETs vyšší, než u vázaného fMLF. Tento experiment opět potvrdil, že Cl-amidin nepůsobí cytotoxicky ani na nádorové buňky, ani na neutrofilly. Tvorbu NETs lze sledovat jak inhibicí pomocí Cl-amidinu, tak

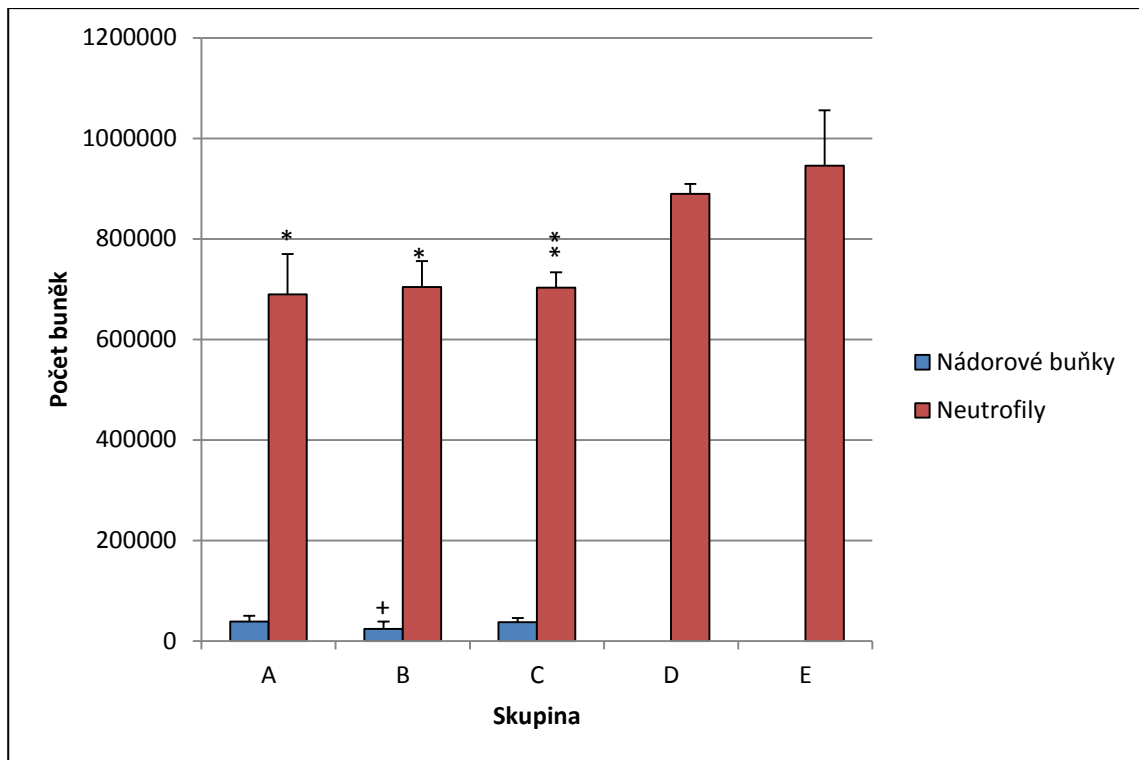
by se měla projevit i na úrovni poklesu živých neutrofilů při jejich ataku nádorových buněk, tudíž ve skupině E. Ve srovnání se skupinou D, kde byl tento atak minimální, neboť na nádorových buňkách nebyl ligand vyvolávající opsonizaci přítomen, však zaznamenán nebyl.



Obr. 11: Cytotoxický test za použití Cl-amidinu a mananu: **A** - B16-F10, **B** - B16-F10 s ligandem manan-BAM, **C** - B16-F10 s inhibítoem Cl-amidinem, **D** - B16-F10 a neutrofilů, **E** - B16-F10 s ligandem manan-BAM a neutrofilů, **F** - B16-F10 s ligandem manan-BAM a neutrofilů s inhibítoem 0,1 mM Cl-amidinem. * $P \leq 0,05$ ve srovnání s B16-F10; + $P \leq 0,05$ ve srovnání s B16-F10 s ligandem manan-BAM ; • $P \leq 0,01$ ve srovnání s B16-F10 s inhibítoem Cl-amidinem.

5.6 Pokus č. 6: *In vitro* stanovení vlivu inhibice NETs na cytotoxické působení neutrofilů na melanomové buňky s vázaným mananem, dvojnásobný počet buněk

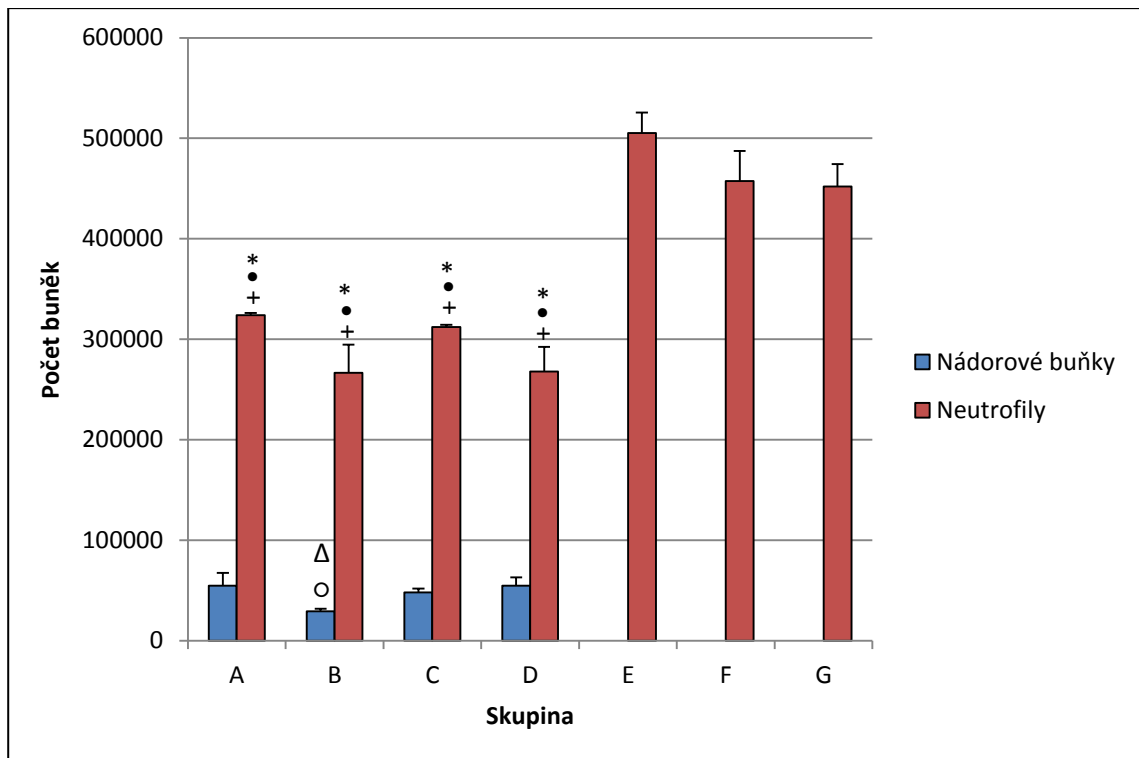
Tento pokus byl proveden stejně, jako předchozí a zaměřil se zejména na analýzu v počtu neutrofilů. Byl použit dvojnásobný počet nádorových buněk i neutrofilů, aby výsledky při počítání byly přesnější. Přestože ve skupině B neutrofilů vyvolaly největší redukci počtu nádorových buněk, nedošlo k většímu snížení jejich počtu ve srovnání se skupinou A, jak je vyneseno v grafu na obrázku č. 12. Experiment rovněž neumožnil posoudit, zda Cl-amidin ovlivní počet neutrofilů tím, že znemožní jejich rozpad při tvorbě NETs.



Obr. 12: Změna množství neutrofilů během cytotoxického testu při použití Cl-amidinu, dvojnásobné množství buněk: **A** – B16-F10 a neutrofilů, **B** – B16-F10 s ligandem manan-BAM a neutrofilů, **C** – B16-F10 s ligandem manan-BAM a neutrofilů a inhibítoem 0,1 mM Cl-amidinem, **D** – neutrofilů, **E** – neutrofilů s inhibítoem 0,1 mM Cl-amidinem. * $P \leq 0,05$, ** $\leq 0,01$ ve srovnání s neutrofilů s inhibítoem 0,1 mM Cl-amidinem (E); + $P \leq 0,05$ ve srovnání s B16-F10 a neutrofilů.

5.7 Pokus č. 7: *In vitro* stanovení vlivu inhibice NETs na cytotoxické působení neutrofilů na melanomové buňky s vázaným mananem, použití dvojnásobného a polovičního množství Cl-amidinu

Tento pokus byl proveden stejně jako předchozí pokusy, a měl být změřen opět vliv na změnu v počtu neutrofilů. V tomto pokusu bylo použito dvojnásobné a poloviční koncentrace inhibítoem oproti předchozím pokusům. Bylo potvrzeno, že při vyšší koncentraci není inhibítoem toxický ani pro nádorové buňky, ani pro neutrofilů, jak je vidět na obrázku č. 13. Cl-amidin ovlivnil počet neutrofilů tím, že znemožnil jejich rozpad při tvorbě NETs, což je dobře vidět při porovnání skupin A a B se skupinou C. Při použití 0,2 mM Cl-amidinu (C) došlo k nižšímu rozpadu neutrofilů, což jasně koreluje i s vyšším přežíváním nádorových buněk.

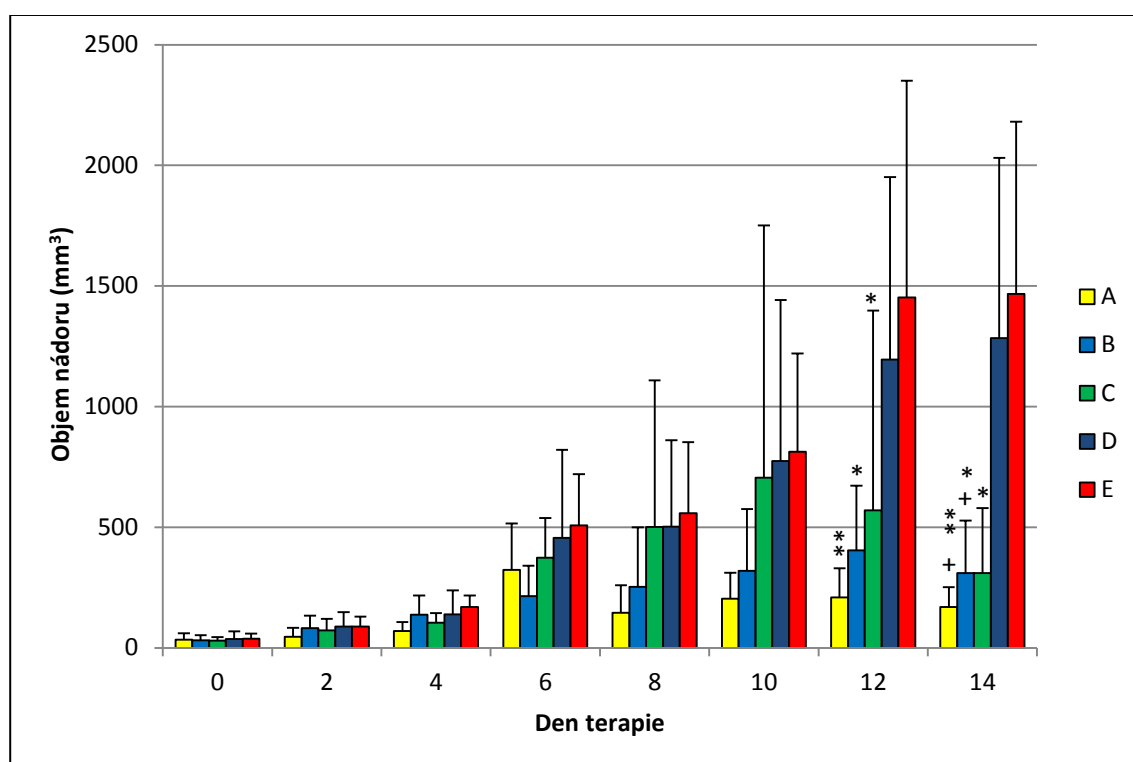


Obr. 13: Změna množství neutrofilů během cytotoxického testu při použití dvojnásobného a polovičního množství Cl-amidinu: **A** – B16-F10 a neutrofilů, **B** – B16-F10 s ligandem manan-BAM a neutrofilů, **C** – B16-F10 s ligandem manan-BAM a neutrofilů a 0,2 mM Cl-amidin, **D** – B16-F10 a neutrofilů s ligandem manan-BAM a 0,05 mM Cl-amidin, **E** - neutrofilů, **F** – neutrofilů a 0,2 mM Cl-amidin, **G** - neutrofilů a 0,05 mM Cl-amidin. * $P \leq 0,0005$ ve srovnání s neutrofilů; + $P \leq 0,0005$ ve srovnání s neutrofilů a 0,2 mM Cl-amidin; • $P \leq 0,0005$ ve srovnání s neutrofilů a 0,05 mM Cl-amidin; $\Delta P \leq 0,05$ ve srovnání s B16-F10; $\circ P \leq 0,05$ ve srovnání s B16-F10 a neutrofilů s ligandem manan-BAM a 0,05 mM Cl-amidin.

Zhodnocením *in vitro* pokusů můžeme říci to, že se NETs se podílí na redukci nádorové masy, což je možno zjistit nejen z účinku na nádorové buňky, ale do určité míry je možno i vysledovat vztah úbytku nádorových buněk k úbytku neutrofilů. Při použití mananu jako ligandu, Cl-amidin v koncentraci 0,1 mM způsobil, že nádorových buněk bylo zlikvidováno o 13333,3 méně, což koreluje s tím, že při vzájemných interakcích přežilo o 40 000 neutrofilů více. Cl-amidin v koncentraci 0,2 mM způsobil, že nádorových buněk bylo zlikvidováno o 18 666,74 méně. Při vzájemných interakcích přežilo o 45 333,3 neutrofilů více. Při použití koncentrace 0,05 mM Cl-amidin došlo k přežití o 25 333,3 více nádorových buněk, při vzájemných interakcích přežilo však pouze o 1333,4 neutrofilů více.

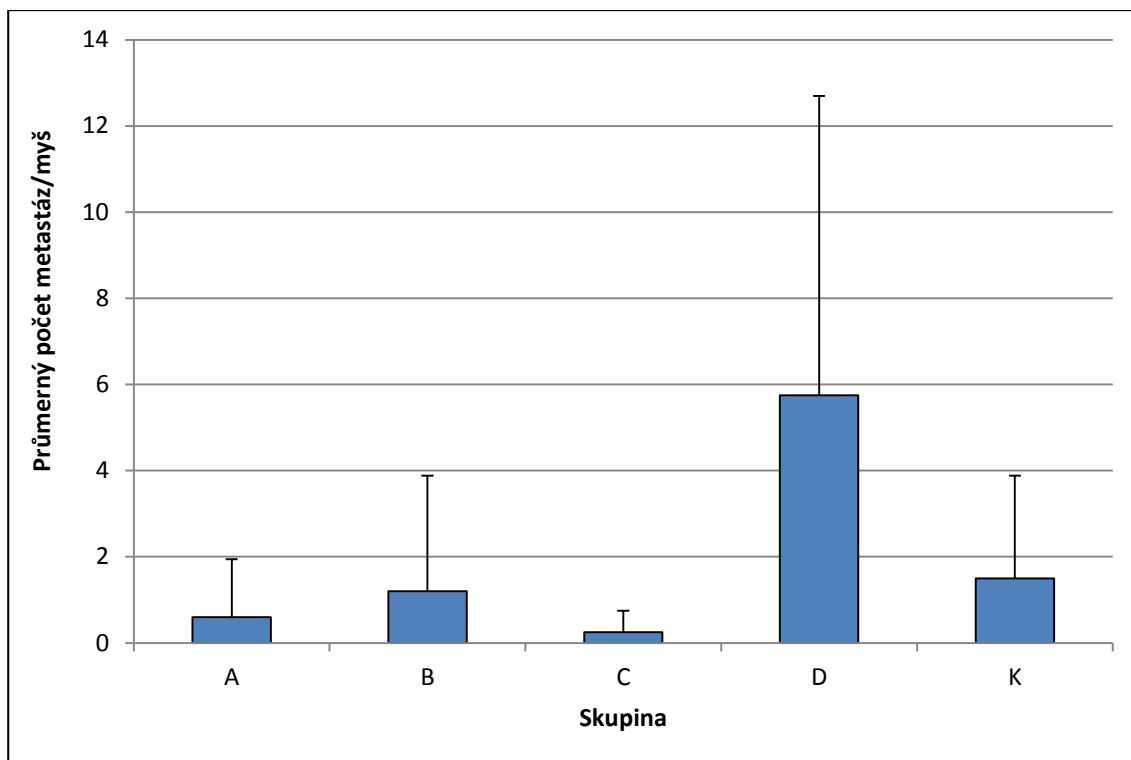
5.8 Pokus č. 8: Studium vlivu Cl-amidinu jako inhibitoru NETs na účinek nádorové imunoterapie založené na kombinaci R848 a manan-BAM, pulzní léčba

Inhibitor neutrofilních extracelulární Cl-amidin byl vyzkoušen také v *in vivo* pokuse. Jak je vidět na obrázku č. 15, během použití Cl-amidinu ve skupině C došlo ke snížení účinku léčebné látky použité ve skupině A. Toto dokazuje i srovnání průměrné redukce nádorového růstu, kdy u skupiny A byla 69,5 %, zatímco ve skupině C s Cl-amidinem byla redukce nádorového růstu pouze 38,09%. Výsledky tedy ukazují na to, že NETs hrají roli v terapii založené na kombinaci R848 a mananu-BAM.



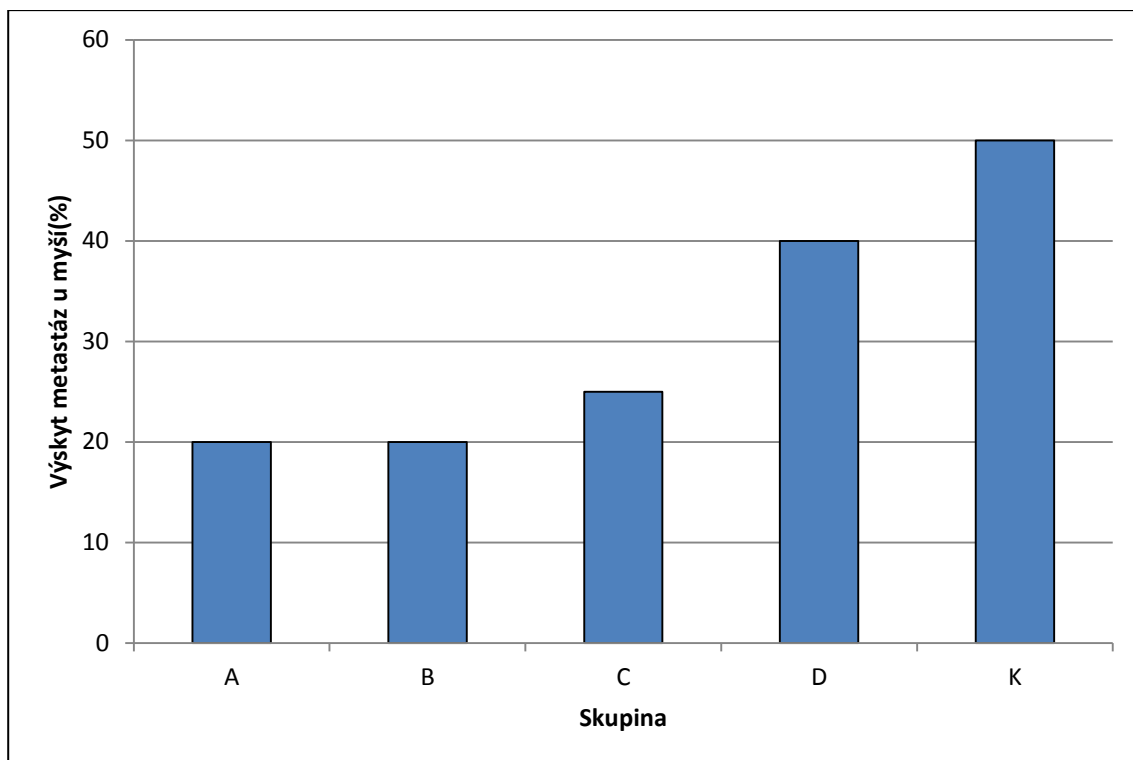
Obr. 15: Vliv Cl-amidinu na redukci nádorového růstu: **A** – R848/manan-BAM, **B** – R848, **C** – R848/manan-BAM s Cl-amidin, **D** – manan-BAM, **K** – kontrolní PBS. + $P \leq 0,05$ ve srovnání s manan-BAM (D); * $P \leq 0,05$. ** $\leq 0,01$ ve srovnání s kontrolní skupinou (K).

Na obrázku č. 16 je znázorněn vliv léčby na průměrný počet metastáz v plicích v jednotlivých skupinách. Jak je z grafu patrné, nejvyšší přítomnost metastáz byla u skupiny B, druhý nejvyšší počet se pak nacházel u kontrolní skupiny K.



Obr. 16: Vliv Cl-amidinu na průměrný počet metastáz v plicích: **A** – R848/manan-BAM, **B** – R848, **C** - R848/manan-BAM s Cl-amidin, **D** – manan/BAM, **K** – kontrolní PBS.

Na dalším uváděném grafu, obrázek č. 17, je znázorněn procentuální výskyt metastáz v jednotlivých skupinách. Ve všech skupinách se metastáze vyskytly, nejvyšší výskyt metastáz, a to 50%, byl u skupiny kontrolní (K). Druhý nejvyšší výskyt, a to 40%, náleží skupině B s R848.



Obr. 17: Vliv Cl-amidinu na procentuální výskyt metastáz v plicích: **A** – R848/manan-BAM, **B** – R848, **C** - R848/manan-BAM s Cl-amidin, **D** – manan-BAM, **K** – kontrolní PBS.

6 Diskuze

Imunoterapie je léčebný přístup k terapii nádorových onemocnění, který využívá šetrnějšího přístupu k lidským zdravým buňkám tím, že je zacílen specificky na nádorové buňky. Imunoterapie se právě díky této charakteristice jeví jako nejvíce vhodné řešení k léčbě nádorových onemocnění. Proto i tato práce využívá metody imunoterapie k redukci nádorového růstu. Snahou bylo zacílit specifický atak imunitních buněk kotvením ligandů fagocytárních motivů (fMLF a manan) na nádorové buňky a podpořit tak infiltraci imunitních buněk do místa nádoru pomocí bakterií a resiquimodu. Tato diplomová práce navazuje na předchozí bakalářské a diplomové práce, které se také zabývaly problematikou stimulace vrozené imunity za účelem redukce nádorového růstu.

První pokus, provedený v této diplomové práci, navazoval na práce, které již byly v souvislosti s využitím bakterií během imunoterapie vypracovány, a to na práci Sváčkové (Sváčková, 2013) a Fáberové (Fáberová, 2012) a dále i na práce popisující možnost využití bakterií při imunoterapii nádoru (Coley, 1906, Dang a kol., 2001, Toso a kol., 2007, Diaz a kol., 2005). V tomto pokuse bylo opět ověřeno, že bakterie *Stenotrophomonas maltophilia* má výrazně lepší účinky na redukci nádorového růstu než bakterie *Serratia marcescens*, přestože obě bakterie jsou gram-negativní a jsou si podobné jak tvarem, tak velikostí (Hugh a Leifson, 1963 a Hejazi a Falkiner, 1997). Lepších výsledků ze strany *Stenotrophomonas maltophilia* bylo docíleno zřejmě především díky rozdílnému izoelektrickému bodu. Izoelektrický bod *Stenotrophomonas maltophilia* je 11 (Jucker a kol., 1996) na rozdíl od *Serratia marcescens*, jejíž izoelektrický bod je 3,9 (Van der Mei a kol., 1992). To znamená, že na povrchu *Stenotrophomonas maltophilia* vzniká při fyziologickém pH pozitivní náboj, zatímco na povrchu *Serratia marcescens* vzniká náboj negativní. Díky tomuto náboji může dojít k interakci *Stenotrophomonas maltophilia* s nádorovou buňkou, která má negativně nabitý povrch (Okuyama a kol., 1984), zatímco *Serratia marcescens* toho se svým negativním nábojem není schopná. Pravdivost toho tvrzení ověřila ve své práci Sváčková (Sváčková, 2013), kde byl negativní náboj *Serratia marcescens* přebit pomocí oligolysinu. Po tomto vytvoření kladného náboje na povrchu bakterie, měla *Serratia marcescens* stejné léčebné vlastnosti jako *Stenotrophomonas maltophilia*, jak bylo očekáváno. Z toho lze usuzovat, že v tomto případě je zásadní pro navázání na nádorovou buňku a zacílení imunitního ataku právě náboj bakterie a její izoelektrický bod. Toto tvrzení je v souladu se závěry dr. Jucker, která potvrdila, že se

Stenotrophomonas maltophilia díky svému náboji dobře váže na záporně nabitě povrchy (Jucker a kol., 1996). Dalším parametrem, který byl v tomto pokusu sledován, bylo optimální množství bakterií, které je použitelné k redukci nádorového růstu během imunoterapie. Byla srovnávána koncentrace 500 mil/ml a 1000 mil/ml. Při použití *Stenotrophomonas maltophilia* se jako optimum jeví použití menšího množství bakterií. *Serratia marcescens* naopak dosáhla lepších výsledků při použití vyšší koncentrace. I tento jev může být způsoben schopností *Stenotrophomonas maltophilia* se specificky vázat na nádorové buňky a targetovat tak imunologický atak. Pokud totiž byla použita vyšší koncentrace bakterií, tyto bakterie se mohly nespecificky dostávat i do krevního oběhu, díky tomu mohlo dojít ke snížení specifické odpovědi proti nádoru, protože imunitní systém byl využit na likvidaci bakterií v krevním řečišti. Naopak zvýšením množství bakterií *Serratia marcescens*, které byly aplikovány do nádoru při terapii, bylo dosaženo lepších výsledků. To je nejspíše dáno tím, že *Serratia marcescens* se specificky neváže na nádorové buňky, díky negativnímu náboji a tak působí na systémové úrovni. Díky tomu došlo zřejmě k netargetovanému efektu, který byl slabší, než efekt způsoben *Stenotrophomonas maltophilia*. První pokus tedy potvrdil již domněnku prof. Coleyho, že je možné využít bakterie během imunoterapie (Coley, 1906).

Na první pokus volně navázal pokus druhý, jehož cílem bylo ověřit, zda ukotvení bakterie *Serratia marcescens* na nádorovou buňku bude mít lepší vliv na redukci nádorového růstu, než bakterie volná. V tomto pokusu bylo použité kovalentní kotvení pomocí SMCC (Baker a kol., 2015). Bylo potvrzeno, že ukotvení *Serratia marcescens* na povrch nádorové buňky má příznivější účinek na redukci nádorového růstu než použití volné bakterie, která se nemá jak na nádorovou buňku specificky navázat díky nízkému izoelektrickému bodu (Van der Mei a kol., 1992). Ve srovnání s pokusem Sváčkové (Sváčková, 2013), kde byl na *Serratia marcescens* vytvořen kladný náboj pomocí oligolysinu, nedosáhla však kovalentně vázaná *Serratia marcescens* tak příznivých výsledků. Toto je dáno nejspíše tím, že během využití kladného náboje dochází k přímé interakci s nádorovou buňkou. Zatímco během využití kovalentní kotvy je bakterie vázaná přes sekundární látku k nádorové buňce.

V pokuse číslo tři byla využita odlišná bakterie a to *Borrelia burgdorferi*. *Borrelia burgdorferi* byla využívána kvůli tomu, že neobsahuje klasický enterobakteriální lipopolysacharidu (LPS), za což je zodpovědná především absence volného lipidu A (Takayama a kol., 1987). *Borrelia burgdorferi* však obsahuje LPS-like substance (Schwarzová a Čižnár, 2004). Testování bakterie bez LPS bylo záměrné, protože bakterie

Stenotrophomonas maltophilia (Matera a kol., 2004) a *Serratia marcescens* LPS obsahují (Makimura a kol., 2007), a je zde snaha o konstruování terapeutika bez LPS. LPS je nežádoucí hlavně kvůli tomu, že u lidí může způsobovat různé zdravotní komplikace od vyrážky na kůži až po těžké alergické reakce (Steward a kol., 2006). Přechodný nevýrazný terapeutický efekt byl zaznamenán pouze v kombinaci *Borrelia burgdorferi* s mananem. Kumžáková (Kumžáková, ústní sdělení) popsala obdobnou synergii u *Listeria monocytogenes* v kombinaci s kotveným mananem, zde byl však efekt výrazně silnější. Při použití samotných bakterií *Borrelia burgdorferi* nebyl zaznamenán žádný terapeutický efekt. Manan zde tedy fungoval jako aktivátor imunitních buněk přes manózový receptor, jak popisuje Takahashi a kol., 1998, můžeme ale uvažovat i o aktivaci komplementu (Janotová, 2014). To, že samotná *Borrelia burgdorferi* nezpůsobila redukci nádorového růstu, se dá přisuzovat tomu, že aktivuje odlišné TLR. Pokud se do organismu dostane určitá forma LPS, reagují na ní TLR 4, tyto Toll-like receptory však nereagují na povrchový lipoprotein A, který je na povrchu *Borrelia burgdorferi*. Tento protein je signalizován pomocí TLR 2 (Bulut a kol., 2001). Pokud dojde ke srovnání *Borrelia burgdorferi* s další bakterií *Mycobacterium tuberculosis*, kterou používala Jačková (Jačková, ústní sdělení), zjistí se, že *Mycobacterium tuberculosis* byla účinná i sama, bez nutné kombinace s mananem. To může být dáno tím, že *Mycobacterium tuberculosis* funguje jako TLR agonista a fagocytární motiv, na rozdíl od *Borrelia burgdorferi*, tedy sama aktivuje komplementový receptor 3 (Garcia a kol., 2005). Dalším faktorem, proč se při použití *Borrelia burgdorferi* nepodařilo dosáhnout tak dobrých výsledků může být i její povrchové uspořádání, které je pro ni charakteristické a na dalších prokaryotických organismech se nevyskytuje. Povrchová vrstva *Borrelia burgdorferi* totiž obsahuje unikátní lipidové vrstvy bohaté na cholesterol a glykolipidy, a zdá se, že tyto struktury nejsou pro vyvolání imunitní odpovědi tak vhodné (Toledo a kol., 2015).

Pokusy číslo 4, 5, 6 a 7 byly *in vitro* pokusy. Výsledkem předchozích studií imunoterapie založené na kombinaci ligandů TLR a fagocytárních receptorů bylo zjištění významného podílu neutrofilní infiltrace a to u terapií založených na izolovaných ligandech (Janotová, 2014), tak i při použití bakterií (Caisová, ústní sdělení). Neutrofilní infiltrace byla pozorována histologicky, pomocí průtokové cytometrie a její význam podporuje i rychlost terapeutického zásahu, neutrofilům odpovídající. V počátcích reakce na intracelulární či extracelulární patogen je totiž vyžadována rychlá reakce pomocí infiltrace neutrofilů. Ostatní buňky imunitní reakce (monocyty, nezralé dendritické buňky) se účastní později až po jejich přitáhnutí pomocí cytokinů a chemokinů, které jsou

produkované aktivovanými neutrofily (Silva, 2010). Otázkou bylo, zda může být předpokládán neutrofilní atak mechanismem frustrované fagocytózy či tvorbou neutrofilních extracelulárních sítí (Lu a kol., 2012). Další možnosti působení neutrofilů (přímá fagocytóza) se jeví jako vysoce nepravděpodobné, vzhledem k poměru velikosti neutrofilů a nádorové buňky (Wheeler a Underhill, 2014). Cílem provedených *in vitro* experimentů bylo přispět k poznání mechanismů působení neutrofilů na nádorové buňky a to nejen v kontextu mnou provedených *in vitro* pokusů, ale i dalších studií celého týmu.

V pokuse číslo 4 došlo k inhibování tvorby neutrofilních extracelulárních sítí pomocí Cl-amidinu. V tomto pokuse byl jako ligand použit fMLF. Tento ligand byl použit, protože je odvozen přímo od bakterií. Tento bakteriální peptid dále plní funkci chemotaktického faktoru a je vysoce výkonným chemoatraktantem neutrofilů (Hayashi a kol., 2013). V tomto pokuse bylo zjištěno, že podíl neutrofilní extracelulárních sítí na redukcii nádorové masy byl malý. Tudiž se zřejmě ataku proti nádorovým buňkám při použití fMLF jako ligandu, účastní z větší míry oxidativní vzplanutí, protože fMLF, jak již popisuje Dana a kol., působí i na aktivaci oxidativního vzplanutí (Dana a kol., 2000). Poměr velikosti působení oxidativního vzplanutí byl zkoumán v jiné diplomové práci.

V pokuse číslo 5, 6 a 7 byl jako ligand použit manan, který byl kotven na nádorové buňky. Manan byl v těchto pokusech použit především pro srovnání účinku neutrofilních extracelulárních sítí při použití jiného dostupného ligandu. Dále je to látka, která byla také využita v posledním *in vivo* pokusu této práce (viz dále) a byla používána i v dalších pracích, na které tato diplomová práce navazuje. Ve srovnání s předchozím pokusem, při použití mananu jako ligandu byl podíl neutrofilních extracelulárních sítí na redukcii nádorové masy vyšší než u fMLF ligandu. Toto zjištění plně koreluje s prováděným *in vivo* pokusem (viz dále). Vyšší podíl NETs na ataku nádorových buněk, může být vysvětlován tak, že při použití mananu jako ligandu, jsou využívány jiné signální dráhy a jiné receptory. Během působení fMLF dochází k aktivaci lymfocytů přes formyl peptidové receptory, pokud se na takovýto receptor naváže vhodný motiv, vede to k chemotaxi buněk, jejich aktivaci i stimulaci (Hayashi a kol., 2013). Na manan se váže mannose-binding lektin (aktivace komplementu, iC3b opsonizace pro neutrofily) (Reid a Turner, 1994). Jak se tyto odlišné mechanismy projeví různým zapojením NETs by bylo předčasné diskutovat.

Pokus číslo 6 byl prováděn za účelem zpřesnění počítání pomocí Bürkerovy komůrky, proto zde byly použity větší počty buněk. Jinak pokus probíhal stejně jako předchozí pokus *in vitro*. Zpřesněním počítání buněk jsem chtěla především vytvořit

předpoklady pro exaktnější vyhodnocení změn v počtu neutrofilů při jejich interakci s nádorovými buňkami. Tvorbu NETs a zjištění jejího významu při cytotoxickém působení neutrofilů na nádorové buňky byla snaha totiž sledovat nejenom inhibičně (zmenšení cytotoxicity neutrofilů inhibicí tvorby NETs pomocí Cl-amidinu), ale bylo zde uvažováno i to, že tvorba NETs musí být spojena s úhynem neutrofilů. Bohužel úbytek neutrofilů oproti použitému množství byl v *in vitro* pokusech tak malý, že došlo k velice problematickému vyhodnocování pomocí Bürkerovy komůrky, pokusy proto nešlo zcela přesně vyhodnotit.

Pokus číslo 7 byl prováděn obdobně jako předchozí *in vitro* pokusy. Bylo zde zkoumáno, zda změna v koncentraci inhibitoru pozitivně či negativně ovlivní počty neutrofilů a nádorových buněk. Obecně se dá říci, že při vyšších koncentracích Cl-amidinu je možno vyzorovat, že menší cytotoxický účinek neutrofilů daný inhibicí tvorby NETs je spojen s jejich menším úbytkem. Při nízké (0,05 mM) koncentraci Cl-amidinu byl tento jev však minimální. Celkově je však třeba konstatovat, že sledování této korelace je velmi obtížné, neboť úbytky neutrofilů dané jejich sebevražedným atakem a tvorbou NETs jsou relativně vzhledem k jejich použitému počtu velmi malé.

Zajímavým efektem, který bylo u všech *in vitro* pokusů možno sledovat, bylo, že nedocházelo k cytotoxickému působení neutrofilů na nádorové buňky samotné, aby došlo k interakci, musel být přítomný ligand. V těchto skupinách sice došlo k poklesu množství neutrofilů, zřejmě z důvodu samotné manipulace s neutrofilů, ale množství nádorových buněk zůstalo nezměněno. Neutrofilů totiž neměly žádný důvod k ataku nádorových buněk. Tedy neutrofilů nádorové buňky nezabíjely. Tato pozorování přesně korelují s pozorováním Vácové (Vácová, ústní sdělení), která sledovala vznik interakcí pomocí mikroskopování.

Pokus číslo 8 byl opět pokus *in vivo* pokus a měl ověřit, zda pozorování *in vitro* pokusech budou obdobné i v rovině *in vivo*. V tomto pokuse byl použit resiquimod jako léčivo. Resiquimod byl použit ze stejného důvodu jako *Borrelia burgdorferi* v pokuse č. 3, aby došlo k nahrazení LPS pro člověka bezpečnější látkou (Meyer a kol., 2013). Resiquimod je u myši agonistou TLR 7 (Weeratna a kol., 2005). Stejně jako v pokuse číslo 5 bylo pozorováno, že se Cl-amidin účastní procesu působení léčby pomocí R848 na redukcii nádorové masy, tedy bylo ověřeno, že extracelulární neutrofilní síť hraje svou roli při redukcii nádorové masy. V mnoha pracích (Demes a kol., 2012, Ho-Tin-Noe a kol., 2009, Zhou a kol., 2003 a Fuchs a kol., 2012) se předpokládá, že tvorba extracelulárních neutrofilních působí pronádorově díky podpoře proliferace primárního nádoru a

uvolněním nádorových buněk, tvorbou mikroprostředí pro záchyt nádorových buněk a inhibicí apoptózy. V rozporu s těmito tvrzeními jsou však pozorované výsledky z tohoto pokusu, kdy došlo ke snížení účinnosti léčby, pokud byl aplikován Cl-amidin. Můžeme tedy předpokládat, že i tvorba NETs hraje roli během degradace nádorových buněk v organismu, což koreluje s výsledky Odajima a kol, 1996 a Saffarzadeh a kol., 2012. Součástí pokusu bylo také sledování počtu metastáz v přeživších myších. Dle Zhou a kol. dochází k podpoře tvorbě metastáz pomocí NETs, tím že jsou schopné nádorovou buňku zachytit i na odlehlých místech od primárního nádoru, působit na ni velkým množstvím biologicky aktivních látek a tím podpořit její proliferaci. V našem pokusu skupina, která byla léčená kombinací léčiva resiquimodu a Cl-amidinu měla menší množství metastáz a vyskytovaly se u menšího množství myší v porovnání s kontrolní skupinou. Tento jev lze vysvětlit tím, že pokud dojde k lokální aplikaci Cl-amidinu do nádoru, lze i předpokládat, že určité množství Cl-amidinu mohlo být nespecificky uvolněno i do krve. Díky tomu, mohlo dojít k inhibici vzniku NETs v krvi, čímž nevznikalo mikroprostředí pro záchyt nádorových buněk na místech vzdálených od primárního nádoru. To je však jen pracovní hypotéza, vyžadující další ověření.

7 Souhrn

- Potvrdilo se, že bakterie *Stenotrophomonas maltophilia* působí terapeuticky na redukcii nádorové masy lépe než bakterie *Serratia marcescens* a to i v případě navázání bakterie *Serratia marcescens* na povrch nádorových buněk.
- Vyšší množství bakterie *Stenotrophomonas maltophilia* nepřineslo vyšší terapeutický účinek, na rozdíl od *Serratia marcescens*, která dosáhla lepšího terapeutického výsledku.
- Bakterie *Borrelia burgdorferi* se nehodí jako terapeutikum pro léčbu nádorových onemocnění a to ani ve spojení s mananem, kotveným na nádorové buňky.
- Cl-amidin jako inhibitor tvorby neutrofilních extracelulárních sítí není toxický pro neutrofilny ani nádorové buňky.
- Formování extracelulárních neutrofilních sítí se účastní imunitní ataku během cytotoxického působení neutrofilů na nádorové buňky s kotveným mananem.
- Inhibice extracelulárních neutrofilních sítí *in vivo* vedla ke snížení účinnu léčby , což potvrzuje účast neutrofilních extracelulárních sítí na imunitní ataku proti nádorové mase (terapie R848/manan).

8 Seznam zkratek

APC – antigen prezentující buňky

BAM – Biocompatible Anchor for Cell Membrane

BCG – Bacillus Clamette-Guérin

BCG/CWS - Bacillus Clamette-Guérin/cell-wall skeletons

CLRs – lektinový receptor typu C (C-Type Lectin Receptros)

CTL – cytotoxické T lymfocyty

DAMPs - molekulové vzory spojené s poškozením tkání (Damage-associated Molecular Paterns)

DMSO - Dimethylsulfoxid

DNA – deoxyribonukleová kyselina

EDTA - kyselina ethylendiamintetraoctová

FasL – Fas ligand

FCS – bovinní fetální sérum (Fetal Calf Serum)

FGFs – fibroblastový růstový faktor (Fibroblast Growth Factor)

fMLF – N-formyl-methionyl-leucyl-fenylalanin

FPR – formyl peptidové receptory

GM – CSF – faktor stimulující granulocyty a makrofágy (Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor)

HCl – kyselina chlorovodíková

HClO- kyselina chlorná

IL 2 – interleukin 2

IL-1- interleukin 1

IL-6 – interleukin 6

INF1- interferon typu 1

IPE – izoelektrický bod

MACS - Neutrophil Isolation Kit Mouse

MASP-1 a MASP-2 – Mannose-binding Protein Associated Serine Proteases

MBL – Mannose-binding lectin

mfpr – myší formyl peptidové receptory

NADPH – nikotinamidadenindinukleotidfosfát, redukováno forma

NETs – neutrofilní extracelulární sítě (Neutrophils extracellular traps)

NK – přirození zabíječi (Natural Killers)

NLRs - NOD-like receptory

PAD4 – peptidylarginine deimináza 4

PAMPs – molekulové vzory vyskytující se na patogenech (Pathogen-associated Molecular Patterns)

PBS – pufovaný fyziologický roztok (Phosphate Buffered Saline)

PEG – polyethylenglykol

PRRs - receptory rozpoznávající motivy (Pattern Recognition Receptors)

R848 – resiquimod

RLRs - Retinoic acid-inducible gene (RIG)-I-like receptory

ROS – reaktivní formy kyslíku

SMCC – Succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate

SR/CR – spontánní regrese/ kompletní rezistence

TAN – s nádorem spojené neutrofilie (Tumor-associated neutrophils)

TCEP-HCl – Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride

TDSFs – rozpustné faktory produkované nádory

TGF β – Transforming growth factor β

TLRs – Toll-like receptory

TNF α – Tumor necrosis faktor α

VEGF – vaskulární endotelový růstový faktor (Vascular Endothelial Growth Factor)

WT – divoký typ (wild type)

9 Seznam literary

- AKIRA, S., S. UEMATSU, O. TAKEUCHI. Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell*. 2006, vol. 124, Issue 4, s. 783–801. DOI: 10.1016/j.cell.2006.02.015.
- ALMEIDA, C. A., S.A. Barry. *Cancer: Basic Science and Clinical aspects*. Wiley-Blackwell. 2010. ISBN 978-1-4051-5606-6.
- ANAND, P., A.B. KUNNUMAKARA, CH. SUNDARAM, K.B. HARIKUMAR, S.T. THARAKAN, O.S. LAI, B. SUNG, B. B. AGGARWALL. Cancer is a Preventable Disease that Requires Major Lifestyle Changes. *Pharmaceutical Research*. 2008, vol. 25, Issue 9, s. 2097 – 2116. DOI: 10.1007/s11095-008-9661-9.
- BAKER, S.E., W. CAI, T.L. LASSETER, K.P. WEIDKAMP, R.J. HAMERS. Covalently bonded adducts of deoxyribonucleic acid (DNA) oligonucleotides with single-wall carbon nanotubes: Synthesis and hybridization. *Nano Letters*. 2002, vol. 2, Issue 12, s. 1413-1417. DOI: 10.1021/nl025729f.
- BARBOUR, A.G., W. BURGDORFER, S.F. HAYES, O. PÉTER, A. AESCHLIMANN. Isolation of a cultivable spirochete from Ixodes ricinus ticks of Switzerland. *Current Microbiology*. 1983, vol. 8, Issue 2, s. 123-126.
- BICKER, K.L., L. ANGUISH, A.A. CHUMANEVICH, M.D. CAMERON, X. CUI, E. WITALISON, V. SUBRAMANIAN, X. ZHANG, A.P. CHAMANEVICH, L.J. HOFSETH, S.A. COONROD, P.R. THOMPSON. D-amino acid based protein arginine deiminase inhibitors: Synthesis, pharmacokinetics, and in cellulo efficacy. *ACS Medicinal Chemistry Letters*. 2013, vol. 3, Issue 12, s. 1081–1085. DOI:10.1021/ml300288d.
- BIKELL, D.C., A. ROWAN, W.F. BODMER. B2-Microglobulin gene mutations: A study of established colorectal cell lines and fresh tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1994, vol. 91, s. 4751-4755.
- BOWIE, A., L.A.J. O'NEILL. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *Journal of Leukocyte Biology*. 2000, vol. 67, Issue 4, s. 508-514.
- BREUNINGER, H., B. SCHLAGENHAUFF, W. TTROEBEL, G. SCHAUMBERG-LEVER, G. RASSNER.. Patterns of local horizontal spread of melanomas: consequences for surgery and histopathologic investigation. *American Journal of Surgical Pathology*. 2000, vol. 23, Issue 12. s. 1493-1498. DOI: ISSN: 0147-5185.
- BROWN, L.M., D.R. WELCH, S.R. RANNELS. B16-F10 melanoma cell colonization of mouse lung is enhanced by partial pneumonectomy. *Clinical and Experimental Meastasis*. 2002, vol. 19, Issue 5, s. 369-376.
- BULUT, Y., E. FAURE, L. THOMAS, O. EQUILS, M. ARDITI. Cooperation of Toll-Like Receptor 2 and 6 for Cellular Activation by Soluble Tuberculosis Factor and *Borrelia burgdorferi* Outer Surface Protein A Lipoprotein: Role of Toll-Interacting Protein and IL-1 Receptor Signaling Molecules in Toll-Like Receptor 2 Signaling. *The Journal of Immunology*. 2001, vol. 167, Issue 2, s. 987-994. DOI: 10.4049/jimmunol.167.2.987.
- CAREY, R. W., J. F. HOLLAND, H. Y. WHANG, E. NETER, B. BRYANT. Clostridial oncolysis in man. *European Journal of Cancer (1965)*. 1967, vol. 3, Issue 1, s. 37-46. DOI: 10.1016/0014-2964(67)90060-6.
- CARMODY, L.A., T. SPILKER, J.J. LIPUMA. Reassessment of

- Stenotrophomonas maltophilia* phenotype. *Journal of Clinical Microbiology*. 2011, vol. 49, Issue 3, s. 1101-1103. DOI: 10.1128/JCM.02204-10.
- COLEY, W. B. Late Results of the Treatment of Inoperable sarkoma by the Mixed Toxins of Erysipelas and Bacillus prodigiosus. *American Journal of the Medical Sciences*. 1906, vol. 131, Issue 3, s. 375-430.
 - COOPER, G. M. *Elements of human cancer*. Jones and Barlett Publishers, Inc. 1992. ISBN 0-86720-191-6.
 - CUI, Z., M.C. WILLINGHAM, A.M. HICKS, M.A. ALEXANDER-MILLER, T.D. HOWARD, G.A. HAWKINS, M.S. MILLER, H.M. WEIR, W. DU, C.J. DELONG. Spontaneous regression of advanced cancer: Identification of a unique genetically determined, age-dependent trait in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 2003, vol. 100, Issue 11, s. 6682-6687.
 - DALLEGRI, F., L. OTTONELLO, A. BALLESTRERO, P. DAPINO, F. FERRANDO, F. PATRONE, C. SACCHETTI. Tumor cell lysis by activated human neutrophils: Analysis of neutrophil-delivered oxidative attack and role of leukocyte function-associated antigen 1. *Inflammation*. 1991, vol. 15, Issue 1, s. 15-30.
 - DANA, R.R., C. EIGSTIS, K.L. HOLMES, T.L. LETO. A Regulatory Role for ADP-ribosylation Factor 6 (ARF6) in Activation of the Phagocyte NADPH Oxidase. *The Journal of Biological Chemistry*. 2000, vol. 275, s. 32566-32571. DOI: 10.1074/jbc.M005406200.
 - DANG, L. H., CH. BETTEGOWDA, D.L. HUSO, K.W. KINZLER, B. VOGELSTEIN. Combination bacteriolytic therapy for the treatment of experimental tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001, vol. 98, Issue 26, s. 15155–15160. DOI: 10.1073/pnas.251543698.
 - DEMERS, M., D.S. KRAUSE, D. SCHATZBERG, K. MARTINOD, J.R. VOORHEES, T.A. FUCHS, D.T. SCADDEN, D.D. WAGNER. Cancers predispose neutrophils to release extracellular DNA traps that contribute to cancer-associated thrombosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 2012, vol. 109, Issue 32, s. 13076–13081. DOI: 10.1073/pnas.1200419109.
 - DIAZ Jr., L.A., I. CHEONG, C.A. FOSS, X. ZHANG, B.A. PETERS, N. AGRAWAL, CH. BETTEGOWDA, B. KARIM, G. LIU, K. KHAN, X. HUANG, M. KOHLI, L.H. DANG, P. HWANG, A. VOGELSTEIN, E. GARRET-MAYER, B. KOBRIN, M. POMPER, S. ZHOUL, K. W. KINZLER, B. VOGELSTEIN, D.L. HUSO. Pharmacologic and toxicologic evaluation of *C. novyi*-NT spores. *Toxicological Sciences*. 2005, vol. 88, Issue 2, s. 562-575. DOI: 10.1093/toxsci/kfi316.
 - DICKSON, J. S., M. KOOHMARAIE. Cell surface charge characteristics and their relationship to bacterial attachment to meat surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*. 1989, vol. 55, Issue 4, s. 832 – 836.
 - EDWARDS, P.A.. Heterogeneous expression of cell-surface antigens in normal epithelia and their tumours, revealed by monoclonal antibodies. *British Journal of Cancer*. 1985, vol. 51, Issue 2, s. 149–160.
 - ELGERT, K.D., D.G. ALLEVA, D.W. MULLINS. Tumor-induced immune dysfunction: the macrophage connection. *Journal of Leukocyte Biology*. 1998, vol. 64, Issue 3, s. 275-290.
 - EPSTEIN, J., Q. EICHBAUM, S. SHERIFF, R.A.B. EZENKOWITZC. The collectins in innate immunity. *Current Opinion in Immunology*. 1996, vol. 8, Issue 1, s. 29–35. DOI: 10.1016/S0952-7915(96)80101-4.

- FÁBEROVÁ, J. Ověření možnosti terapie nádorových onemocnění pomocí bakterií *Stenotrophomonas maltophilia*. Bakalářská práce, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, České Budějovice. 2012.
- FAIRCHILD, E.T., W.E. CARSON. Animal models of Melanoma. In: Tumor models in Cancer, Editor B.A. TEICHER. Springer Science and Business Media. 2010. ISBN 987-1-60761-967-3.
- FARRELL, H.E., H. VALLY, D. M. LYNCH, P. FLEMING, G.R. SHELLAM, A.A. SCALZO, N.J. DAVIS-POYNTER. Inhibition of natural killer cells by a cytomegalovirus MHC class I homologue in vivo. *Nature*. 1997, vol. 386, s. 510 – 514. DOI:10.1038/386510a0.
- FIALKOW, L., Y. WANG, G.P. DAWNEY. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. *Free Radical Biology and Medicine*. 2007, vol. 42, Issue 2, s. 153–164. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2006.09.030.
- FRANKEL, A.E., P. ROSSI, T.M. KUZEL, F. FOSS. Diphtheria Fusion Protein Therapy of Chemoresistant Malignancies. *Current Cancer Drug Targets*. 2002, vol. 2, Issue 1, s. 19-36. DOI: 10.2174/1568009023333944.
- FRIDLINDER, Z.G., J. SUN, S. KIM, V. KAPOOR, G. CHANG, L. LING, G.S. WORTHEN, S.M. ALBELDA. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN. *Cancer Cell*. 2009, vol. 16, Issue 3, s. 183-94. DOI: 10.1016/j.ccr.2009.06.017.
- FUCHS, T.A., J.A. KREMER HOVINGA, D. SCHATZBERG, D.D. WAGNER, B. LAMMLE. Circulating DNA and myeloperoxidase indicate disease activity in patients with thrombotic microangiopathies. *Blood*. 2012, vol. 120, Issue 6, s. 1157 – 1164. DOI: 10.1182/blood-2012-02-412197.
- FUCHS, T.A., U. ABED, CH. GOOSMANN, R. HURWITZ, I. SCHULZE, V. WAHN, Y. WEINRAUCH, V. BRINKMANN, A. ZYCHLINSKY. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *The Journal of Cell Biology*. 2007, vol. 176, Issue 2, s. 231-241. DOI: 10.1083/jcb.200606027.
- GAO, J., H. CHEN, J.D. FILIE, CH.A. KOZAK, P.M. MURPHY. Differential Expansion of the N-Formylpeptide Receptor Gene Cluster in Human and Mouse. *GENOMICS*. 1998, vol. 51, Issue 2, s. 270–276. DOI: 10.1006/geno.1998.5376.
- GAO, J.L., P.M. MURPHY. Species and subtype variants of the N-formyl peptide chemotactic receptor reveal multiple important functional domains. *The Journal of Biological Chemistry*. 1993, vol. 268, Issue 34, s. 25395–25401.
- GARCIA, R.C., R. MURGIA, M. CINCO. Complement Receptor 3 Binds the *Borrelia burgdorferi* Outer Surface Proteins OspA and OspB in an iC3b-Independent Manner. *Infection and Immunity*. 2005, vol. 73, Issue 9, s. 6138-6142. DOI: 10.1128/IAI.73.9.6138-6142.2005.
- GREEN, J.A., R.P. WILLIAMS. Studies on pigmentation of *Serratia marcescens*. *Journal of Bacteriology*. 1957, vol. 74, Issue 5, s. 633–636.
- GRIMONT, F., P.D. GRIMONT. The Genus *Serratia*. *Prokaryotes*. 2006, vol. 6, s. 219–244. DOI: 10.1007/0-387-30746-x_11.
- GÜNGÖR, N, A.M. KNAAPEN, A. MUNNIA, M. PELUSO, G.R. HAENEN, R.K. CHIU, R.W.L. GODSCHALK, F.J. van SCHOOTEN. Genotoxic effects of neutrophils and hypochlorous acid. *Mutagenesis*. 2010, vol. 25, Issue 2s. 149-154. DOI: 10.1093/mutage/geb053.
- GUPTA, A.K., M.B. JOSHI, M. PHILIPPOVA, P. ERNA, P. HASLER, S. HAHN, T.J. RESING. Activated endothelial cells induce neutrophil extracellular traps and

- are susceptible to NETosis-mediated cell death. *FEBS Letters*. 2010, vol. 584, Issue 14, s. 3193-3197. DOI: 10.1016/j.febslet.2010.06.006.
- HAIRDEN, V.P., J. O. HARRIS. The isoelectric point of bacterial cells. *Journal of Bacteriology*. 1953, vol. 65, Issue 2, s. 198-202.
 - HAN, J. C., G. Y. HAN. A Procedure for Quantitative Determination of Tris(2-Carboxyethyl)phosphine, an Odorless Reducing Agent More Stable and Effective Than Dithiothreitol. *Analytical Biochemistry*. 1194, vol. 220, Issue 1, s. 5–10. DOI:10.1006/abio.1994.1290.
 - HANAHAHAN, D., R. A. WEINBERG. Hallmarks of Cancer. *Cell*. 2000, vol. 100, Issue 1, s. 57-70. DOI 10.1016/S0092-8674(00)81683-9.
 - HANAHAHAN, D., R. A. WEINBERG. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 2011, vol. 144, Issue 5, s. 646-674. DOI 10.1016/j.cell.2011.02.013.
 - HARDJITO, L., A. HUG, R.R. COLWELL. The Influence of Environmental Conditions on the Production of Pigment by *Serratia marcescens*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 2002, vol. 7, Issue 2, s. 100-104.
 - HARRIS, N., M. SUPER, M. RITS, G. CHANG, R.A. EZEKOWITZ. Characterization of the murine macrophage mannose receptor: demonstration that the downregulation of receptor expression mediated by interferon-gamma occurs at the level of transcription. *Blood*. 1992, vol. 80, Issue 9, s. 2363-2373.
 - HAYAHI, R., M. MIYAZAKI, S. OSADAA, H. KAWASAKI, I. FUJITA, Y. HAMASAKI, H. KODAMA. A formyl peptide substituted with a conformationally constrained phenylalanine residue evokes a selective immune response in human neutrophils. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2013, vol. 21, Issue 3, s. 668–675. DOI: 10.1016/j.bmc.2012.11.046.
 - HAYASHI, A., Y. NISHIDA, S. YOSHII, S.Y. KIM, H. UDA, T. HAMASAKI. Immunotherapy of ovarian cancer with cell wall skeleton of *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin: effect of lymphadenectomy. *Cancer Science*. 2009, vol. 100, Issue 10, s. 1991-1995. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2009.01271.x.
 - HICKIN, D.J., F.M. MARINCOLA, S. RERRONE. HLA class I antigen downregulation in human cancers: T-cell immunotherapy revives an old story. *Molecular Medicine Today*. 1999, vol. 5, Issue 4, s. 178–186. DOI: 10.1016/S1357-4310(99)01451-3.
 - HICKS, A.M., G. RIEDLINGER, M.C. WILLINGHAM, M.A. ALEXANDER-MILLER, C. VON KAP-HERR, M.J. PETTENATI, A.M. SANDERS, H-M-WEIR, W- DU. J- KIM, A.J. SIMPSON, L.J. OLD, Z. CUI. Transferable anticancer innate immunity in spontaneous regression complete resistance mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 2006, vol. 103, Issue 20, s. 7753–7758. DOI: 10.1073/pnas.0602382103.
 - HO-TIN-NOE, B., C. CARBO, M. DEMERS, S.M. CIFUNI, T. GOERGE, D.D. WAGNER. Innate immune cells induce hemorrhage in tumors during thrombocytopenia. *American Journal of Pathology*. 2009, vol. 175, Issue 4, s. 1699 – 1708. DOI: 10.2353/ajpath.2009.090460.
 - HOUSTON, A., F.D. WALDRON-LYNCH, M.W. BENNETT, D. ROCHE, G.C. O’SULLIVAN, F. SHANAHAHAN, J. O’CONNELL. Fas ligand expressed in colon cancer is not associated with increased apoptosis of tumor cells in vivo. *International Journal of Cancer*. 2003, vol. 107, Issue 2, s. 209–214. DOI: 10.1002/ijc.11392.
 - HUGH, R., E. LEIFSON. A description of the type strain of *Pseudomonas maltophilia*. *International Bulletin of Bacteriological Nomenclature and*

- Taxonomy. 1963, vol. 13, Issue 3, s.133–138. DOI: 10.1099/0096266X-13-3-133.
- CHARON, N.W., E.P. GREENBERG, M.B.H. KOOPMAN, R.J. LIMBERGER. Spirochete chemotaxis, motility, and the structure of the spirochetal periplasmic flagella. *Research in Microbiology*. 1992, vol. 143, Issue 6, s. 597–603. DOI: 10.1016/0923-2508(92)90117-7.
 - IMAI, Y., Y. KUBOTA, S. YAMAMOTO, K. TSUJI, M. SHIMATANI, N. SHIBATANI, S. TAKAMIDO, M. MATSUSHITA, K. OKAZAKI. Neutrophils enhance invasion activity of human cholangiocellular carcinoma and hepatocellular carcinoma cells: An in vitro study. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2005, vol. 20, Issue 2, s. 287–293. DOI: 10.1111/j.1440-1746.2004.03575.x.
 - INABA, M., T. TAZUKO, S. FUJIMOTO, M.K. SAKURAIY, Y. OHNUSHI, Y. UEYAMA, T. NOMURA. Evaluation of response rates to various antitumor agents of human gastric tumours implanted in nude mouse. *Japanese Journal of Cancer Research*. 1986, vol. 77, s. 190-196.
 - JAKOBISIAK, M., W. LASEK, J. GOLAB. Natural mechanismus protecting against cancer. *Immunology Letters*. 2003, vol. 90, Issues 2-3, s. 103–122. DOI: 10.1016/j.imlet.2003.08.005.
 - JANOTOVÁ, T., M. JALOVECKÁ, M. AUEROVÁ, I. ŠVEC OVÁ, P. BRUZLOVÁ, V. MAIEROVÁ, Z. KUMŽÁKOVÁ, Š. ČUNÁTOVÁ, Z. VLČKOVÁ, V. CAISOVÁ, P. ROZSYPALOVÁ, K. LUKÁČKOVÁ, N. VÁCOVÁ, M. WACHTLOVÁ, J. SALÁT, J. LIESKOVSKÁ, J. KOPECKÝ, J. TENKA. The Use of Anchored Agonists of Phagocytic Receptors for Cancer Immunotherapy: B16-F10 Murine Melanoma Model. *PLoS ONE*. 2014, vol. 9, Issue 1. DOI: 10.1371/journal.pone.0085222
 - JONES, G.H., C.E. BALLOU. Studies on the Structure of Yeast Mannan, I. Purificatin and some properties of an α -mannosidase from an *Arthrobacter* species. *Journal of Biological Chemistry*. 1969, vol. 244, Issue 4, s. 1043-1051.
 - JONES, G.H., C.E. BALLOU. Studies on the Structure of Yeast Mannan, II. Mode of action of the *Arthrobacter* α -mannosidase on Yeast mannan. *Journal of Biological Chemistry*. 1969, vol. 244, Issue 4, s. 1052-1059.
 - JUCKER, B.A., H. HARMS, J.B. ZEHNDER. Adhesion of the Positively Charged Bacterium *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia* 70401 to Glass and Teflon. *Journal of Bacteriology*. 1996, vol. 178, Issue 18, s. 5472-5479.
 - KATO, K., CH. ITOH, T. YASUKOUCHI, T. NAGAMUNE. Rapid Protein Anchoring into the Membranes of Mammalian Cells Using Oleyl Chain and Poly (ethylene glycol) Derivatives. *Biotechnology Progress*. 2004, vol. 20, s. 897-904.
 - KIM, R., M. EMI, K. TANABE, K. ARIHIRO. Tumor-Driven Evolution of Immunosuppressive Networks during Malignant Progression. *Cancer Research*. 2006, vol. 66, s. 5527 – 5536. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-4128.
 - KIM, U, A. BAUMLER, CH. CARRUTHERS, K. BIELAT. Immunological Escape Mechanism in Spontaneously Metastasizing Mammary Tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1975, Vol. 72, Issue 3, s. 1012-1016.
 - KITTLER, H., M. SELTENHEIMA, M. DAWIDA, H. PEHAMBERGERB, K. WOLFFA, M. BINDERA. Morphologic changes of pigmented skin lesions: A useful extension of the ABCD rule for dermatoscopy. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 1999, vol. 40, Issue 4, s. 558-562. DOI:

- 10.1016/S0190-9622(99)70437-8.
- KLENER, P., J. ABRAHÁMOVÁ, V. FAIT, J. MALIŠ, Z. MATĚJOVSKÝ, L. PETRUŽELKA, J. ŽALOUDÍK. *Klinická onkologie*. Galén. 2002. ISBN: 80-7262-151-3.
 - KRAJSOVÁ, Ivana. *Melanom*. Maxdorf. 2006. ISBN: 80-7345-096-8.
 - LI, P., M. LI, M.R. LINDBERG, M.J. KENNETT, N. XIONG, Y. WANG. PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. *The Journal of Experimental Medicine*. 2010, vol. 207, Issue 9, s. 1853-1862.
 - LOLLINI, P., G. FORNI. Specific and nonspecific immunity in the prevention of spontaneous tumours. *Immunology Today*. 1999, vol. 20, Issue 8, s. 347–350. DOI: 10.1016/S0167-5699(99)01450-4.
 - LOUIE, G.V., W. YANG, M.E. BOWMAN, S. CHOE. Crystal Structure of the Complex of Diphtheria Toxin with an Extracellular Fragment of Its Receptor. *Molecular Cell*. 1997, vol. 1, Issue 1, s. 67–78. DOI: 10.1016/S1097-2765(00)80008-8
 - LU, H., W. OUYANG, CH. HUANG. Inflammation, a Key Event in Cancer Development. *Molecular Cancer Research*. 2006, vol. 4, s. 221. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-05-0261.
 - LU, T., S.D. KOBAYASHI, M.T. QUINN, F.R. DELEO. A NET outcome. *Frontiers in Immunology*. 2012, vol., s. 1-9. DOI: 10.3389/fimmu.2012.00365
 - MAEURER, M.J., S.M. GALLIN, D. MARTIN, W. SWANEY, J. BRYANT, P-ROBBINS, G. PARMIANA, W.J. STORKUS, M.T. LOTZE. Tumor escape from immune recognition: lethal recurrent melanoma in a patient associated with downregulation of the peptide transporter protein TAP-1 and loss of expression of the immunodominant MART-1/Melan-A antigen. *Journal of Clinical Investigation*. 1996 vol. 98, Issue 7, s. 1633-1641. DOI:10.1172/JCI118958.
 - MAKIMURA, Y., Y. ASAI, A. SUGIYAMA, T. OGAWA. Chemical structure and immunobiological activity of lipid A from *Serratia marcescens* LPS. *Journal of Medical Microbiology*. 2007, vol. 56, Issue 11, s. 1440-1446.
 - MALMGREN, R. A., C.C. FLANIGAN. Localization of the Vegetative Form of *Clostridium tetani* in Mouse Tumors Following Intravenous Spore Administration. *Cancer Res*. 1955, vol. 15, s. 473-478.
 - MANTOVANI, A., M.A. CASSATELLA, C. COSTANTINI, S. JAILLON. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology*. 2011, vol. 11, s. 519-531. DOI:10.1038/nri3024.
 - MATERA, G., G.S. BARRECA, R. PUCCIO, A. QUIRINO, M.C. LIBERTO, M. DE ROSA, A. FOCA. *Stenotrophomonas maltophilia* lipopolysaccharide (LPS) and antibiotics: "in vitro" effects on inflammatory mediators. *Infezioni in Medicina*. 2004, vol. 12, Issue 4, s. 227-38.
 - MATSUSHITA, M., T. FUJITA. Activation of the Classical Complement Pathway by Marmose-binding Protein in Association with a Novel Cls-like Serine Protease. *The Journal of Experimental Medicine*. 1992, vol. 176, s. 1497-1502.
 - MAUREEN, E.T., J.T. CONARYTN, M.R. LENNARTZG, P.D. STAHL, K. DRICKAMER. Primary Structure of the Mannose Receptor Contains Multiple Motifs Resembling Carbohydrate-recognition Domains. *The Journal of Biological Chemistry*. 1990, vol. 265, Issue 21, s. 12156-12162.
 - MEYER, T., C. SURBER, L.E. FRENCH, E. STOCKFLETH. Resiquimod, a topical drug for viral skin lesions and skin cancer. *Expert Opinion on*

Investigational Drugs. 2013, vol. 22, Issue 1, s. 149-159. DOI: 10.1517/13543784.2013.749236.

- MIGEOTTE, I., D. COMMUNI, M. PARMENTIER. Formyl peptide receptors: A promiscuous subfamily of G protein-coupled receptors controlling immune responses. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2006, vol. 17, Issue 6, s. 501-519. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2006.09.009.
- MIZUKOSHI, E., Y. NAKAMOTO, K. ARAI, T. YAMASHITA, A. SAKAI, Y. SAKAI, T. KAGAYA, T. YAMASHITA, M. HONDA, S. KANEKO. Comparative analysis of various tumor-associated antigen-specific t-cell responses in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2011, vol. 53, Issue 4, s. 1206-16. DOI: 10.1002/hep.24149.
- MORETTA, A., R. BIASSONI, C. BOTTINO, M.C. MINGABI, L. MORETTA. Natural cytotoxicity receptors that trigger human NK-cell-mediated cytotoxicity. *Immunology Today*. 2000, vol. 21, Issue 5, s. 228–234. DOI: 10.1016/S0167-5699(00)01596-6.
- NOF CORPORATION. Biocompatible PEG anchors for cell membrane <BAM>. NOF Corporation. 2015. Dostupné z: http://www.peg-drug.com/peg_product/biocompatible.html.
- O'CONNELL, J., G.C. O'SULLIVAN, J.K. COLLINS, F. SHANAHAN. The Fas Counterattack: Fas-mediated T Cell Killing by Colon Cancer Cells Expressing Fas Ligand. *The Journal of Experimental Medicine*. 1996, vol. 184, s. 10675-1082.
- ODIJAMA, T., M. ONISHI, E. HAYAMA, N. MOTOJI, Y. MOMOSE, A. SHIGAMETSU. Cytotoxicity of B-16 melanoma tumor cells mediated by the myeloperoxidase and lactoperoxidase systems. *The Journal of Biological Chemistry*. 1996, vol. 271, Issue 11, s. 689-693. DOI: 10.1074/jbc.271.11.689.
- OELSCHLAGER, T. A. Bacteria as tumor therapeutics? *Bioengineered Bugs*. 2010, vol. 1, Issue 2, s.146–147. DOI: 10.4161/bbug.1.2.11248.
- OKUYAMA, S., T. AWANO, S. TAKEDA, K. YAMADA-YOKOYAMA, K. TAKAHASHI, T. MATSUZAWA. Gallium Induces Reduction of Negative Charge of the Cell Membrane and Redifferentiation of Cancer Cells. *Tohoku. The Journal of Experimental Medicine*. 1984, vol. 142, Issue 3, s. 347-348.
- PALLERONI, N.J., J.F. BRADBURY. *Stenotrophomonas*, a New Bacterial Genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1980) Swings et al. 1983. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1993, vol. 43, Issue 3, s. 606-609. DOI: 10.1099/00207713-43-3-606.
- PICKEN, R.N., F. STRLE, M.M. PICKEN, E. RUZIC-SABLJIC, V. MARASPIN, S. LOTRIC-FURLAN, J. CIMPERMAN. Identification of Three Species of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato (*B. burgdorferi* Sensu Stricto, *B. garinii*, and *B. afzelii*) Among Isolates from Acrodermatitis Chronica Atrophicans Lesions. *Journal of Investigative Dermatology*. 1998, vol. 110, s. 211–214. DOI:10.1046/j.1523-1747.1998.00130.x.
- QUEEN, M.M., R.E. RYAN, R.G. HOLZER, C-R. KELLER-PECK, CH.L. JORCYK. Breast Cancer Cells Stimulate Neutrophils to Produce Oncostatin M: Potential Implications for Tumor Progression. *Cancer Research*. 2005, vol. 65 s. 8896-8904. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1734.
- REID, K.B.M., M.W. TURNER. Mammalian lectins in activation and clearance mechanisms involving the complement system. *Springer Seminars in Immunopathology*. 1994, vol. 15, Issue 4, s. 307-326.

- REIMAN, J.M., M. KMIECIAK, M.H. MANJILI, K.L. KNUTSON. Tumor immunoediting and immunosculpting pathways to cancer progression. *Seminars in Cancer Biology*. 2007, vol. 17, Issue 4, s. 275–287. DOI: 10.1016/j.semcancer.2007.06.009.
- RUSSELL C.J., G.P. SCHMID, F.W. HYDE, A.G. STEIGERWALT, D.J. BRENNER. *Borrelia burgdorferi* sp. nov.: Etiologic Agent of Lyme Disease. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 1984, vol. 34, Issue 4, s. 496-497. DOI: 10.1099/00207713-34-4-496.
- SAFFARZADEH, M., C. JUENEMANN, M.A. QUEISSER, G. LOCHNIT, G. BARRETO, S.P. GALUSKA, J. LOHMEYER, K.T. PREISSNER. Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: a predominant role of histones. *Public Library of Science ONE*. 2012, vol. 7, Issue 2, e32366. DOI: 10.1371/journal.pone.0032366.
- SALTZMAN, D.A., CH.P. HEISE, D.E. HASZ, M. ZEBEDE, S.M. KELLY, R. CURTIS III, A.S. LEONARD, P.M. ANDRSON. Attenuated *Salmonella typhimurium* Containing Interleukin-2 Decreases MC-38 Hepatic Metastases: A Novel Anti-tumor Agent. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*. 1996, vol. 11, Issue 2, s. 145-153. DOI: 10.1089/cbr.1996.11.145.
- SCHMIDT, H., L. BASTHOLT, P. GEERTSEN, I.J. CHRISTENSEN, S. LARSEN, J. GEHL, H. von der MAASE. Elevated neutrophil and monocyte counts in peripheral blood are associated with poor survival in patients with metastatic melanoma: a prognostic model. *British Journal of Cancer*. 2005, vol. 93, s. 273–278. DOI:10.1038/sj.bjc.6602702.
- SCHWARZOVÁ, K., I. ČIŽNÁR. Immunochemical Analysis of Lipopolysaccharide-Like Component Extracted from *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Folia Microbiologica*. 2004, vol. 49, Issue 5, s. 625–629.
- SILVA, M.T. Neutrophils and macrophages work in concert as inducers and effectors of adaptive immunity against extracellular and intracellular microbial pathogens. *Journal of Leukocyte Biology*. 2010, vol. 87, Issue 5, s. 805-813. DOI: 10.1189/jlb.1109767.
- STAVELEY-O'CARROLL K., E. SOTOMAYOR, J. MONTGOMERY, I. BORRELLO, L. HWANG, S. FEIN, D. PARDOLL, H. LEVITSKY. Induction of antigen-specific T cell anergy: An early event in the course of tumor progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1998, vol. 95, Issue 3, s. 1178–1183.
- STEWARD, I., P.J. SCHLUTER, G.R. SHAW. Cyanobacterial lipopolysaccharides and human health. *Environmental Health: A Global Access Science Source*. 2006, vol. 5, Issue 7. DOI:10.1186/1476-069X-5-7.
- SUDA, T., T. TAKAHASHI, P. GOLDSTEIN, S. NAGATA. Molecular cloning and expression of the fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell*. 1993, vol. 75, Issue 6, s. 1169–1178. DOI: 10.1016/0092-8674(93)90326-L.
- SVÁČKOVÁ, P. Ověření možnosti terapie nádorových onemocnění pomocí bakterií *Stenotrophomonas maltophilia*. Optimalizace této terapie, vliv agonistů signálních receptorů. *Bakalářská práce, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, České Budějovice*. 2013.
- TAKAHASHI, K., M.J. DONOVAN, R.A. ROGERS, R.A.B. EZENKOWIZ. Distribution of murine mannose receptor expression from early embryogenesis through to adulthood. *Cell and Tissue Research*. 1998, vol. 292, Issue 2, s. 311-

323.

- TAKAYAMA, K., R.J. ROTHENBERG, A.G. BARBOUR. Absence of Lipopolysaccharide in the Lyme Disease Spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *Infection and immunity*. 1987, vol. 55, Issue 9, s. 2311-2313.
- TAKEUCHI, O., S. AKIRA. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell*. 2010, vol. 140, Issue 6, s. 805–820. DOI: 10.1016/j.cell.2010.01.022.
- TANNOCK, I. F., D. ROTIN. Acid pH in Tumors and Its Potential for Therapeutic Exploitation. *Cancer research*. 1989, vol. 49, s. 4373-4384.
- THERMO SCIENTIFIC. SMCC: An amine-to-sulphydryl crosslinker with a medium-length cyclohexane-stabilized spacer arm (8.3 angstroms). Thermo Fisher Scientific Inc. 2014. Dostupné z: <http://www.piercenet.com/product/sbcc>.
- THERMO SCIENTIFIC. TCEP-HCl: A thiol-free, odorless yet potent reducing agent for cleaving disulfide bonds. Thermo Fisher Scientific Inc. 2014. Dostupné z: <http://www.piercenet.com/product/tcep-hcl>.
- THIEL, S., T. VORUP-JENSEN, C.M. STOVER, W. SCHWAEBLE, S.B. LAURSEN, K. POULSEN, A.C. EGGLETON, S. HANSEN, U. HOLMSKOV, K.B. REID, J.C. JENSENIUS. A second serine protease associated with mannan-binding lectin that activates complement. *Nature*. 1997, vol. 386, s. 506-510. DOI: 10.1038/386506a0.
- TOLEDO A., T. J. CROWLEY, J. L. COLEMAN, T. J. LARocca, S. CHIANTIA, E. LONDON, J. L. BENACHA. Selective Association of Outer Surface Lipoproteins with the Lipid Rafts of *Borrelia burgdorferi*. *mBIO*. 2015, vol. 5, Issue 2.
- TOMAI, M.A., S.J. GIBSON, L.M. IMBERTSON, R.L. MILLER, P.E. MYHRE, M.J. REITER, T.L. WAGNER, CH.B. TAMULINAS, J.M. BEAURLINE, J-F-GERSTER, V.L. HORTON. Immunomodulation and antiviral activities of the imidazoquinoline S-28463. *Antiviral Research*. 1995, vol. 28, s. 253–64.
- TOROSANTUCCI, A., C. BROMURO, C. CHIANI, F. DE BERNARDIS, F. BERTI, CH. GALLI, F. NORELLI, C. BELLUCCI, L- POLONELLI, P CONSTANTINO, R. RAPPUOLI, A. CASSONE. A novel glyco-conjugate valine against fungal pathogens. *Journal of Experimental Medicine*. 2005, vol. 202, s. 597-606.
- TOSO, J.F., J. G. VEE, P. HWU, F.M. MARINCOLA, N.P. RESTIFO, D.J. SCHARZENTRUBER, R.M. SHERRY, S.L. TOPALIAN, J.C. YANG, F.STOCK, L.J. FREEZER, K.E. MORTON, C. SEIPP, L. HAWORTH, S. MAVROUKAKIS, D. WHITE, S. MACDONALD, J. MAO, M. SZNOL, S.A. RESENBERG. Phase I Study of the Intravenous Administration of Attenuated *Salmonella typhimurium* to Patients With Metastatic Melanoma. *Journal of Clinical Oncology*. 2002, vol. 20, Issue 1, s. 142–152.
- URBAN, F.C., D. ERMART, M. SCHMID, U. ABU-ABED, CH. GOOSMANN, W. NACKEN, V. BRINKMANN, PR. JUNGBLUT, A. ZYCHLINSKY. Neutrophil Extracellular Traps Contain Calprotectin, a Cytosolic Protein Complex Involved in Host Defense against *Candida albicans*. *Peer-reviewed Open-access Medical Journal Pathogens*. 2009, vol. 5, Issue 10. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000639.
- VAN DER MEI, H. C., M.M. COWAN, M.J. GENET, P.G. ROUXHET, H. J. BUSSCHER. Structural and physicochemical surface properties of *Serratia marcescens* strains. *Canadian Journal of Microbiology*. 1992, vol. 38, Issue 10, s. 1033 – 1041. DOI: 10.1139/m92-170.
- VETVICKA, V., B. DVORAK, J. VETVICKOVA, J. RICHTER, J. KRIZAN.

Orally administered marine (1→3)-β-D-glucan phycarine stimulans both humoral and cellular immunity. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2007, vol. 40, s. 291-298.

- VOKURKA, Martin. *Velký lékařský slovník*. Maxdorf. 2004. ISBN: 80-7345-037-2.
- WATSON, M. *Drugs in Clinical Development for Melanoma*. *Pharmaceutical Medicine*. 2012, vol. 26, Issue 3, s. 171–183. DOI: 10.1007/BF03262391.
- WEERATNA, R.D., S.R. MAKINEN, M.J. MCCLUSKIE, H.L. DAVIS. LR agonists as vaccine adjuvants: comparison of CpG ODN and Resiquimod (R-848). *Vaccine*. 2005, vol. 23, Issue 45, s. 5263-5270. DOI: 10.1016/j.vaccine.2005.06.024.
- WHEELER, M.L., D.M. UNDERHILL. Time to cast a larger net. *Nature Immunology*. 2014, vol. 15, Issue 11, s. 1000 – 1001.
- WIEMANN, B., CH.O. STARNES. Coley's toxins, tumor necrosis factor and cancer research: A historical perspective. *Pharmacology & Therapeutics*. 1994, vol. 64, Issue 3, s. 529–564. DOI: 10.1016/0163-7258(94)90023-X.
- YE, R. D., F. BOULAY, J.M. WANG, C. DAHLGREN, C. GERARD, M. PARMENTIER, CH.N. SERHAN, P.M. MURPHY. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIII. Nomenclature for the Formyl Peptide Receptor (FPR) Family. *Pharmacological Reviews*. 2009, vol. 61, Issue 2, s. 119–161. DOI: 10.1124/pr.109.001578.
- YUK, J.M., D.M. SHIN, K.S. SONG, K. LIM, K.H. KIM, S.H. LEE, J.M. KIM, J.S. LEE, T.H. PAIK, J.S. KIM, E.K. JO. Bacillus calmette-guerin cell wall cytoskeleton enhances colon cancer radiosensitivity through autophagy. *Autophagy*. 2010, vol. 6, Issue, s. 46-60. DOI: 10.4161/auto.6.1.10325.
- ZHOU, J., S.A. STOHLMAN, D.R. HINTON, N.W. MARTEN. Neutrophils promote mononuclear cell infiltration during viral-induced encephalitis. *The Journal of Immunology*. 2003, vol. 170, s. 3331–3336. DOI: 10.4049/jimmunol.170.6.3331.